

36º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFRN – CICT 2025



36º cict

Planeta Água: a cultura oceânica
para enfrentar as mudanças
climáticas no meu território.

ANAIS

EXPEDIENTE

APRESENTAÇÃO

O Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica (CICT) é um evento aberto à comunidade no qual todos os aproximadamente 1.700 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 36ª edição do Congresso teve como tema “Planeta Água: a cultura oceânica para enfrentar as mudanças climáticas no meu território”, 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 9º 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 2026.

Ainda em 2025, a Pró-Reitoria de Pesquisa realizou a 7ª 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 2025 em uma mesa redonda.

O congresso cumpriu três funções valiosas para o desenvolvimento da ciência na instituição: inserção dos discentes em um ambiente acadêmico de publicação e apresentação dos resultados da pesquisa; divulgação científica por meio dos vídeos que utilizam uma linguagem científica, porém acessível a todos; e, por fim, a popularização da ciência.

PROGRAMAÇÃO

Outubro – 2025

15/10 Divulgação da lista dos pré-selecionados para concorrer ao 9º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN

Novembro – 2025

03/11 Abertura oficial do evento

03/11 a 07/11 CICT 2025 – Etapa presencial

04/11 a 06/11 Sessões de Apresentações Orais

07/11 Cerimônia de premiação e encerramento do evento

CB

Centro de Biociências

CÓDIGO: SB1065

AUTOR: DANIELE DE CASTRO SOARES

COAUTOR: DANIELA DANTAS DE GOIS

COAUTOR: JOSE BRICIO ARAUJO LOPES

COAUTOR: SILVANA MARIA ZUCOLOTTO LANGASSNER

COAUTOR: CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

COAUTOR: MARIA DO SOCORRO MEDEIROS AMARANTE DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: FABIANE FERREIRA MARTINS

TÍTULO: Avaliação dos efeitos da *Nopalea Cochenillifera* (L.) no fígado de camundongos obesos via dieta induzida

Resumo

A alta ingestão de alimentos hipercalóricos é uma das causas do aumento da obesidade mundial que pode ocasionar inflamação, além da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), caracterizada pelo acúmulo excessivo de ácidos graxos no fígado. Nesse contexto, o extrato da *Opuntia cochenillifera* (EOC) emerge como um agente terapêutico promissor devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Neste estudo foram utilizados 40 camundongos (C57BL/6) divididos em 2 grupos: Controle (C) (n=20, dieta normocalórica) e High-fat (HF) (n=20, dieta hiperlipídica). Após 12 semanas, os animais foram redistribuídos em 4 grupos (n=10) de acordo com os tratamentos: C, C+EOC (CP), HF e HF+EOC (HFP), os quais seguiram por mais 8 semanas. Os animais foram sacrificados, o fígado foi dissecado e seguiu para análises bioquímicas, de microscopia de luz e eletrônica de transmissão (MET). As análises histológicas mostraram que quando comparado com o grupo C, o grupo HF apresentou micro e macro esteatose hepática, além de infiltrados inflamatórios; o tratamento com o EOC recuperou essas alterações. A análise por MET revelou que a dieta hiperlipídica induziu danos ultraestruturais nos hepatócitos, envolvendo o comprometimento das mitocôndrias, e que o extrato da EOC mitigou essas alterações. Nossos resultados mostraram que o extrato da EOC exerceu efeitos promissores, revertendo a obesidade e a DHGNA através da melhora do metabolismo lipídico e da recuperação mitocondrial.

Palavras-chave: Obesidade. Fígado. DHGNA. *Opuntia cochenillifera*. Mitocôndria.

TITLE: Evaluation of the effects of *Opuntia cochenillifera* (L.) on the liver of diet-induced obese mice

Abstract

High intake of high-calorie foods is one of the causes of the rise in global obesity, which can lead to inflammation, in addition to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), characterized by the excessive accumulation of fatty acids in the liver. In this context, *Opuntia cochenillifera* extract (EOC) emerges as a promising therapeutic agent due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. This study involved 40 mice (C57BL/6) divided into two groups: Control (C) (n=20, normocaloric diet) and High-fat (HF) (n=20, high-fat diet). After 12 weeks, the animals were redistributed into four groups (n=10) according to treatment: C, C+EOC (CP), HF and HF+EOC (HFP), which were followed for an additional 8 weeks. The animals were sacrificed, and the liver was dissected for biochemical, light, and transmission electron microscopy (TEM) analyses. Histological analyses revealed that, compared with group C, the HF group exhibited micro- and macrohepatic steatosis, as well as inflammatory infiltrates; treatment with EOC restored these alterations. TEM analysis showed that the high-fat diet induced ultrastructural damage in hepatocytes, involving mitochondrial impairment, and that EOC mitigated these alterations. Our results showed that EOC exerted promising effects, reversing obesity and NAFLD through improved lipid metabolism and mitochondrial recovery.

Keywords: Obesity. Liver. NAFLD. *Opuntia cochenillifera*. Mitochondria.

Introdução

As mudanças do comportamento alimentar, ocorridas nas últimas décadas, culminaram com a chamada transição nutricional, onde as alterações qualitativas e quantitativas da dieta levaram ao aumento da obesidade e da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (1). As dietas ricas em gordura saturada promovem resistência à insulina, aumento da adiposidade, embranquecimento do tecido adiposo marrom (whitening), inflamação de baixo grau (metainflamação), alteração da microbiota intestinal e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (2, 3).

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo excessivo de ácidos graxos no tecido hepático, podendo levar à complicações graves como a esteatohepatite, a transição dessa para a cirrose

hepática e ainda, ao hepatocarcinoma (4). Por desenvolver a curto ou a longo prazo dislipidemias, disfunção endotelial e hipertensão arterial, o consumo excessivo de lipídeos proveniente dos alimentos industrializados, em especial, os ultraprocessados, vem sendo considerado alarmante e alvo de diversas pesquisas (5, 6).

Estudos recentes evidenciam que a ingestão de uma dieta rica em lipídeos resulta no aumento das adipocinas inflamatórias e na redução da adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, o que pode induzir a ativação e a infiltração de macrófagos do fenótipo M1 (pró-inflamatório) no tecido adiposo (7, 8). Esse mecanismo está diretamente associado com a instalação e a progressão da DHGNA e da resistência à insulina (RI), que quando associadas, correlacionam-se positivamente com o aumento da inflamação sistêmica (9).

Pesquisas atuais observaram efeitos deletérios da alta ingestão de lipídeos na expressão de marcadores de beta-oxidação e de biogênese mitocondrial no fígado, além de alterações ultraestruturais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, contribuindo para o agravamento da DHGNA (10). As abordagens farmacológicas para contornar a obesidade e a DHGNA nem sempre são eficazes e apresentam vários efeitos colaterais. Nesse contexto, o extrato da *Opuntia cochenillifera* (*Nopalea cochenillifera*) emerge como um agente terapêutico promissor para mitigar a obesidade e a DHGNA.

A *Opuntia cochenillifera*, também conhecida como palma, palma doce e palma- forrageira, é uma cactácea nativa da biodiversidade do semiárido do nordeste brasileiro que tem sido amplamente utilizada para fins agrícolas, alimentares e medicinais (11, 12). De acordo com as características fitoquímicas, a *Opuntia cochenillifera* é rica em compostos fenólicos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em vários mecanismos celulares (12, 13). O desenvolvimento de estratégias para combater a obesidade e a DHGNA é necessário e emergente considerando o cenário atual onde a obesidade é classificada como uma pandemia mundial (14). Ademais, até o presente momento, não há relatos na literatura que mostrem o papel da *Opuntia cochenillifera* sobre a obesidade e a DHGNA.

Metodologia

Animais e dietas

Quarenta camundongos (C57BL/6J) machos de três meses de idade (CEUA nº 067/2023) foram obtidos do Biotério do Instituto do Cérebro da UFRN. Os camundongos permaneceram mantidos no Biotério da Farmacologia da UFRN em condições controladas de temperatura e umidade ($60\pm 10\%$), com livre acesso à água e à dieta, em caixas “pathogen free”. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão para roedores (C, n=20, 10% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 76% sob a forma de carboidratos = 15 kJ/g de dieta), ou dieta rica em lipídeos (HF, n=20, 50% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 36% sob a forma de carboidratos, = 21 kJ/g de dieta) por 12 semanas. Após, de acordo com os tratamentos, os grupos foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos por mais oito semanas:

- 1- Grupo controle (C, n=10), dieta controle ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- 2- Grupo controle + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (CP, n=10), dieta controle acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal;
- 3- Grupo high-fat (HF, n=10), dieta HF (50% de lipídios) ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- 4- Grupo high-fat + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (HFP, n=10), dieta HF (50% de lipídios) acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal.

O extrato da *O. cochenillifera* foi fornecido em parceria com o Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Bioativos da UFRN, o qual realizou o isolamento e a caracterização fitoquímica de acordo com protocolos já publicados pelo grupo (12, 15). A concentração de 200mg/kg de massa corporal foi usada com base em respostas anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato da *O. cochenillifera* em modelos experimentais (12, 15). Todos os procedimentos relacionados à experimentação animal abordados neste estudo foram realizados de acordo com as recomendações do “National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996) (16). As dietas experimentais (Tabela 1) foram elaboradas pela empresa PragSoluções Biociências (Jaú-SP) seguindo as diretrizes do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (17). A Figura 1 resume o delineamento experimental descrito acima.

Massa corporal, ingestão alimentar e energética

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente (segunda-feira, 14:00h pm) em balança de precisão 0,01 g (Shimadzu, BL-3200H). A ingestão alimentar foi avaliada diariamente (14:30h pm) através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi calculada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias foi convertido para quilojoules (kJ), medida universal de energia.

Sacrifício

Ao final do protocolo experimental, os camundongos foram mantidos em jejum por seis horas e após, foram anestesiados profundamente com Cloridrato de Ketamina 5% (0,15ml/100g) e Xilazina 2% (0,15 ml/100g). Uma incisão mediana foi realizada entre o abdome e a pelve; e o fígado foi cuidadosamente dissecado, removido e documentado para análises macroscópicas. Após, o fígado foi pesado e fixado em formalina de Millionig 10% para técnicas de microscopia de luz; e alternativamente, fixado em glutaraldeído 2,5% para análises de microscopia eletrônica de transmissão. O lobo hepático direito foi congelado a -80°C para análises bioquímicas.

Análises histológicas e estereológica (densidade de volume da esteatose hepática)

Após a fixação, os fragmentos do fígado foram desidratados, diafanizados, incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seccionados (5 µm de espessura) e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Optika B383 acoplado com câmera digital, Ponteranica - Itália). Para a análise estereológica, foram obtidas 50 fotomicrografias em campos aleatórios por grupo (n=5). A densidade de volume da esteatose hepática (Vv) foi estimada por contagem de pontos: $Vv [est, fígado] = Pp [est, fígado] / PT$; onde Pp é o número de pontos que atingem as inclusões lipídicas, PT é o total de pontos do sistema teste. As imagens foram analisadas empregando o software STEPanizer (www.stepanizer.com) usando um sistema teste com 36 pontos (18).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fragmentos do fígado medindo cerca de 1 mm³ foram fixados em glutaraldeído 2,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram então

pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incorporadas em resina epon 812 (Electron Microscopy Science, 48h a 60/70°C). Cortes ultrafinos (60-80 nm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo (Leica UltraCut ultramicrotome, Wetzlar, Alemanha) e transferidos para grades metálicas, as quais foram contrastadas em acetato de uranila 5% e em citrato de chumbo 2%, e depois, examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Modelo FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin).

Dosagem bioquímica do triacilglicerol hepático

O fígado foi clivado e 50mg foram homogeneizados em álcool isopropílico (Vetec, Brasil) e centrifugados (5900×g) por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e os níveis do triacilglicerol foram quantificados através do kit colorimétrico (K117-1 Bioclin, Brasil) utilizando o espectrofotômetro semiautomático (fotômetro Bioplus-2000) (19).

3. Análise estatística

As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste de Dunnett T3, pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos foram utilizados o índice de significância com $p < 0,05$ (GraphPad Prism versão 9.5 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Resultados e Discussões

Ao longo do período experimental, foi observado que a dieta hiperlipídica resultou em expressivo ganho de massa corporal. O grupo HF apresentou aumento de 73% ($p < 0,0001$) na massa corporal em relação ao grupo C, evidenciando o potencial obesogênico da dieta (20, 21). Ao contrário, o grupo HFP apresentou redução de 24% em relação ao grupo HF ($p < 0,0001$), o que demonstra, de fato, que o tratamento foi eficaz na diminuição dos índices de massa corporal. O grupo CP também apresentou redução, embora mais discreta em comparação ao C (-8,6%; $p < 0,001$). Esses achados sugerem que a utilização do extrato da *O. cochenillifera* apresentou efeitos antiobesogênicos independentemente do tipo de dieta, não se restringindo exclusivamente àquelas hiperlipídicas (Figura 2).

Com relação à ingestão alimentar, não foi observada diferença significativa entre os grupos HF e C (+2%; ns), sugerindo que o aumento de massa corporal no grupo high-fat não esteve

associado ao volume de alimento consumido, mas sim à elevada densidade calórica da dieta (22). Esse achado pode ser comprovado ao observar que a ingestão energética foi 40% maior no grupo HF em relação ao C ($p < 0,0001$). Em comparação ao grupo HF, o grupo HFP apresentou redução de 26% na ingestão alimentar ($p < 0,0001$) e de 28% na ingestão energética ($p < 0,0001$), mostrando, mais uma vez, que o extrato da *O. cochenillifera* exerceu efeito modulador sobre o consumo alimentar, contribuindo para a homeostase energética durante o consumo de dietas obesogênicas. No grupo CP, a ingestão alimentar e energética foram, respectivamente: 7,4% ($p < 0,001$) e 14% ($p < 0,0001$) menores do que no grupo C, indicando o potencial anorexígeno da *O. cochenillifera* mesmo em indivíduos não obesos (Figura 3).

As análises histológicas demonstraram que quando comparados ao grupo C, o grupo HF apresentou hepatócitos com várias inclusões lipídicas no citoplasma caracterizando a micro e a macro esteatose hepática (setas e asteriscos) (Figura 4). Além disso, no grupo HF foram observados diversos pontos de infiltrados inflamatórios na região da veia centrolobular (retângulo pontilhado). Conforme estudos prévios, em resposta ao excesso de lipídios, os adipócitos perdem a capacidade de armazenamento/expansão e os ácidos graxos passam a ficar armazenados em outros tecidos, desencadeando a lipotoxicidade (23). No fígado, a lipotoxicidade afeta principalmente o funcionamento das mitocôndrias, gerando alterações celulares e a esteatose hepática (24). Simultaneamente, a lipotoxicidade causa o recrutamento e a ativação de células inflamatórias, resultando em inflamação local (25). O tratamento com o extrato da *O. cochenillifera* recuperou essas alterações histológicas provocadas pela lipotoxicidade da dieta hiperlipídica.

De forma complementar, a análise estereológica que teve como objetivo a quantificação da densidade de volume de esteatose hepática (V_v de esteatose), mostrou que, quando comparado ao grupo C, o grupo HF exibiu aumento significativo da esteatose (+729%, $p < 0,0001$). Em paralelo, os níveis de triacilglicerol hepático do grupo HF foram maiores em comparação com o grupo C (+258%, $p < 0,001$). Os animais obesos tratados com o extrato da *O. cochenillifera* apresentaram menor densidade de volume de esteatose hepática acompanhada por redução nos níveis do triacilglicerol hepático (-251%; $p < 0,0001$ e 264%, $p < 0,001$ respectivamente), mostrando os efeitos benéficos da *O. cochenillifera* no metabolismo lipídico (Figura 5).

Corroborando com os resultados histológicos (estruturais), a análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que a dieta hiperlipídica induziu alterações ultraestruturais expressivas nos hepatócitos e que o extrato da *O. cochenillifera* mitigou essas alterações. Conforme mostra a Figura 6, os hepatócitos do grupo controle apresentam núcleo (N), mitocôndrias (M), lisossomos (retângulos pontilhados), retículo endoplasmático rugoso (RER) (setas vermelhas) e cisternas do complexo de Golgi (setas amarelas) com elétrondensidades, volumes e contornos normais.

Por outro lado, os hepatócitos do grupo HF apresentaram núcleo (N) com pontos de cromatina condensada indicativos de apoptose (setas verdes). As mitocôndrias (M) exibiram rarefação (elétron-lúcidas), desarranjo das cristas e cristólise. O RER apresentou degeneração (elétron-lúcido) e redução no volume, características compatíveis com o estresse do retículo endoplasmático (setas vermelhas). No complexo de Golgi foi observada atrofia (setas amarelas) e nos lisossomos, foram notadas deformações e acúmulo de lipofucsina (retângulos pontilhados). Além disso, no citoplasma foram encontradas várias inclusões lipídicas (LD) (Figura 7).

O extrato da *O. cochenillifera* reverteu esses danos ultraestruturais provocados pela lipotoxicidade da dieta HF. Os hepatócitos apresentaram núcleo (N) com volume, contorno (membrana nuclear) e cromatina regulares, indicando elevada atividade de síntese. As mitocôndrias (M) exibiram eletron-densidade, membrana externa e cristas preservadas. O R.E.R (setas vermelhas) e o complexo de Golgi (setas amarelas) recuperaram seus volumes e a integridade das suas membranas; e os lisossomos exibiram contornos, volumes e elétrondensidades dentro dos parâmetros de normalidade (Figura 8).

Esses resultados mostram que o extrato da *O. cochenillifera* exerceu efeitos benéficos nas organelas dos hepatócitos dos camundongos obesos, especialmente com relação à recuperação das características ultraestruturais das mitocôndrias. As mitocôndrias são as organelas que estão intimamente envolvidas com o desenvolvimento da DHGNA; em estado saudável, as mitocôndrias realizam a beta-oxidação dos ácidos graxos, impedindo que estes se acumulem e fiquem internalizados em vesículas lipídicas no citoplasma no formato de esteatose (26, 27).

Quando sofrem algum insulto metabólico, como no caso da lipotoxicidade, as mitocôndrias desenvolvem alterações estruturais, conforme comprovadas nesse estudo e,

consequentemente, perdem as suas funções com redução na beta-oxidação lipídica (28, 29). Estudos recentes mostram que o extrato da *O. cochenillifera* é rico em flavonoides, especialmente a quercetina, a rutina e o kampferol, que juntos podem modular positivamente as mitocôndrias através de seus potenciais antioxidantes, os quais exercem um efeito protetor sobre essas organelas (12, 30). A Figura 9 resume os resultados encontrados neste estudo.

Conclusão

Este estudo mostrou que o extrato da *Opuntia cochenillifera* restaurou a obesidade, o metabolismo energético e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) em modelo de obesidade induzida via dieta hiperlipídica. De modo geral, o extrato da *O. cochenillifera* reduziu a massa corporal e mitigou as alterações bioquímicas, estruturais e ultraestruturais no fígado dos camundongos obesos, exibindo potencial antiobesogênico, anti-inflamatório e antiesteatótico. Esses resultados apontam o extrato da *O. cochenillifera* como um agente terapêutico promissor para o tratamento da obesidade e da DHGNA, doença de difícil manejo e intervenção clínica. Adicionalmente, esses achados colocam a *O. cochenillifera* em evidência, valorizando essa planta nativa da biodiversidade do estado do Rio Grande do Norte.

É importante mencionar que os resultados aqui apresentados são parte de um projeto de mestrado em execução, e que dentre as análises em andamento, as análises de expressão de genes e de proteínas relacionadas à inflamação, ao metabolismo lipídico e à função mitocondrial estão sendo realizadas a fim de complementar esses achados e de explorar os mecanismos moleculares e funcionais envolvidos na DHGNA.

Referências

1. Juul F, Martinez-Steele E, Parekh N, Monteiro CA. The role of ultra-processed food in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2025.
2. Dutta B, Tripathy A, Archana PR, Kamath SU. Unraveling the complexities of diet induced obesity and glucolipid dysfunction in metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2025;17(1):292.

3. Ezhilarasan D, Langeswaran K. Hepatocellular Interactions of Potential Nutraceuticals in the Management of Inflammatory NAFLD. *Cell Biochem Funct.* 2024;42(7):e4112.
4. Israelsen M, Francque S, Tsochatzis EA, Krag A. Steatotic liver disease. *Lancet.* 2024;404(10464):1761-78.
5. Xiang M, Tian X, Wang H, Gan P, Zhang Q. Inappropriate Diet Exacerbates Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease via Abdominal Obesity. *Nutrients.* 2024;16(23).
6. Shim JS. Ultra-Processed Food Consumption and Obesity: A Narrative Review of Their Association and Potential Mechanisms. *J Obes Metab Syndr.* 2025;34(1):27-40.
7. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
8. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism.* 2019;92:82-97.
9. Herrera-Ojeda JL, Blanco-Palma RS, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Montalvo-Jave EE, Nuno-Lambarri N. The pathophysiological link between type 1 diabetes and MASLD: insights into insulin resistance and liver dysfunction. *J Endocrinol Invest.* 2025.
10. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Vasques-Monteiro IML, Souza-Tavares H, Martins FF, Daleprane JB, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and dipeptidyl peptidase-4 inhibition target dysbiosis to treat fatty liver in obese mice. *World J Gastroenterol.* 2022;28(17):1814-29.
11. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(3):325-48.
12. da Silva ECS, Bernardo Guerra GC, de Araujo ERD, Schlamb J, da Silva VC, de Aragao Tavares E, et al. Phenolic-rich extract of *Nopalea cochenillifera* attenuates gastric lesions induced in experimental models through inhibiting oxidative stress, modulating inflammatory markers and a cytoprotective effect. *Food Funct.* 2023;14(7):3242-58.

13. Kozai H, Watanabe C, Kosaka R, Aoki T, Hamada H, Kawashima M, et al. *Nopalea cochenillifera* Regulates the Immune Response and Gut Microbiota in Mice. *Nutrients*. 2024;16(24).
14. Wolfenden L, Ezzati M, Larijani B, Dietz W. The challenge for global health systems in preventing and managing obesity. *Obes Rev*. 2019;20 Suppl 2:185-93.
15. Tavares EA, Guerra GCB, da Costa Melo NM, Dantas-Medeiros R, da Silva ECS, Andrade AWL, et al. Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of Phenolic-Rich Extract from *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae): A Preclinical Study on the Prevention of Inflammatory Bowel Diseases. *Plants (Basel)*. 2023;12(3).
16. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J*. 1997;38(1):41-8.
17. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*. 1997;127(5 Suppl):838S-41S.
18. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch*. 2011;459(5):477-85.
19. Soares E, Soares AC, Trindade PL, Monteiro EB, Martins FF, Forgie AJ, et al. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) powder consumption improves the metabolic profile and regulates gut microbiome composition in high-fat diet-fed mice. *Biomed Pharmacother*. 2021;144:112314.
20. Martins FF, Santos-Reis T, Marinho TS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Hypothalamic anorexigenic signaling pathways (leptin, amylin, and proopiomelanocortin) are semaglutide (GLP-1 analog) targets in obesity control in mice. *Life Sci*. 2023;313:121268.
21. Martins FF, Marinho TS, Cardoso LEM, Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Semaglutide (GLP-1 receptor agonist) stimulates browning on subcutaneous fat adipocytes and mitigates inflammation and endoplasmic reticulum stress in visceral fat adipocytes of obese mice. *Cell Biochem Funct*. 2022;40(8):903-13.
22. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Santana-Oliveira DA, Fernandes-da-Silva A, Brito GC, Martins FF, Souza-Mello V. Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte

Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice. J Am Nutr Assoc. 2023;42(5):435-44.

23. Ameer F, Scandiuizzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. Metabolism. 2014;63(7):895-902.

24. Luukkonen PK, Porthan K, Ahlholm N, Rosqvist F, Dufour S, Zhang XM, et al. The PNPLA3 I148M variant increases ketogenesis and decreases hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial function in humans. Cell Metab. 2023;35(11):1887-96 e5.

25. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. J Hepatol. 2018;68(2):280-95.

26. Zheng Y, Wang S, Wu J, Wang Y. Mitochondrial metabolic dysfunction and non-alcoholic fatty liver disease: new insights from pathogenic mechanisms to clinically targeted therapy. J Transl Med. 2023;21(1):510.

27. Li YF, Xie ZF, Song Q, Li JY. Mitochondria homeostasis: Biology and involvement in hepatic steatosis to NASH. Acta Pharmacol Sin. 2022;43(5):1141-55.

28. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. Life Sci. 2018;192:26-32.

29. Prasun P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020;1866(10):165838.

30. Nunes AAC. Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Prospection of Nopalea cochenillifera: A Scoping Review. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2025.

Anexos

Figura 1. Resumo gráfico do delineamento experimental do presente estudo. Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da Opuntia cochenillifera, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 2. Imagens representativas da massa corporal (A) e das diferenças estatísticas entre os grupos (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa

Figura 3. Ingestão alimentar (A) e ingestão energética (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 4. Fotomicrografias do fígado. Observar micro (setas) e macro (asteriscos) esteatose com infiltrado inflamatório (retângulo pontilhado) no grupo HF. O EOC reverteu essas alterações histológicas no grupo HFP. Grupos: C (controle), CP (controle+EOC),

Figura 5. Dosagem bioquímica do triacilglicerol hepático (A). Análises estereológicas da densidade de volume de esteatose hepática (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia coch*

Figura 6. Análises ultraestruturais do fígado dos animais do grupo Controle (C). Observar núcleo (N), mitocôndrias (M), lisossomos (retângulos pontilhados), retículo endoplasmático rugoso (RER) (setas vermelhas) e cisternas do complexo de Golgi (setas ama

Figura 7. Análises ultraestruturais do fígado dos animais do grupo High-fat (HF). Notar núcleo (N) com pontos de cromatina condensada (setas verdes), mitocôndrias (M) com rarefação, desarranjo das cristas e cristólise, retículo endoplasmático rugoso com d

Figura 8. Análises ultraestruturais do fígado dos animais do grupo High-fat+EOC (HFP). Verificar hepatócitos com núcleo (N) de volume, contorno (membrana nuclear) e cromatina regulares, mitocôndrias (M) íntegras, com membrana externa e cristas preservadas

Figura 9. Resumo gráfico dos principais resultados encontrados neste estudo. Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

CÓDIGO: SB1374

AUTOR: DANIELLE BORGES BENTO DE OLIVEIRA

COAUTOR: SILVANA MARIA ZUCOLOTTO LANGASSNER

COAUTOR: FABIANE FERREIRA MARTINS

COAUTOR: JOSE BRICIO ARAUJO LOPES

COAUTOR: GRAZIELE DOMINGOS SILVA

COAUTOR: EMANUELLA DE ARAGÃO TAVARES

ORIENTADOR: CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

TÍTULO: ANÁLISE DO REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO MARROM EM CAMUNDONGOS OBESOS TRATADOS COM O EXTRATO DA NOPALEA COCHENILLIFERA (L.)

Resumo

A obesidade é um atual problema de saúde pública que gera doenças cardiovasculares, diabetes e disfunções no tecido adiposo marrom (TAM). O extrato da *Opuntia cochenillifera* (EOC) apresenta propriedades anti-hiperglicemiante, antioxidante e anti-inflamatória, emergindo como um agente promissor para o tratamento da obesidade e de seus desfechos no TAM. Neste estudo foram utilizados 40 camundongos (C57BL/6) divididos em 2 grupos: Controle (C) (n=20, dieta normocalórica) e High-fat (HF) (n=20, dieta hiperlipídica). Após 12 semanas, os animais foram redistribuídos em 4 grupos (n=10) de acordo com os tratamentos: C, C+EOC (CP), HF e HF+EOC (HFP), os quais seguiram por mais 8 semanas. Foi realizada a termografia e os animais foram sacrificados, o TAM foi dissecado e seguiu para análises de microscopia de luz e de biologia molecular. O EOC apresentou efeito antiobesogênico e anorexígeno nos grupos tratados. A termografia indicou que o EOC recuperou a temperatura do TAM, revelando potencial termogênico. O EOC reverteu a hipertrofia e o whitening (embranquecimento), restaurando a citoarquitetura dos adipócitos. Os genes relacionados à integridade mitocondrial e à termogênese (Opa-1, Pgc1- α , β 3-Ar e Ucp-1) apresentaram expressão reduzida no grupo HF e foram restaurados no grupo HFP, enquanto o TNF- α aumentou no grupo HF e reduziu no grupo HFP. Assim, o tratamento com

o EOC reverteu a obesidade, reduziu a inflamação, restaurou a função mitocondrial e a termogênese.

Palavras-chave: Obesidade. *Opuntia cochenillifera*. TAM. Termogênese.

TITLE: Evaluation of Brown Adipose Tissue Remodeling in Obese Mice Treated with *Opuntia cochenillifera* (L) Extract

Abstract

Obesity is a current public health problem that leads to cardiovascular disease, diabetes, and brown adipose tissue (BAT) dysfunction. *Opuntia cochenillifera* extract (EOC) exhibits antihyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory properties, emerging as a promising agent for the treatment of obesity and its outcomes in BAT. This study involved 40 mice (C57BL/6) divided into two groups: Control (C) (n=20, normocaloric diet) and High-fat (HF) (n=20, high-fat diet). After 12 weeks, the animals were redistributed into four groups (n=10) according to the treatments: C, C+EOC (CP), HF, and HF+EOC (HFP), which were followed for an additional 8 weeks. Thermography was performed, and the animals were sacrificed. The BAT was dissected and submitted for light microscopy and molecular biology analyses. EOC showed antiobesogenic and anorectic effects in the treated groups.

Thermography indicated that EOC restored the temperature of the BAT, revealing thermogenic potential. EOC reversed hypertrophy and whitening, restoring adipocyte cytoarchitecture. Genes related to mitochondrial integrity and thermogenesis (Opa-1, Pgc1- α , β 3-Ar, and Ucp-1) showed reduced expression in the HF group and were restored in the HFP group, while TNF- α increased in the HF group and decreased in the HFP group. Thus, treatment with EOC reversed obesity, reduced inflammation, and restored mitochondrial function and thermogenesis.

Keywords: Obesity. *Opuntia cochenillifera*. BAT. Thermogenesis.

Introdução

1. Introdução

A prevalência crescente da obesidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento vem sendo considerada uma pandemia global, cuja patogênese envolve a instalação da síndrome metabólica (SM), caracterizada por doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e esteatose hepática (1, 2). Entre os múltiplos fatores etiológicos da obesidade, destacam-se as mudanças do comportamento alimentar e do estilo de vida, principalmente pelo maior consumo de alimentos ultraprocessados associado ao sedentarismo (3).

O ganho de peso excessivo gera hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos brancos, alterações no perfil de secreção das adipocinas, resistência à insulina, ativação das células imunes residentes no tecido adiposo, resultando em inflamação crônica de baixo grau (4, 5). A recente descoberta de que o tecido adiposo marrom (TAM) continua ativo em adultos saudáveis fez com que estudos experimentais que investigassem o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade ganhassem grande relevância científica (6, 7).

O TAM é composto por adipócitos multiloculares, cujo núcleo é esférico, centralizado e o citoplasma é preenchido por inúmeras mitocôndrias, o que confere a ele a cor amarronzada. O TAM é reconhecido pela sua capacidade de aumentar o gasto energético através da oxidação de ácidos graxos, processo conhecido como termogênese, o qual dissipa energia na forma de calor (8). Nesse contexto, a proteína desacopladora 1 (UCP1) é um alvo fundamental para a ativação e a manutenção da termogênese, além de ser o principal marcador dentro da assinatura molecular do TAM (9).

A UCP1 é localizada na membrana mitocondrial interna atuando como um canal de próton que descarrega o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante o ciclo de Krebs, desviando-os do complexo F1F0 (ATP sintase), impedindo a síntese de ATP e permitindo que a energia se dissipe sob a forma de calor (10). A termogênese é iniciada através de estímulos simpáticos a receptores adrenérgicos (especialmente dos receptores beta-3 e beta-1). Em seguida, inicia-se uma cascata de reações que se seguem com o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), ativação da proteína cinase A dependente de AMPc (PKA) e indução da lipólise. Os ácidos graxos livres (AGLs), por sua vez, ativam uma série de marcadores que levam à ativação da UCP1 com aumento na oxidação dos AGLs e liberação de calor (11).

Recentemente, estudos experimentais mostraram que a obesidade resulta em remodelamento adverso e hipóxia funcional do TAM, desencadeando o embranquecimento (whitening) dos adipócitos marrons com redução da termogênese e aumento no armazenamento de lipídios, fatores que colaboram para o agravamento da síndrome metabólica (12, 13).

No sentido de propor uma estratégia para conter as alterações do TAM na obesidade, o extrato da *Opuntia cochenillifera* (EOC) (*Nopalea cochenillifera*) emerge como uma abordagem terapêutica promissora. O EOC apresenta grande quantidade de compostos bioativos, entre eles, destacam-se os polifenóis, os quais apresentam efeitos benéficos no metabolismo e atividade anti-inflamatória (14). Em modelo de obesidade, o EOC reduziu a adiposidade, melhorou o perfil lipídico e recuperou a resistência à insulina. Em modelo de colite induzida, o EOC atenuou a expressão de citocinas inflamatórias e aliviou o estresse oxidativo (15). Apesar desses resultados, não há estudos que relatem a ação do EOC no remodelamento adverso do TAM dentro do cenário da obesidade.

Metodologia

2. Metodologia

Animais e dietas

Quarenta camundongos (C57BL/6J) machos de três meses de idade (CEUA nº 067/2023) foram obtidos do Biotério do Instituto do Cérebro da UFRN. Os camundongos permaneceram mantidos no Biotério da Farmacologia da UFRN em condições controladas de temperatura e umidade ($60 \pm 10\%$), com livre acesso à água e à dieta, em caixas “pathogen free”. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão para roedores (C, n=20, 10% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 76% sob a forma de carboidratos = 15 kJ/g de dieta), ou dieta rica em lipídeos (HF, n=20, 50% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 36% sob a forma de carboidratos, = 21 kJ/g de dieta) por 12 semanas. Após, de acordo com os tratamentos, os grupos foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos por mais oito semanas:

1- Grupo controle (C, n=10), dieta controle ao longo de todo experimento, sem tratamento;

- 2- Grupo controle + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (CP, n=10), dieta controle acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal;
- 3- Grupo high-fat (HF, n=10), dieta HF (50% de lipídios) ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- 4- Grupo high-fat + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (HFP, n=10), dieta HF (50% de lipídios) acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal.

O extrato da *O. cochenillifera* foi fornecido em parceria com o Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Bioativos da UFRN, o qual realizou o isolamento e a caracterização fitoquímica de acordo com protocolos já publicados pelo grupo (14, 15). A concentração de 200mg/kg de massa corporal foi usada com base em respostas anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato da *O. cochenillifera* em modelos experimentais (14, 15). Todos os procedimentos relacionados à experimentação animal abordados neste estudo foram realizados de acordo com as recomendações do “National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996) (16). As dietas experimentais (Tabela 1) foram elaboradas pela empresa PragSoluções Biociências (Jauá-SP) seguindo as diretrizes do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (17). A Figura 1 resume o delineamento experimental descrito acima.

Massa corporal, ingestão alimentar e energética

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente (segunda-feira, 14:00h pm) em balança de precisão 0,01 g (Shimadzu, BL-3200H). A ingestão alimentar foi avaliada diariamente (14:30h pm) através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi calculada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias foi convertido para quilojoules (kJ), medida universal de energia.

Termografia

A temperatura do TAM foi aferida na última semana experimental através de imagens termográficas obtidas da região subescapular dos animais (n=5) realizadas com uma câmera termográfica (FLIR C2, Oregon, EUA).

Sacrifício

Ao final do protocolo experimental, os camundongos foram mantidos em jejum por seis horas e logo após anestesiados profundamente com Cloridrato de Ketamina 5% (0,15ml/100g) e Xilazina 2% (0,15 ml/100g). Uma incisão transversa foi realizada no dorso, na região subescapular, e o TAM foi cuidadosamente dissecado, removido, pesado e fixado em formalina de Millonig 10% para documentação macroscópica, para técnicas de microscopia de luz (n=5) e congelado a -80°C para análises moleculares (n=5).

Análises Morfológicas

Após a dissecação, o TAM seguiu para a fixação por 48 horas em formalina de Millonig. Em seguida, foi realizada a desidratação em graduações crescentes de etanol, a diafanização em xilol, a impregnação em parafina e a inclusão em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, EUA). Dos blocos foram obtidos cortes de 5 µm que foram depositados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H.E). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Optika B383, Itália).

Análise estereológica (Densidade numérica de núcleos por área/Qa)

Imagens digitais do TAM (50 por grupo/n=5) foram obtidas em campos microscópicos aleatórios e não consecutivos. A fim de estimar indiretamente a densidade numérica de adipócito marrom por área, foi realizada a densidade numérica de núcleos por área (QA), uma vez que o adipócito marrom é uma célula mononucleada. O QA foi obtido pela divisão do número total de núcleos contados na área teste, à exceção dos que tocam a linha proibida, pela área teste (em µm²), com o emprego do software STEPanizer (www.stepanizer.com), versão beta 0.28 (13).

PCR quantitativo em tempo real (expressão gênica)

O RNA total foi extraído do TAM (30 mg) utilizando 700µl de trizol (Invitrogen, USA). A concentração de RNA foi determinada através de espectrometria utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliqotado e a DNase I acrescentada. O cDNA foi sintetizado utilizando Oligo (dT) e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, USA) para RNAm. Os primers foram produzidos utilizando o software online Primer3. A beta-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados. A razão de expressão relativa de mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$

onde $-\Delta CT$ representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes-alvo e o controle endógeno.

Genes Alvo: $\beta 3ar$, $Ucp1$, $Pgc1$ -alfa, $Opa-1$ (função mitocondrial e termogênese) e TNF -alfa (inflamação).

3. Análise estatística

As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste de Dunnett T3, pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos foi utilizado o índice de significância com $p < 0,05$ (GraphPad Prism 9.5, EUA).

Resultados e Discussões

4. Resultados e Discussão

Durante o experimento, conforme esperado, a dieta hiperlipídica demonstrou ter significativo efeito obesogênico (18), levando o grupo HF a um aumento de 73% ($p < 0,0001$) na massa corporal quando comparado ao grupo controle (C). Em contrapartida, o tratamento com o extrato da *O. cochenillifera* foi altamente eficaz, resultando em uma redução de 24% ($p < 0,0001$) na massa corporal do grupo HFP em relação ao grupo HF. Além disso, o extrato também causou uma diminuição no peso do grupo CP, mesmo com a dieta padrão (-8,6%, $p < 0,001$) em relação ao grupo C. Esses resultados indicam que o extrato da *O. cochenillifera* possui propriedades antiobesogênicas que funcionam tanto em dietas hiperlipídicas quanto em dietas normocalóricas (Figura 2).

Em relação ao comportamento alimentar, considerando a ingestão alimentar, não foi observada diferença significativa entre os grupos HF e C (+2%; ns), sugerindo que o aumento de massa corporal no grupo high-fat não esteve associado ao volume de alimento consumido, mas sim à elevada densidade calórica da dieta (19). Esse achado pode ser comprovado ao observar que a ingestão energética foi 40% ($p < 0,0001$) maior no grupo HF em relação ao C. Em comparação ao grupo HF, o grupo HFP apresentou redução de 26% ($p < 0,0001$) na ingestão alimentar e de 28% ($p < 0,0001$) na ingestão energética, mostrando, mais uma vez, que o extrato da *O. cochenillifera* exerceu efeito modulador sobre o consumo alimentar,

contribuindo para a homeostase energética. No grupo CP, a ingestão alimentar e energética foram respectivamente: 7,4% ($p<0,001$) e 14% ($p<0,0001$) menores do que no grupo C, indicando o potencial anorexígeno da *O. cochenillifera* mesmo em indivíduos não obesos (Figura 3).

As análises termográficas mostram redução na temperatura do TAM dos animais obesos quando comparados ao grupo C (-12%, $p<0.0001$) indicando falhas na termogênese. O grupo HFP apresentou recuperação da temperatura do TAM (+12%, $p<0.001$) sugerindo potencial termogênico do extrato da *O. cochenillifera* (Figura 4).

Em paralelo, as análises macroscópicas revelaram que a dieta hiperlipídica gerou hipertrofia (+72%, $p<0.0001$) e embranquecimento do TAM no grupo HF e que o extrato da *O. cochenillifera* reverteu esses efeitos (-28%, $p<0.001$) (Figura 5).

No que se refere às características histológicas do TAM, os adipócitos apresentam reserva lipídica multilocular e maior quantidade de mitocôndrias em seu citoplasma, denotando maior capacidade termogênica. O grupo HF apresentou aumento pronunciado no acúmulo de gotículas de gordura quando comparado ao grupo C, de forma a dificultar a delimitação dos adipócitos marrons multiloculares que, frequentemente, passaram a lembrar um padrão de armazenamento lipídico de um adipócito branco, fenômeno denominado whitening (embranquecimento). Esse fenômeno ocorre em resposta à alta demanda energética da dieta hiperlipídica, ocasionando danos nas mitocôndrias, redução na beta-oxidação lipídica e declínio da termogênese. Como consequência, os lipídios não oxidados se acumulam e se fundem no citoplasma dos adipócitos (20, 21). Contrariamente, no grupo HFP foi observada redução expressiva no acúmulo de lipídios no interior dos adipócitos marrons, retomando o volume citoplasmático e a citoarquitetura semelhante a do grupo C, o que sugere aumento na atividade termogênica desses animais (Figura 6A).

As análises quantitativas da densidade numérica de núcleos por área (Qa) confirmam os achados histológicos. Quando comparado ao grupo C, o grupo HF exibiu redução significativa (-312%, $p<0.0001$) no Qa, comprovando que o whitening aumenta o tamanho das gotículas lipídicas nos adipócitos marrons promovendo o distanciamento entre essas células. O grupo HFP mostrou recuperação do Qa (+241%, $p<0.0001$) sinalizando que o tratamento com a *O. cochenillifera* foi capaz de reverter o whitening resgatando as características histológicas e termogênicas do TAM dos animais obesos (Figura 6B).

A expressão dos genes Opa-1 e do Pgc1- α foi comprometida no grupo HF (-66%, $p < 0.05$ e -60%, $p < 0.001$, respectivamente). Esses genes estão relacionados com a regulação da integridade, da saúde mitocondrial e com a beta-oxidação lipídica (22, 23). O extrato da *O. cochenillifera* recuperou a expressão desses genes (+220%, $p < 0.0001$ e +634%, $p < 0.0001$, respectivamente). Semelhantemente, a expressão dos genes envolvidos com a termogênese $\beta 3$ -Ar e Ucp-1 foi reduzida no grupo HF (-58%, $p < 0.05$ e -67%, $p < 0.001$) e aumentada no grupo HFP (+613%, $p < 0.001$ e +1043% $p < 0.001$). Esses resultados dialogam com os resultados das análises termográficas, macroscópicas e histológicas, convergindo na direção de que a dieta hiperlipídica causou o whitening com prejuízos mitocondriais e falhas na termogênese; e que o extrato da *O. cochenillifera* mitigou essas alterações e exerceu efeitos termogênicos. Adicionalmente, a expressão do gene inflamatório TNF-alfa foi elevada no TAM dos animais obesos (+243%, $p < 0.001$) e o tratamento com a *O. cochenillifera* exerceu ação anti-inflamatória (-190%, $p < 0.0001$) (Figura 7).

Essa modulação positiva que o extrato da *O. cochenillifera* promoveu no remodelamento do TAM dos camundongos obesos pode ser explicada devido a presença de moléculas bioativas em sua composição, dentre as quais se destacam a quercetina, o kampferol e a rutina (24). Estudos prévios mostram que essas moléculas exibem relevantes propriedades farmacológicas, incluindo ação anti-inflamatória, gastroprotetiva, antioxidante e anti-hiperglicêmica, com efeitos benéficos em vários mecanismos celulares e metabólicos (14, 15, 25).

Conclusão

5. Conclusões

A dieta hiperlipídica induziu o remodelamento adverso do TAM, gerando o whitening com falhas mitocondriais, perda de função termogênica e inflamação. Os resultados mostram que o extrato da *Opuntia cochenillifera* na concentração de 200mg/kg de massa corporal reverteu a obesidade e restaurou o metabolismo energético, o whitening, as disfunções mitocondriais, a termogênese e a inflamação no TAM dos camundongos obesos. Esses achados indicam que o extrato da *O. cochenillifera* é um agente terapêutico promissor para o tratamento da obesidade com relevante potencial termogênico. Ademais, esses resultados colocam a *O.*

cochenillifera em evidência, valorizando essa planta nativa da biodiversidade do estado do Rio Grande do Norte.

É importante mencionar que os resultados aqui apresentados são parte de um projeto de mestrado em execução, e que as análises ultraestruturais do TAM e de expressão de proteínas relacionadas à inflamação e à termogênese estão em andamento a fim de consolidar esses achados iniciais.

Referências

6. Referências

1. Bluher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(5):288-98.
2. Speakman JR, Sorensen TIA, Hall KD, Allison DB. Unanswered questions about the causes of obesity. *Science.* 2023;381(6661):944-6.
3. Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health-Processing or Nutrient Content? *Curr Obes Rep.* 2017;6(4):420-31.
4. Sahu B, Bal NC. Adipokines from white adipose tissue in regulation of whole body energy homeostasis. *Biochimie.* 2023;204:92-107.
5. Tong X, Wei L, Wang T, Han R. Remodeling of Macrophages in White Adipose Tissue under the Conditions of Obesity as well as Lipolysis. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:9980877.
6. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(2):E444-52.
7. Trayhurn P. Brown Adipose Tissue-A Therapeutic Target in Obesity? *Front Physiol.* 2018;9:1672.
8. Martins FF, Martins BC, Teixeira AVS, Ajackson M, Souza-Mello V, Daleprane JB. Brown Adipose Tissue, Batokines, and Bioactive Compounds in Foods: An Update. *Mol Nutr Food Res.* 2024;68(6):e2300634.

9. Martins FF, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue as an endocrine organ: updates on the emerging role of batokines. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2023;44(2):219-27.
10. Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 2019;29(1):27-37.
11. Blondin DP, Nielsen S, Kuipers EN, Severinsen MC, Jensen VH, Miard S, et al. Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by beta2-AR Stimulation. *Cell Metab.* 2020;32(2):287-300 e7.
12. Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 2015;129(11):933-49.
13. Rangel-Azevedo C, Santana-Oliveira DA, Miranda CS, Martins FF, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. *J Nutr Biochem.* 2022;105:109002.
14. Tavares EA, Guerra GCB, da Costa Melo NM, Dantas-Medeiros R, da Silva ECS, Andrade AWL, et al. Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of Phenolic-Rich Extract from *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae): A Preclinical Study on the Prevention of Inflammatory Bowel Diseases. *Plants (Basel).* 2023;12(3).
15. da Silva ECS, Bernardo Guerra GC, de Araujo ERD, Schlamb J, da Silva VC, de Aragao Tavares E, et al. Phenolic-rich extract of *Nopalea cochenillifera* attenuates gastric lesions induced in experimental models through inhibiting oxidative stress, modulating inflammatory markers and a cytoprotective effect. *Food Funct.* 2023;14(7):3242-58.
16. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J.* 1997;38(1):41-8.
17. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):838S-41S.
18. Martins FF, Santos-Reis T, Marinho TS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Hypothalamic anorexigenic signaling pathways (leptin, amylin, and proopiomelanocortin) are semaglutide (GLP-1 analog) targets in obesity control in mice. *Life Sci.* 2023;313:121268.

19. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Santana-Oliveira DA, Fernandes-da-Silva A, Brito GC, Martins FF, Souza-Mello V. Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice. *J Am Nutr Assoc.* 2023;42(5):435-44.
20. Lopez-Vicchi F, De Winne C, Ornstein AM, Sorianello E, Toneatto J, Becu-Villalobos D. Severe Hyperprolactinemia Promotes Brown Adipose Tissue Whitening and Aggravates High Fat Diet Induced Metabolic Imbalance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:883092.
21. Ziqubu K, Dlodla PV, Mthembu SXH, Nkambule BB, Mabhida SE, Jack BU, et al. An insight into brown/beige adipose tissue whitening, a metabolic complication of obesity with the multifactorial origin. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1114767.
22. Chen L, Liu T, Tran A, Lu X, Tomilov AA, Davies V, et al. OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(5):e003012.
23. Qian L, Zhu Y, Deng C, Liang Z, Chen J, Chen Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):50.
24. Nunes AAC. Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Prospection of *Nopalea cochenillifera*: A Scoping Review. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2025.
25. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(3):325-48.

Anexos

Figura 1. Resumo gráfico do delineamento experimental do presente estudo. Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 2. Imagens representativas da massa corporal (A) e das diferenças estatísticas entre os grupos (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa

Figura 3. Ingestão alimentar (A) e ingestão energética (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 4. Análises termográficas do tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 5. Análises macroscópicas e de massa do tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 6. Análises histológicas e estereológicas do tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 7. Análises da expressão de genes relacionados à função mitocondrial, à termogênese e à inflamação no tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia co*

Figura 8. Resumo gráfico dos principais resultados encontrados neste estudo. Abreviatura:
EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

CÓDIGO: ET0010

AUTOR: MARCOS PAULO BARROS VIANA

COAUTOR: CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA

COAUTOR: JUSSIER DE OLIVEIRA VITORIANO

COAUTOR: OTÁVIO BERENGUEL

COAUTOR: CLODOMIRO ALVES JUNIOR

COAUTOR: GABRIEL DE MOURA MARTINS

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PLASMA ATMOSFÉRICO FRIO APLICADO EM SUPERFÍCIE DE TITÂNIO MODIFICADAS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA.

Resumo

A integração entre biomateriais e tecidos biológicos depende das características físico-químicas da superfície do implante. Embora o plasma atmosférico frio (CAP) seja uma técnica promissora para funcionalização de superfícies de titânio, seu efeito e durabilidade pós-tratamento ainda não estão completamente elucidados. Portanto, este trabalho investigou a caracterização das modificações superficiais promovidas pelo CAP em discos de titânio. Após preparo, as amostras de discos de titânio Grau II foram submetidas ao tratamento com CAP e avaliadas em intervalos de tempo (72h, 96h e 120h), bem como o grupo controle (polido). A análise por AFM-IR revelou aumento significativo dos grupos Ti-OH, indicando maior hidrofilicidade; a topografia por AFM mostrou aumento da rugosidade nanométrica, favorecendo a adesão celular. A espectrometria óptica de emissão confirmou a presença de espécies reativas no jato de plasma. Além disso, as propriedades se mantêm estáveis até 72 h, decaindo gradativamente após esse período. Conclui-se que a condição de CAP aplicada promove modificações químicas e topográficas benéficas com estabilidade da integridade até 72h sendo recomendada para a aplicação biológica

Palavras-chave: Modificação superficial. Biomaterial. Biocompatibilidade. Plasma.

TITLE: PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA APPLIED TO MODIFIED TITANIUM SURFACES FOR BIOLOGICAL APPLICATION.

Abstract

The integration between biomaterials and biological tissues depends on the physicochemical properties of the implant surface. Although cold atmospheric plasma (CAP) is a promising technique for the functionalization of titanium surfaces, its effects and post-treatment

durability are not yet fully understood. Therefore, this study investigated the characterization of surface modifications promoted by CAP on titanium discs. After preparation, Grade II titanium disc samples were treated with CAP and evaluated at different time intervals (72h, 96h and 120h), as well as a control group (polished). AFM-IR analysis revealed a significant increase in Ti–OH groups, indicating enhanced hydrophilicity; AFM topography showed an increase in nanometric roughness, which favors cell adhesion. Optical emission spectroscopy confirmed the presence of reactive species in the plasma jet. Furthermore, the properties remained stable for up to 72 hours, gradually declining after this period. It was concluded that the applied CAP condition promotes beneficial chemical and topographical modifications, with integrity remaining stable for up to 72 hours, making it suitable for biological applications.

Keywords: Surface modification. Biomaterial. Biocompatibility. Plasma

Introdução

A capacidade de integração tecidual com o biomaterial aplicado está associada com a qualidade na formação de uma matriz óssea e extracelular propícia para o remodelamento cicatricial (Jackson et al., 2012). Para tanto, a atividade tecidual e extracelular requer a coordenação de diversos grupos celulares como os fibroblastos e os osteoblastos (Singer, Clark, 1999; Balbino et al., 2005; Tottoli et al., 2020). Paralelamente à atividade dos fibroblastos e dos osteoblastos, a utilização de biomateriais, como ligas metálicas e cerâmicas, tem se mostrado eficaz na restauração de tecidos e no favorecimento do processo de cicatrização (Kulkarni et al., 2015). Entre os biomateriais, o titânio é amplamente utilizado devido às suas características hemo e biocompatíveis, que proporcionam uma boa interação entre o material e as células responsáveis pela reparação tecidual (Cacopardo, 2022). A eficácia dos implantes de titânio pode ser otimizada pela modificação de sua superfície, sendo o tratamento com plasma atmosférico frio (CAP) uma técnica que se destaca nesse contexto (Winter; Brandenburg; Weltmann, 2015).

O tratamento com plasma atmosférico a frio (CAP) modifica as propriedades superficiais do titânio, incluindo sua composição química. Esse tratamento vem ganhando destaque devido ao baixo custo, é uma fonte de energia limpa de baixo impacto ambiental e de fácil aplicação em temperatura ambiente. O CAP é gerado ao aplicar um campo elétrico que cria uma diferença de potencial, utilizando gases inertes como hélio e argônio, que proporcionam maior estabilidade na geração do plasma, garantindo uma aplicação eficiente (Bernhardt et al., 2019; Alves Jr., 2020).

Não obstante, apesar da presença de trabalhos que comprovam a capacidade do CAP promover alterações na composição química das superfícies metálicas (Modic et al., 2019; Moura, CEB et al., 2019; Moura et al., 2024), com o tempo as novas características superficiais construídas após o tratamento podem sofrer um retorno gradual às suas propriedades iniciais. Esse retorno pode aumentar o tempo de interação entre o biomaterial e a matriz extracelular, reduzindo a eficácia dentro das aplicabilidades biológicas pelo uso do titânio tratado (Bernhardt et al., 2019). Assim, tornou-se importante investigar a durabilidade das propriedades adquiridas após o tratamento superficial com CAP.

Metodologia

Os discos de titânio (Grau II) foram submetidos a um processo de lixamento e polimento tanto para o grupo controle quanto para os discos submetidos a tratamento. Em seguida, as amostras foram limpas com detergente enzimático e água destilada, seguidas de secagem antes da aplicação do tratamento com CAP. O plasma atmosférico foi aplicado utilizando um dispositivo com 13 Kv de tensão e frequência de 600Hz, com fluxo de 1 L/min de gás hélio sobre as amostras, cobrindo toda a superfície do material em múltiplos pontos (Karla et al., 2020; Martins et al., 2022).

A caracterização superficial dos discos incluiu a avaliação da rugosidade superficial por meio do AFM (ParkSystems NX10). Já a composição química foi analisada por AFM-Infravermelho (Bruker NanoIR2-s), ambos presentes no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Engenharia de Materiais (CNPEM).

Resultados e Discussões

A análise da espectroscopia AFM-IR apresentou um aumento significativo na intensidade de picos entre 1000 e 1100 cm^{-1} nas amostras tratadas no tempo de X a Z em comparação com os discos não tratados, compatíveis com as vibrações de ligações Ti-OH (Xie et al., 2005). Essa modificação indica a formação de hidróxido de titânio com carga negativa (Nox -1), e isso pode contribuir com o aumento da hidrofilicidade e criação de um microambiente favorável à deposição de íons cálcio que apresentam número de oxidação +2. Essa maior eletropositividade do cálcio permite uma melhor eletroafinidade com a superfície tratada, garantindo uma relação fundamental para o processo de remodelamento ósseo (Moura, CEB et al., 2019). Além disso, a presença de grupos Ti-OH está associada à redução da adesão bacteriana, contribuindo para menor risco de infecção e rejeição do implante (Michelle et al., 2016).

A análise topográfica por AFM, por sua vez, revelou que o CAP promoveu um aumento da rugosidade superficial até 72 horas do tratamento, em comparação ao grupo controle. Essa nova conformação nanotopográfica pode aumentar a área de contato entre o biomaterial e as células para favorecer a adesão e a liberação de fatores de crescimento (Borges et al., 2012; Deligianni et al., 2000; Davies, 2003).

No entanto, observou-se que os efeitos do tratamento com CAP não são permanentes. A comparação dos espectros ao longo do tempo (72 h, 96 h e 120 h) demonstrou uma redução gradual na intensidade das ligações Ti-OH e um possível retorno das características iniciais da superfície. Essa análise comparativa permitiu construir um melhor entendimento acerca da durabilidade do filme, bem como perceber qual é o momento crítico para sua utilização desse protocolo de plamas na área biomédica. Portanto, os dados sugerem que a aplicação clínica do CAP deve ser realizada com atenção ao tempo entre o tratamento e a implantação, sendo as primeiras 72 horas o período ideal para preservar a estabilidade química e topográfica da superfície funcionalizada.

Conclusão

Os resultados demonstram que o tratamento com plasma atmosférico frio (CAP) é uma estratégia eficaz para a modificação superficial de biomateriais, promovendo a formação de

grupos hidroxilas e a parcial redução de TiO_2 , o que resulta em aumento da hidrofilicidade da superfície do titânio. A manutenção dessas nanotográficas e do filme por até 72 horas após o tratamento destaca a relevância do controle dos parâmetros do CAP e do tempo de uso clínico para otimizar a interação célula-implante.

Referências

Alves Junior, C.. (2020). Plasma frio atmosférico – novas oportunidades de pesquisa numa plataforma versátil e portadora de futuro. *Matéria* (rio De Janeiro), 25(4), e–12912.

Balbino, Carlos Alberto; Pereira, Leonardo Madeira; Curi, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: Uma revisão. *Revista brasileira de Ciências farmacêuticas*. Jan/mar2005.

BERNHARDT, T. et al. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1–10, 3 set. 2019

BORGES, A. M. G. et al. Polymer films with surfaces unmodified and modified by non-thermal plasma as new substrates for cell adhesion. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 3, p. 1315–1324, 13 dez. 2012.

Daviss B. 2005. Growing pains for metabolomics. *The Scientist* 19: 25–28. Doumanidis H. 2002. The nanomanufacturing programme at the National Science Foundation. *Nanotechnology* 13: 248–252.

DELIGIANNI, D. D. et al. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, v. 22, n. 1, p. 87–96, jan. 2000

EDUARDO, C. et al. Effect of plasma-nitrided titanium surfaces on the differentiation of pre-osteoblastic cells. *Artificial Organs*, v. 43, n. 8, p. 764–772, 19 fev. 2019.

Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2018). Biomaterials, definition, overview. In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 85–98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>

Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Res Ther*. 2012 May 31;3(3):20. doi: 10.1186/scrt111. PMID: 22668751; PMCID: PMC3392767.

Kulkarni, M., Mazare, A., Gongadze, E., Perutkova, Kralj-Iglic, V., Milošev, I., Schmuki, P., Iglič, A., & Mozetič, M. (2015). Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*, 26(6).

Martins GM, da Silva Braz JKF, de Macedo MF, de Oliveira Vitoriano J, Alves Júnior C, Santos CS, Feijó FMC, de Oliveira MF, de Moura CEB. Enhancing Titanium Disk Performance through In-Pack Cold Atmospheric Plasma Treatment. *ACS Biomater Sci Eng*. 2024 Mar 11;10(3):1765-1773. doi: 10.1021/acsbiomaterials.3c01388. Epub 2024 Feb 15. PMID: 38357873.

MICHELLE et al. Minimizing *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to titanium surfaces by a plasma nitriding process. *AIMS biophysics*, v. 4, n. 1, p. 19–32, 1 jan. 2016

MODIC, M. et al. Targeted plasma functionalization of titanium inhibits polymicrobial biofilm recolonization and stimulates cell function. *Applied Surface Science*, v. 487, p. 1176–1188, set. 2019

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. *New Engl. J. Med.*, 341, p. 738–746, 1999.

WINTER, J.; BRANDENBURG, R.; WELTMANN, K-D. Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions. *Plasma Sources Science and Technology*, v. 24, n. 6, p. 064001, 8 out. 2015

YAN, 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, 31 dez. 2021.

XIE, Y. et al. Improvement of surface bioactivity on titanium by water and hydrogen plasma immersion ion implantation. *Biomaterials*, v. 26, n. 31, p. 6129–6135, nov. 2005

CÓDIGO: ET0975

AUTOR: LARISSA SIMOES DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

TÍTULO: O impacto do uso de diferentes escalas de pH sobre os parâmetros preditores da acidificação oceânica em recifes de corais

Resumo

A acidificação dos oceanos resulta da absorção de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico, reduzindo o pH da água em 0,1 unidade e alterando o equilíbrio químico e a saturação de carbonato de cálcio (Ω_{arag}) (Doney et al., 2009). Estimativas indicam que, até o fim do século XXI, o pH poderá diminuir em 0,3–0,4 unidades, aumentando em 150% a concentração de H^+ e reduzindo em 50% a disponibilidade de CO_3^{2-} , com impactos sobre recifes de corais. A medição do pH marinho enfrenta limitações metodológicas devido à força iônica. A escala NIST, baseada na NBS, pode não explicar a composição iônica (López et al., 2022). Assim, foram definidas outras medições: escala total (TOT) e escala água do mar (SWS). O uso do tampão TRIS em soluções que simulam a água do mar é importante para a quantificação do pH. A comparação entre as escalas NIST, SWS, TOT e TOTTRIS mostrou excelente correspondência ($r^2 = 0,95\text{--}0,99$), porém TOTTRIS apresentou valores inferiores ($\sim 0,2$ unidades). Maiores valores de pH foram observados no período seco para SWS, TOT e TOTTRIS, enquanto NIST não mostrou variação. A NIST foi a menos ajustada às condições da água do mar, SWS e TOT refletiram melhor a química do carbonato, e TOTTRIS apresentou maior sensibilidade sazonal. Os valores médios de Ω_{arag} foram de 3,8 (NIST), 4,1 (SWS), 4,0 (TOT) e 3,4 (TOTTRIS), com frequência de $\Omega_{\text{arag}} < 3$ variando de 1,6% (SWS) a 19,7% (TOTTRIS). Portanto, resultados evidenciam impactos do uso de diferentes escalas na avaliação da saúde recifal.

Palavras-chave: sistema carbonato; pH; aragonita; acidificação oceânica; corais

TITLE: The Impact of Using Different pH Scales on Predictive Parameters of Ocean Acidification in Reefs and Corals.

Abstract

Ocean acidification results from the absorption of atmospheric carbon dioxide (CO_2), decreasing seawater pH by 0.1 units and altering chemical equilibrium and calcium carbonate saturation (Ω_{arag}) (Doney et al., 2009). Estimates indicate that by the end of the 21st century, pH may decrease by 0.3–0.4 units, increasing H^+ concentration by 150% and reducing CO_3^{2-} availability by 50%, with consequent impacts on coral reefs. Seawater pH measurement faces methodological limitations due to ionic strength. The NIST scale, based on the NBS, may not accurately reflect ionic composition (López et al., 2022). Alternative measurements have therefore been defined: the total scale (TOT) and the seawater scale (SWS). The use of TRIS buffer in seawater-simulating solutions has proven important for pH quantification. Comparison among NIST, SWS, TOT, and TOTTRIS scales showed excellent correspondence ($r^2 = 0.95\text{--}0.99$), although TOTTRIS values were lower (~ 0.2 units). Higher

pH values were observed during the dry season for SWS, TOT, and TOTTRIS, whereas NIST showed no significant variation. NIST was the least adjusted to seawater conditions, SWS and TOT better reflected carbonate chemistry, and TOTTRIS exhibited greater seasonal sensitivity. Mean Ω_{arag} values were 3.8 (NIST), 4.1 (SWS), 4.0 (TOT), and 3.4 (TOTTRIS), with $\Omega_{\text{arag}} < 3$ ranging from 1.6% (SWS) to 19.7% (TOTTRIS). Therefore, the results highlight the impacts of using different pH scales on reef health assessment.

Keywords: carbonate system; pH; aragonite; ocean acidification; corals

Introdução

A acidificação dos oceanos (AO) é resultado do aumento da absorção de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico absorvido pelos oceanos, ocasionado por atividade humanas, como a queima de combustíveis fósseis, reduzindo o pH da água e promovendo um declínio de 0,1 unidade no pH do oceano alterando o equilíbrio químico e a saturação de carbonato de cálcio (Ω_{arag}) na água do mar (Doney et al., 2009). Ao longo do século XXI, estipula-se que a redução de 0,3 a 0,4 unidades no pH haja um aumento de 150% de íons hidrogênio (H^+), e uma diminuição de 50% na disponibilidade de íons carbonato (CO_3^{2-}) (Orr et al. 2005). À medida com que os íons de hidrogênio aumentam, eles afetam a química do carbonato da água do mar, o que, por sua vez, afeta a capacidade dos organismos de manter as estruturas do carbonato de cálcio (CaCO_3). Essa dinâmica pode impedir a capacidade dos organismos calcificadores de atingir a supersaturação (Suwa et al., 2014) e consequentemente levar à perda de habitat e biodiversidade em recifes. A imprecisão na medição do pH marinho é um desafio importante para estudos climáticos (Carter et al., 2024), pois representa uma questão metrológica complexa, devido à elevada força iônica da água do mar. Esse fator limita a aplicabilidade de medições convencionais de pH (Baucke, 2002; Buck et al., 2002). A escala de pH NIST é uma das mais comumente usadas em pesquisas laboratoriais, em função da praticidade e sua determinação, já que possui materiais de referência padrão para sua rastreabilidade (Bates e outros, 2014) em contrapartida, esse método tradicional baseado na escala NBS pode não explicar a composição iônica única da água do oceano e distinta dos tampões de calibração (López et al., 2022), baseando-se na atividade iônica do hidrogênio, enquanto que, em pesquisas de biogeoquímica marinha, exigem a determinação em termos de concentração destes íons (Zeebe; Wolf-Gladrow, 2001). Devido às incertezas do método, outras medições de pH foram definidas para as pesquisas em água do mar. Em estudos de acidificação oceânica, a escala de pH total (TOT), e a escala água do mar (SWS) são mais eficientes, estas incorporam íons adicionais de água do mar, fornecendo uma representação mais precisa do pH em ambientes marinhos (López et al., 2022). O uso do tampão 2-amino-2-Hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) em soluções que simulam a água do mar tem se mostrado uma estratégia importante para aprimorar a quantificação do pH. Esse modelo permite prever como mudanças na composição química influenciam o sistema, converter valores entre diferentes escalas de pH, reconhecer limitações da escala total e ainda fornecer suporte para a calibração de eletrodos, resultando em medições mais confiáveis (Clegg et al., 2022). O sistema carbonato é produto da reação química do CO_2 com a água do mar, levando à formação de ácido carbônico (H_2CO_3) que rapidamente se dissocia em íons bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}) e CO_2 dissolvido, liberando prótons H^+ (Reação 1).

$$\text{CO}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+ \text{ (Reação 1)}$$

A saturação de aragonita (Ω) é crucial para a calcificação porque indica a disponibilidade de íons carbonato necessários para que os organismos calcificadores construam suas estruturas de carbonato de cálcio. Níveis mais baixos de Ω devido à acidificação dos oceanos dificultam esse processo, afetando a saúde e a sobrevivência dos organismos (Amaya-Vías et al. 2023).

A escolha da escala de pH é essencial para avaliar a dinâmica do sistema carbonato e interpretação dos resultados sobre as condições ambientais para a calcificação. Este estudo investigou, pela primeira vez, se o uso de diferentes escalas de pH podem impactar negativamente a interpretação dos dados do sistema carbonato e das condições para a calcificação em recifes de corais.

Metodologia

2.1 Área de estudo e procedimentos de amostragem

Os Parrachos de Rio do Fogo estão localizados na Área de Proteção Ambiental dos Recifes de Corais (APARC) no estado do Rio Grande do Norte (RN) e estão situadas a aproximadamente 6 km da costa (Figura 1), caracterizados por recifes de coral e sedimentos biogênicos, os parrachos servem como habitats vitais para várias espécies marinhas, contribuindo para a biodiversidade e apoiando a pesca local (Araújo, 2014).

O estudo foi realizado a partir de seis expedições de campo. Considerando o período chuvoso de maio e agosto de 2024 e junho de 2025, enquanto o período seco abrange novembro de 2024 e fevereiro e abril de 2025. O delineamento amostral foi realizado em 18 pontos distribuídos em dois sistemas diferentes, onde 9 pontos foram coletados em Garças e 9 em rastro, organizado em três diferentes faces do recife: Borda externa (BE01, BE02, BE03) borda interna (BI01, BI02, BI03), centro (C01, C02, C03). As coletas de amostras de água de superfície e fundo foram realizadas a partir de mergulhos no baixamar, e armazenadas em frascos de polietileno e preservados com concentração de cloreto de mercúrio (HgCL₂), para a determinação de alcalinidade total. Um percentual das amostras de pH Total foram armazenadas em frascos de DBO de 50ml de forma cuidadosa para evitar a formação de bolhas no frasco e preservadas com HgCL₂. O pH NIST e variáveis físico-químicas foram medidas em campo através de sonda de multiparâmetros.

2.2 Análises de laboratório, cálculo do sistema carbonato e análise dos dados

O pH nist foi medido em dois momentos, em campo, a partir de eletrodo de vidro equipado a um equipamento que mede multi parâmetros, como pH, salinidade e temperatura e posteriormente em laboratório com o uso do ECOTitrator Methrom, calibrado a partir de soluções tampão de 4,0, 7,0 e 10,0 SpecSol IUPAC, com certificado e rastreabilidade do NIST. O pH_{Total} foi avaliado imediatamente após a chegada do campo ao laboratório em eletrodo de vidro com resolução 0,001 calibrado com solução tampão 2-amino-2-Hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS), segundo o método proposto por Paulsen e Dickson (2020). A calibração com o tampão TRIS levou em considerando a diferença do potencial do eletrodo de pH medido em milivolts (mV) e com a mudança de temperatura (C°), os resultados foram plotados em um gráfico de dispersão para gerar uma equação linear $y = ax + b$. O pH_{TOTTRIS} foi calculado utilizando um modelo termodinâmico que considera a temperatura, salinidade, e equação de calibração com o tampão TRIS (GRDAN; DUPONT, 2020). O pH_{Total} (TOT) e o pH_{água do mar} (SWS) foram calculados a partir de equações matemáticas propostas por Badocco et al. (2021), especificadas abaixo.

$$\text{pH TOT} = \text{pH NIST} - 0,10388 - 4,31 \times 10^{-5} \cdot \text{TS} - 3,633 \times 10^{-5} \cdot \text{T}^2 + 4,921 \times 10^{-5} \cdot \text{S}^2$$

$$\text{pH SWS} = \text{pH NIST} - 0,097733 - 4,1059 \times 10^{-5} \cdot \text{TS} - 3,5437 \times 10^{-5} \cdot \text{T}^2 + 4,941 \times 10^{-5} \cdot \text{S}^2$$

Ambos os pH na escala TOTTRIS > TOT > SWS usaram os valores de pH na escala NIST para calibração e plotagem nas equações. A alcalinidade total das amostras foi obtida através de titulação potenciométrica com HCL 0,1M através do método SOP03b (DICKSON et al., 2007), utilizando o titulador ECOTitrator Methrom. As concentrações CO₂ dissolvido e

saturação da aragonita foram calculados para cada uma das escalas: pH NIST>TOTTRIS>TOT>SWS, utilizando um modelo de associações iônicas de alcalinidade total (AT), o pH, a temperatura e salinidade a partir do programa CO2SYS.EXE (LEWIS; WALLACE, 1998).

A escala de pH TOTTRIS foi usada como variável independente e usada como referência, enquanto as demais escalas foram plotadas como variáveis dependentes em gráficos de regressão linear. A análise estatística de Modelos Lineares Mistos (MML) foi utilizada para identificar as diferenças para os níveis de pH e do estado da saturação da aragonita para cada uma das quatro escalas consideradas entre os períodos seco e chuvoso. Para avaliar a vulnerabilidade à acidificação e condições para calcificação foi utilizado o valor de saturação da aragonita $\geq 5,0$ para indicar condições favoráveis à calcificação ou $< 5,0$ para condições desfavoráveis à calcificação, segundo estabelecido por Leclercq et al. (2000).

Resultados e Discussões

A comparação entre as escalas de pH NIST, pH SWS, pH TOT e pH TOTTRIS mostraram uma excelente correspondência, com r^2 variando de 0,95 (pH NIST x TOTTRIS) a 0,99 (TOT x TOTTRIS) (Figura 2). Apesar disso, os níveis de pH TOTTRIS ($7,984 \pm 0,097$) foram inferiores às demais medições (e.g. $8,175 \pm 0,070$ para pH NIST; $8,076 \pm 0,071$ para pH SWS; e $8,066 \pm 0,071$ para pH TOT), com o padrão de valores: pH NIST > pH SWS > pH TOT > pH TOTTRIS (Figura 3). A maior diferença entre as médias foi encontrada entre a escala NIST e TOTTRIS, com resultados de TOTTRIS inferiores em cerca de 0,2 unidades. Avaliando a distribuição espaço-temporal para as quatro escalas de pH, foram observados maiores valores de pH no período seco em comparação com o período chuvoso para as escalas SWS, TOT e TOTTRIS ($p < 0,014$), enquanto a escala NIST não mostrou variação significativa entre os períodos ($p = 0,221$) (Figura 4). Esses resultados sugerem que a sensibilidade ao período depende do sistema de cálculo, sendo o TOTTRIS, TOT e SWS mais sensíveis nesse sentido. Na época de menor índice de precipitações, existe uma maior incidência de luz solar e também menos escoamento das águas doces no oceano, aumentando a taxa de fotossíntese pelos produtores primários, com consequente aumento dos níveis de pH através do consumo de CO₂ (Chagas & Suzuki, 2005). Por outro lado, o período chuvoso traz um aumento de nutrientes e de matéria orgânica de origem alóctone, aumentando a taxa de decomposição, elevando os níveis de CO₂ e deixando o pH mais baixo (Ressurreição et al., 1996).

Para a aplicabilidade das diferentes escalas de pH, a escala NIST mais regularmente utilizada em laboratórios para a avaliação de estudos ambientais, mostrou valores mais altos do que as outras escalas, com mediana entre 8,18 e 8,20 no período seco e 8,15 no período chuvoso (Figura 4), sendo a menos ajustada, pois, não acomoda as condições variáveis da água do mar, como flutuações de temperatura e mudanças de salinidade, que podem afetar significativamente as leituras de pH (Abmann et al., 2011). A escala SWS foi desenvolvida para água do mar, levando em consideração a composição e atividade iônica, e teve medianas entre 8,10 no seco e 8,07 no chuvoso, com uma diferença de 0,02 a 0,03 unidades da escala NIST (Figura 4). Na escala TOT os valores foram mais baixos que NIST e SWS com 8,06 no período seco e 8,03 no chuvoso, apresentando uma diferença pequena entre os períodos de 0,02 a 0,03 (Figura 4). Essa escala apresenta valores mais confiáveis, por considerar o efeito de íons como sulfato e fluoreto no cálculo de pH, considerando melhor a química do carbonato no ambiente marinho, elementos essenciais para avaliar os impactos da

acidificação dos oceanos na vida marinha (López et al., 2022). Os resultados para a escala TOTTRIS mostraram a maior diferença entre os períodos, com mediana de 7,92 a 7,94 no período chuvoso e 8,05 no seco, com diferenças de 0,11 e 0,13 unidades das outras escalas (Figura 4). A escala TOTTRIS foi a única que mostrou resultados de maior dispersão e impacto na estação chuvosa, por ser altamente sensível às mudanças de temperatura e salinidade (Pratt, 2014), por esse motivo a escala TOTTRIS apresentou melhor detecção dos dados para avaliação da acidificação.

A saturação de aragonita (Ω_{arag}) abaixo de 3 representa condições estressantes para os organismos marinhos. (NOAA, 2015). Os valores médios e erro padrão de Ω_{arag} para cada escala de pH foram de 3,8 ($\pm 0,5$) para pH NIST, 4,1 ($\pm 0,6$) para pH SWS, 4,0 ($\pm 0,5$) para pH TOT e 3,4 ($\pm 0,5$) para pH TOTTRIS (Figura 5). As diferenças observadas não refletem as mudanças reais na água do mar, mas de como o pH foi expresso em cada uma das escalas. Em relação ao limiar para a calcificação (frequência de $\Omega_{\text{arag}} < 3$), pH NIST indicou que 4,3% das amostras apresentaram condições desfavoráveis à calcificação ($\Omega_{\text{arag}} \leq 3,0$), enquanto essa frequência foi de 1,6% para SWS, 2,2% para pH TOT e 19,7% para pH TOTTRIS, indicando condições notáveis menos favoráveis à calcificação (Figura 5).

Conclusão

A seleção da escala de pH adequada é fundamental e depende do tipo de investigação ambiental. Equações de conversão da escala NIST para SWS e TOT podem ser úteis para monitoramento temporal, enquanto a escala TOTTRIS é a mais indicada para estudos do sistema carbonato em recifes. O uso da escala NIST tende a superestimar o pH, podendo mascarar processos de acidificação e levar a interpretações equivocadas sobre as condições para a calcificação. Portanto, a escolha da escala afeta diretamente a interpretação sobre a condição do ambiente para a calcificação. Os resultados deste estudo, realizado pela primeira vez, evidenciam os impactos negativos do uso de diferentes escalas na avaliação da saúde recifal, contribuindo para futuras pesquisas sobre acidificação oceânica e conservação de recifes de corais.

Referências

- Abmann, S.; Frank, C.; Körtzinger, A. Spectrophotometric high-precision seawater pH determination for use in underway measuring systems. *Ocean Science*, v. 7, p. 597–607, 4 out. 2011. Recebido em 27 maio 2011; publicado em *Ocean Science Discuss.* em 14 jun. 2011; revisado em 14 set. 2011; aceito em 17 set. 2011. DOI: 10.5194/os-7-597-2011.
- Amaya-Viás S, Flecha S, Pe´rez FF, Navarro G, Garcí’a-Lafuente J, Makaoui A and Huertas IE (2023) The time series at the Strait of Gibraltar as a baseline for long-term assessment of vulnerability of calcifiers to ocean acidification. *Front. Mar. Sci.* 10:1196938. doi: 10.3389/fmars.2023.1196938
- ARAÚJO, Paulo Victor do Nascimento. Análise geoambiental da plataforma continental rasa equatorial, por meio de sensoriamento remoto e dados sedimentológicos: parrachos de Rio do Fogo-RN, Brasil. 2014. 133 f. Dissertação (Mestrado em Geodinâmica e Geofísica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- Badocco, D., Pedrini, F., Pastore, A., di Marco, V., Marin, M. G., Bogialli, S., Roverso, M., & Pastore, P. (2021). Use of a simple empirical model for the accurate conversion of the

seawater pH value measured with NIST calibration into seawater pH scales. *Talanta*, 225, 122051.

Bates, N. R., Astor, Y., Church, M. J., Currie, K. I., Dore, J. E., González-Dávila, M., Lorenzoni, L., Muller-Karger, F. E., Ólafsson, J., & Santana-Casiano, J. M. (2014). A Time-Series View of Changing Ocean Chemistry Due to Ocean Uptake of Anthropogenic CO₂ and Ocean Acidification. *Oceanography*, 27(1), 126–141.

BUCK, R. P.; RONDININI, S.; COVINGTON, A. K.; BAUCKE, F. G. K.; BRETT, C. M. A.; CAMOES, M. F.; MILTON, M. J. T.; MUSSINI, T.; NAUMANN, R.; PRATT, K. W.; SPITZER, P.; WILSON, G. S. Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 11, p. 2169–2200, 2002.

Carter, B. R., Sharp, J. D., García-Ibáñez, M. I., Woosley, R. J., Fong, M. B., Álvarez, M., Barbero, L., Clegg, S. L., Easley, R. A., Fassbender, A. J., Li, X., Schockman, K. M., & Wang, Z. A. (2024). Random and systematic uncertainty in ship-based seawater carbonate chemistry observations. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.1002/lno.12674>
Chagas, R.A., & Suzuki, M.S. (2005). Variações temporais e espaciais de nutrientes dissolvidos inorgânicos em um sistema estuarino tropical: Baía de Guarapari (ES). *Revista Brasileira de Oceanografia*, 53(1–2), 1–12.

Clegg, S. L., Humphreys, M., Waters, J. F., Turner, D. R., & Dickson, A. G. (2022). Chemical speciation models based upon the Pitzer activity coefficient equations, including the propagation of uncertainties. II. Tris buffers in artificial seawater at 25 °C, and an assessment of the seawater ‘Total’ pH scale. *Marine Chemistry*, 244, 104096.

Dickson, A. G., Sabine, C. L., & Christian, J. R. (Eds.). (2007). Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurements. PICES Special Publication 3. Link (PDF NOAA):

DONEY, S. C.; FABRY, V. J.; FEELY, R. A.; KLEYPAS, J. A. Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, v. 1, p. 169–192, jan. 2009.

Grdan, S., & Dupont, S. (2020). How to measure pHT in biological experiments. Disponível em: Hansson, I. (1973). A new set of pH-scales and standard buffers for sea water. In *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* (Vol. 20, No. 5, pp. 479-491). Elsevier.

Leclercq, N., Gattuso, J.-P., & Jaubert, J. (2000). CO₂ partial pressure controls the calcification rate of a coral community. *Global Change Biology*, 6(3), 329–334. Link:

Lewis, E., Wallace, D. W. R., & Allison, L. J. (1998). Program developed for CO₂ system calculations (CO₂SYN) (ORNL/CDIAC-105). Oak Ridge National Laboratory/CDIAC. Link (descrição CDIAC/NOAA):

López, R.M., Aguirre, A., Pérez, F.F., & Ríos, A.F. (2022). Uncertainty in seawater pH measurements: choosing the right scale. *Frontiers in Marine Science*, 9:823588.

NOAA. (2015). Ocean Acidification: Saturation State [Vídeo]. NOAA Science On a Sphere. Retrieved August 28, 2025, from

Orr, J., Fabry, V., Aumont, O. et al. Anthropogenic ocean acidification throughout the 21st century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681–686 (2005).

Paulsen, M. L., & Dickson, A. G. (2020). Preparation of 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) pH buffers in synthetic seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*, 18(9), 504–515.

Pratt, K.W. (2014). pH measurements: methods, interpretation, and best practices. *Marine Chemistry*, 165, 49–59.

Ressurreição, M., Ovalle, A.R.C., & Rezende, C.E. (1996). Balanço de nutrientes em um sistema estuarino tropical: Baía de Guanabara, RJ. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 8, 29–45.

Suwa, R., Hatta, M., & Ichikawa, K. (2014). Dynamics and Energetics of the Proton Transfer Reaction in Calcification and Decalcification. *Chemistry: A European Journal*, 20 (42),

13656–13661. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201402210>

Zeebe, R.E., & Wolf-Gladrow, D.A. (2001). CO₂ in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes. Elsevier Oceanography Series.

Anexos

Figura 1 - Mapa de Rio do Fogo

Figura 2 - Distribuição das escalas em função de TOTTRIS

Figura 3 - Valores de pH em cada uma das escalas avaliadas

Figura 4 - Diferenças entre os períodos seco e chuvoso

Figura 5- Valores médios de aragonita e erro padrão e frequência por escalas

CÓDIGO: ET1108

AUTOR: CAMILA ADRIANNI SILVA OLIVEIRA

ORIENTADOR: GILBERTO CORSO

TÍTULO: Padrão nictemeral na detecção visual e acústica de cetáceos na Zona Econômica Exclusiva do Brasil

Resumo

Espécies marinhas estão diante de constantes variações temporais que podem interferir em suas atividades biológicas. Uma dessas variações é o ciclo nictemeral, que contém 24 horas, e que demanda das espécies adaptações e mudanças importantes em sua fisiologia e comportamento. Esta pesquisa tem como objetivo analisar os padrões temporais nas detecções visuais e acústicas de cetáceos ao longo do ciclo de 24 horas para verificar se há um período do dia com maior atividade desses animais na Zona Econômica Exclusiva brasileira. A maioria dos dados coletados ocorreram através de embarques em navios da Marinha do Brasil de 2018 a 2025, no âmbito do Projeto Sentinelas da Amazônia Azul. Para o processamento dos dados foi utilizado a linguagem de programação em Python e o Teste de Rayleigh, este último utilizado para análise estatística. Importante ressaltar que, devido ao esforço da amostragem ter sido variável entre os horários do dia, os resultados são considerados preliminares e haverá continuidade das coletas e análises a fim de uniformizar o esforço. Os resultados indicam que há alterações no padrão de detecção das espécies de cetáceos ao longo do dia, especialmente no que se refere à atividade acústica

Palavras-chave: Cetáceos; ciclo nictemeral; variações temporais;

TITLE: Nycthemeral pattern in the visual and acoustic detection of cetaceans in the Brazilian Exclusive Economic Zone

Abstract

Marine species face constant temporal variations that can affect their biological activities. One such variation is the 24-hour nycthemeral cycle, which requires species to adapt and make significant changes in their physiology and behavior. This research aims to analyze the temporal patterns in visual and acoustic detections of cetaceans throughout the 24-hour cycle to determine whether there is a period of the day with greater activity for these animals in the Brazilian Exclusive Economic Zone. Most of the data collected occurred through embarkation on Marinha do Brasil vessels from 2018 to 2025, as part of the Projeto Sentinelas da Amazônia Azul. Python programming language and the Rayleigh test were used for data processing, the latter being used for statistical analysis. It is important to emphasize that, because the sampling effort varied across times of day, the results are considered preliminary, and collection and analysis will continue to standardize the effort. The results indicate that there are changes in the detection pattern of cetacean species throughout the day, especially with regard to acoustic activity.

Keywords: Cetaceans; nycthemeral cycle; temporal variations;

Introdução

Espécies marinhas adaptam de modo contínuo seu comportamento e fisiologia em resposta às variações temporais ambientais que podem ser sazonais, lunares ou diárias, resultando em padrões rítmicos, particularmente durante o forrageamento (Sol, Morgane et al.; 2024). Padrões nictemerais de comportamento, incluindo emissão de determinados sinais acústicos, são comuns em muitas espécies de mamíferos marinhos e indicam que esses sinais são usados seletivamente durante fases diferentes do dia. Em golfinhos-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*), por exemplo, é possível observar um padrão comportamental que inclui o forrageamento noturno e descanso diurno, com socialização à tarde e emissão de sinais específicos durante a execução desses comportamentos (Baumann-Pickering et al.; 2015).

Picos de chamados são relatados para as baleias da espécie *Balaenoptera musculus* entre o crepúsculo e o amanhecer e estão relacionados à migração vertical de krill, presas primárias das baleias azuis. Durante o dia, as presas estão localizadas em regiões bentônicas e o forrageamento é menos eficiente, durante o crepúsculo elas realizam migração vertical para a superfície, tornando o forrageamento mais eficiente (Wiggins et al., 2005).

Com abundância variável de presas e em ambientes de mudanças rápidas, estratégias de forrageamento altamente adaptativas e específicas foram desenvolvidas também pelos odontocetos, possibilitando uma alimentação oportunista e numerosa de presas (Zein et al., 2019). Atividades acústicas em espécies de odontocetos, como o boto-cinza (*Sotalia guianensis*), são usadas para comunicação social, alimentação e orientação espacial. Cliques de ecolocalização são usados para navegação e detecção de presas, como eufausídeos e peixes (Sol; Morgane et al., 2024), enquanto que assobios são usados para a comunicação social das espécies durante o dia.

Para diversas espécies, o monitoramento visual é o método tradicional de levantamento de dados. Através de monitoramento visual, é possível observar populações em diferentes intervalos de tempo e obter informações sobre seus comportamentos (Zein et al., 2019). Os movimentos diurnos são mais fáceis de observar, mas são limitados pela luz. Por outro lado, o Monitoramento Acústico Passivo (MAP) funciona independentemente das condições climáticas e da hora do dia (Brager, Stefan; Brager, Zsuzsanna, 2019). O MAP é uma ferramenta de baixo custo para detectar a presença de animais ativos acusticamente em áreas remotas. Esse método é viável, tendo em vista que a capacidade humana de observar diretamente esses animais abaixo da superfície do mar é limitada (Giorli; AU; Neuheimer, 2016). Para o monitoramento acústico passivo, os hidrofones são úteis para o registro de sequências de cliques para a navegação e de assobios para comunicação, além de ajudar a detectar animais durante o dia ou à noite, inclusive quando as condições climáticas não são favoráveis à detecção visual (Gauger et al., 2022).

Esta pesquisa objetivou analisar os padrões temporais nas detecções visuais e acústicas de cetáceos ao longo do ciclo de 24 horas para verificar se há um período do dia com maior atividade desses animais na Zona Econômica Exclusiva brasileira. Foram utilizados dados de gravações acústicas e de avistagens do Projeto Sentinelas da Amazônia Azul (SAA) para investigar a variação diária de comportamento de cetáceos entre o período diurno e noturno, identificar a frequência de registros visuais das espécies em diferentes horas do dia e analisar a frequência de vocalizações emitidas durante o ciclo nictemeral. Alinhado à concretização

dos objetivos, foram realizadas buscas na literatura científica existente sobre o padrão de atividade das espécies de cetáceos durante o ciclo de 24 horas.

Metodologia

Área de estudo:

Este estudo foi realizado ao longo da Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil, incluindo as regiões Norte, Nordeste e Sudeste, com limite ao norte nas águas do Amapá e o limite mais ao Sul em Niterói, Rio de Janeiro. A Zona Econômica Exclusiva do Brasil configura uma área oceânica extensa que abrange aproximadamente 5,7 milhões de km². É um território estrategicamente importante do ponto de vista de sua biodiversidade e vulnerabilidade. Aliado a isso, a Marinha do Brasil (MB), além de garantir a proteção deste rico patrimônio, desenvolve pesquisas nas seguintes vertentes: econômica, ambiental, científica e soberania (CGCFN, Web). A maioria dos dados utilizados neste estudo foram coletados em embarques realizados em navios da Marinha do Brasil, em especial, os embarques realizados com foco na manutenção da estação científica estabelecida no Arquipélago São Pedro e São Paulo (ASPSP).

Coleta de dados:

- **Monitoramento visual:** A coleta dos dados visuais ocorreu entre os anos 2018 a 2025. A tabela 1 sintetiza informações referentes aos embarques realizados através do Projeto Sentinelas da Amazônia Azul. O equipamento para o monitoramento visual inclui binóculos reticulados, máquinas fotográficas (lentes de 300mm, 400mm, 500mm e 600mm), angle boards para medição do ângulo das avistagens, rádios VHF, computador conectado a um receptor de GPS, Software WinCruz e planilhas de papel.

A metodologia empregada é a distance sampling (amostragem pelas distâncias), tal método possibilita estimar a densidade populacional relativa, assim como realizar a modelagem da distribuição dos cetáceos avistados. Alguns pressupostos desta metodologia é que o navio precisa estar desenvolvendo transectos lineares a uma velocidade mínima de 6 nós. O esforço de monitoramento visual ocorre durante todo o período de luz solar.

A equipe precisa ser de no mínimo 4 pesquisadores que irão mudar de posição a cada 30 minutos. A dinâmica da equipe ocorre da seguinte forma: um dos pesquisadores estará na função de anotador (Data Recorder) operando o software WinCruz, onde são registradas todas as informações referentes às avistagens; dois pesquisadores estarão nas posições de observadores, um na posição de bombordo (BB) e o outro fica alocado à boreste (BE), e o último fica em descanso.

- **Monitoramento acústico passivo (MAP):** A coleta dos dados acústicos se deu por meio do emprego de uma Matriz de arrasto rebocada pelo navio durante a derrota realizada. O sistema de gravação acústica utilizado é composto por um cabo de arrasto com uma matriz linear (AUSSET®) de 250m composta de 4 hidrofones omnidirecionais (Cetacean Research C54XRS) (Figura 4). A matriz é acoplada a um gravador digital (Fostex FR-2 LE), conectado a uma placa digitalizadora Rolland Octa-Capture® (frequência de amostragem de 192kHz / 24 bits) com os inputs na ordem 1, 2, 3, 4 destinada a captação de sons de alta frequência emitidos por odontocetos.

Para o monitoramento em tempo real da detecção acústica foi utilizado o software PAMGuard®. A posição de monitoramento do desempenho do software é revezada com a coleta de dados visuais. Importante ressaltar que, mesmo em condições ambientais favoráveis, o método de gravação acústica com um cabo sendo arrastado pelo navio gera bastante ruído nas frequências baixas, devido ao próprio ruído do navio, o que causa o comprometimento na detecção de mysticetos. Desse modo, as espécies de odontocetos, devido às altas frequências que emitem suas vocalizações, foram passíveis de serem analisadas e, algumas, identificadas tais como: *Stenella attenuata*, *Peponocephala electra* e *Stenella longirostris*, incluindo algumas que não foram possíveis de identificação.

O monitoramento acústico passivo ocorre concomitantemente à observação visual, além de ser executado em condições climáticas adversas, como chuvas e baixa visibilidade. Adicionalmente, é realizado durante o período noturno, intervalo em que a observação visual não é possível. Assim, o monitoramento acústico foi contínuo durante todas as expedições em que foi possível empregar essa metodologia, exceto em situações de manobra brusca de mudança de direção do navio, durante parada em alguma estação de coleta de outros projetos ou quando foi solicitado o recolhimento dos cabos de hidrofone devido a razões particulares da Marinha do Brasil.

Análise de dados: As amostras coletadas foram processadas e manipuladas usando a linguagem de programação Python (v.3.13), com o uso das bibliotecas NumPy (v.2.3.2), e Pandas (v.2.3.1). Os dados foram testados através do Teste de Rayleigh, utilizando o pacote estatístico Pingouin (v.0.5.5), em que foi verificado se há preferência à algum período do dia ou se dados estão distribuídos de forma aleatória nos gráficos circulares obtidos. Os gráficos para a visualização da distribuição das detecções visuais e acústicas ao longo do ciclo nictemeral foram construídos utilizando a biblioteca Matplotlib (v.3.10.5).

Resultados e Discussões

Considerando as dez expedições do Projeto Sentinelas da Amazônia Azul na ZEE, foram realizadas 468 detecções visuais e 57 detecções acústicas, no total de 171 dias de embarque.

Com relação às detecções visuais, é possível notar que há uma concentração de detecções entre as horas claras do dia, conforme pode ser observado na Figura 1, entre 5h e 17h aproximadamente. Com pico às 13h, há o maior número de detecções com valores superiores a 60 avistagens nesse horário. Importante ressaltar que no intervalo entre 5h e 17h aproximadamente, com condições climáticas favoráveis, é o horário em que estão ocorrendo as observações visuais diurnas pela equipe do Sentinelas.

O aumento das detecções visuais à tarde pode estar relacionado com momentos de socialização e preparação para o início do período de alimentação dos odontocetos. A atividade alimentar dos cetáceos que habitam ecossistemas pelágicos possui uma tendência a ser noturna, devido à dinâmica de presas. Assim, há um aumento da atividade ao entardecer, revelando um pico à noite e diminuindo pela manhã (Sol; Morgane et al., 2024). A diminuição das detecções no período da manhã podem estar relacionadas ao descanso diurno nessas espécies (Baumann-Pickering et al.; 2015). A depender do habitat, diferenças apresentadas nos padrões diurnos e noturnos das espécies estão relacionadas à distribuição de presas (Zein et al., 2019). Em ecossistemas rasos e costeiros, por exemplo, em que há uma

limitação de presas, vários cetáceos que vivem no mar apresentam atividade de forrageamento majoritariamente noturna (Sol; Morgane et al., 2024).

Com relação às detecções acústicas, sinais sonoros são utilizados em diferentes momentos do dia, como pode ser verificado na Figura 2, que esclarece o padrão de detecção emitido pelos odontocetos detectados. Vale ressaltar que nos dados acústicos analisados não é possível distinguir sinais de baixa frequência emitidos por mysticetos devido ao ruído do navio, apenas sinais de alta frequência. Conforme observado, valores altos de detecções acústicas nas horas escuras do dia, entre 18h a 4h aproximadamente, podem estar relacionadas ao forrageamento noturno, horário do ciclo nictemeral em que ocorre a migração vertical de zooplâncton e de peixes à superfície.

A diminuição da atividade acústica das espécies de golfinhos detectadas, tanto as espécies identificadas visualmente (*Stenella attenuata*, *Peponocephala electra* e *Stenella longirostris*), como as não identificadas, nas horas da manhã pode estar relacionada ao momento de repouso, enquanto que o aumento da atividade à tarde pode indicar socialização, com a utilização de assobios. Para algumas espécies, a atividade acústica noturna é constituída majoritariamente por cliques de ecolocalização, que são usados pelos odontocetos para a localização espacial ou alimentação (Baumann-Pickering et al.; 2015).

Para embasamento estatístico, foi realizado o Teste de Rayleigh, que é pertinente para dados que possuem regularidade circular. Esse teste é relevante nesta pesquisa, pois foram analisados padrões com periodicidade circular de tempo. Neste estudo, considera-se o ciclo nictemeral de 24 horas. Assim, pode-se examinar se as detecções visuais e acústicas seguem uma distribuição uniforme no ciclo ou se seguem um padrão temporal específico, mencionando uma preferência de atividade dos indivíduos à algum período do dia.

Para as detecções visuais, o valor estatístico adquirido foi de 166,94 com um valor- $p < 0,001$. Os resultados encontrados de valor- p significam que os dados não estão distribuídos de modo uniforme ao longo do ciclo de 24 horas. Os indivíduos estão sendo avistados em horários específicos do dia, ou seja, há um padrão temporal de detecção visual de cetáceos entre 5h às 17h (destacado na cor amarela da figura), aproximadamente, do ciclo nictemeral.

Com relação às detecções acústicas, o valor estatístico adquirido foi de 7.39 com um valor- p também menor do que 0,001. Desse modo, os resultados também indicam que os dados não estão distribuídos uniformemente no ciclo de 24 horas e há preferência de atividades, pelos indivíduos, nas fases crepuscular e noturna (destacadas na cor cinza da figura). Como discutido, essa preferência pode estar relacionada ao comportamento alimentar dos cetáceos, e este, por sua vez, à migração vertical de presas.

Conclusão

As espécies marinhas adaptam de modo contínuo aspectos como fisiologia e comportamento para se adequar às variações do ambiente a qual estão inseridas. Uma variação importante é a temporal, da qual demanda dos organismos estratégias eficientes para sobrevivência. Atividades diárias são frequentemente realizadas por uma variedade de espécies de cetáceos e uma delas é a atividade acústica que consiste em vocalizações para diversos fins como alimentação, socialização e navegação, por exemplo. Considerando esses eventos, buscou-se analisar padrões temporais nas detecções visuais e acústicas de cetáceos ao longo do ciclo de

24 horas para verificar se há um período do dia com maior atividade desses animais na Zona Econômica Exclusiva brasileira.

No que concerne às detecções visuais, verificou-se um padrão frequente de detecção de cetáceos entre o nascer e o pôr do sol, apresentando um pico de detecção às 13h. Nesse horário, há o maior número de detecções com valores superiores a 60 avistagens. Porém, é importante ressaltar que o horário em que está ocorrendo o esforço de monitoramento visual é das 5h às 17h, aproximadamente. Em relação às detecções acústicas, que ocorrem independentemente das variações do ciclo nictemeral, pode-se notar que há uma intensa atividade noturna por parte dos odontocetos, o que pode estar relacionado à dinâmica de presas. Por fim, ressalta-se a necessidade de continuidade das análises, devido ao esforço de amostragem não ter sido uniforme em diferentes horas do dia.

Referências

AMAZÔNIA AZUL. Marinha do Brasil. Disponível em:

https://www.mar.mil.br/hotsites/amazonia_azul/sobre.html. Acesso em: 26 ago. 2025.

BAUMANN-PICKERING, Simone et al. Acoustic behavior of melon-headed whales varies on a diel cycle. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 69, n. 9, p. 1553-1563, 2015.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00265-015-1967-0>. Acesso em: 12 jun. 2025.

BRÄGER, Stefan; BRÄGER, Zsuzsanna. Movement patterns of odontocetes through space and time. In: *Ethology and behavioral ecology of odontocetes*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 117-144. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-16663-2_6. Acesso em: 12 jun. 2025.

CELLIER-MICHEL, S.; REHAÏLIA, M.; BERTHON, J. L. Is the rhythm of vertical migration of *Daphnia longispina* circadian or simply nycthemeral?. In: *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*. EDP Sciences, 2003. p. 265-272. Disponível em: https://www.limnology-journal.org/articles/limn/abs/2003/03/limno200339p265/limno20033_9p265.html. Acesso em: 20 ago. 2025.

CGCFN. Comando-Geral do Corpo de Fuzileiros Navais. Amazônia Azul. Disponível em: https://www.marinha.mil.br/cgcfm/amazonia_azul. Acesso em: 20 ago. 2025.

DECONTO, Lucimary S.; MONTEIRO-FILHO, Emygdio LA. Day and night sounds of the Guiana dolphin, *Sotalia guianensis* (Cetacea: Delphinidae) in southeastern Brazil. *acta ethologica*, v. 19, n. 1, p. 61-68, 2016. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10211-015-0223-y>. Acesso em: 08 maio 2025.

GAUGER, Marco FW et al. Seasonal and diel influences on bottlenose dolphin acoustic detection determined by whistles in a coastal lagoon in the southwestern Gulf of California. *PeerJ*, v. 10, p. e13246, 2022. Disponível em: <https://peerj.com/articles/13246/>. Acesso em: 12 jun. 2025.

GIORLI, Giacomo; AU, Whitlow WL; NEUHEIMER, Anna. Differences in foraging activity of deep sea diving odontocetes in the Ligurian Sea as determined by passive acoustic

recorders. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, v. 107, p. 1-8, 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967063715300261?casa_token=cGAXhcQRJ9wAAAAA:-aQhrbrETV2uQ-iOwdSa4QiygkaERmgtVfnZu5058mjL01297nYSr9eswrANRF3IXL0QXSJIjymB. Acesso em: 01 ago. 2025.

HÄFKER, N. Sören et al. Circadian clock involvement in zooplankton diel vertical migration. Current Biology, v. 27, n. 14, p. 2194-2201. e3, 2017. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(17\)30727-3](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(17)30727-3). Acesso em 19 ago. 2025.

HÄFKER, N. Sören et al. Rhythms and clocks in marine organisms. Annual Review of Marine Science, v. 15, n. 1, p. 509-538, 2023. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-marine-030422-113038>. Acesso em 11 ago. 2025.

KÜGLER, Anke et al. Diel spatio-temporal patterns of humpback whale singing on a high-density breeding ground. Royal Society Open Science, v. 11, n. 1, p. 230279, 2024. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.230279>. Acesso em: 01 ago. 2025.

MARÍN-GÓMEZ, Oscar H.; MACGREGOR-FORS, Ian. A global synthesis of the impacts of urbanization on bird dawn choruses. Ibis, v. 163, n. 4, p. 1133-1154, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ibi.12949>. Acesso em: 26 ago. 2025.

MCGOWAN, Kathryn A.; KLOEPPER, Laura N. Different as night and day: wild bats modify echolocation in complex environments when visual cues are present. Animal Behaviour, v. 168, p. 1-6, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347220302347?casa_token=M-nClapfppUAAAAA:zK81eMYu6TcH6GzPVgGX6pildWhPewtlxX61zZrYcWKwXxQGxeZcKP-E45Bt0KVpqxIzfqFW9CLf. Acesso em: 26 ago. 2025.

ROCK, Alberto; WILCOCKSON, David; LAST, Kim S. Towards an understanding of circatidal clocks. Frontiers in Physiology, v. 13, p. 830107, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2022.830107/full>. Acesso em 11 ago. 2025.

SCHAFFELD, Tobias et al. Diel and seasonal patterns in acoustic presence and foraging behaviour of free-ranging harbour porpoises. Marine Ecology Progress Series, v. 547, p. 257-272, 2016. Disponível em: <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v547/meps11627>. Acesso em: 12 jun. 2025.

SOL, Morgane et al. Temporal patterns in dolphin foraging activity in the Mediterranean Sea: insights from vocalisations recorded during the ACCOBAMS Survey Initiative. Frontiers in Marine Science, v. 11, p. 1378524, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/marine-science/articles/10.3389/fmars.2024.1378524/full>. Acesso em: 13 jun. 2025.

WIGGINS, Sean M. et al. Blue whale (*Balaenoptera musculus*) diel call patterns offshore of Southern California. *Aquatic Mammals*, v. 31, n. 2, p. 161, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Erin-Oleson/publication/239920485_Blue_Whale_Balaenoptera_musculus_Diel_Call_Patterns_Offshore_of_Southern_California/links/004635317cb272e153000000/Blue-Whale-Balaenoptera-musculus-Diel-Call-Patterns-Offshore-of-Southern-California.pdf. Acesso em: 10 ago. 2025.

ZEIN, Beate et al. Time and tide: Seasonal, diel and tidal rhythms in Wadden Sea Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *PLoS One*, v. 14, n. 3, p. e0213348, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0213348>. Acesso em 10 ago. 2025.

Anexos

Figura 1 – Distribuição das detecções visuais dos cetáceos no ciclo nictemeral caracterizada em um diagrama de barras polares (horas do dia). A cor amarela indica o horário entre o nascer e o pôr do sol.

Figura 2 – Distribuição das detecções acústicas dos odontocetos no ciclo nictemeral caracterizada em um diagrama de barras polares (horas do dia). A cor amarela indica o horário entre o nascer e o pôr do sol e a cor cinza indica o horário entre o pôr e o

CÓDIGO: ET1556

AUTOR: MARIA LORENA PESSOA BATISTA

ORIENTADOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

TÍTULO: Distribuição de nutrientes inorgânicos dissolvidos e clorofila-a nos Parrachos de Rio do Fogo - Rio Grande do Norte

Resumo

Os recifes de corais são ecossistemas de alta relevância biológica e ecológica, mas altamente vulneráveis às pressões humanas. Em recifes costeiros, o aporte continental de nutrientes pode intensificar a produção fitoplanctônica, afetando a saúde do ecossistema. Este estudo avaliou a distribuição de nutrientes inorgânicos dissolvidos (nitrito, nitrato, amônio, ortofosfato e ortossilicato) e clorofila-a nos Parrachos de Rio do Fogo (RN), comparando-os com um córrego local. Entre 2024 e 2025, nitrogênio e silício apresentaram concentrações mais altas nos períodos chuvosos e de alta temporada turística (jan e mar/2025), com pico de amônia de 27,3 $\mu\text{mol/L}$, próximo ao limite da Resolução CONAMA 357/2005. Esses picos sugerem influência de esgoto doméstico, reforçada pela correlação negativa entre nutrientes e salinidade. Mais de 90% dos domicílios usam fossas rudimentares, aumentando o risco de contaminação subterrânea e aporte difuso de nutrientes aos recifes. Apesar de não haver aumento proporcional na clorofila-a, a competição com macroalgas e a proporção desequilibrada de Redfield podem explicar a ausência de crescimento da biomassa fitoplanctônica. Ressalta-se a necessidade de monitoramento e melhorias no saneamento, diante do risco de eutrofização devido às pressões urbanas e turísticas.

Palavras-chave: Eutrophication. Phytoplankton. Nitrogen. Contamination. Sanitation.

TITLE: Distribution of Dissolved Inorganic Nutrients and Chlorophyll-a in the Parrachos de Rio do Fogo – Rio Grande do Norte

Abstract

Coral reefs are ecosystems of high biological and ecological importance, but they are highly vulnerable to human pressures. In coastal reefs, continental nutrient input can enhance phytoplankton production, affecting ecosystem health. This study evaluated the distribution of dissolved inorganic nutrients (nitrite, nitrate, ammonium, orthophosphate, and orthosilicate) and chlorophyll-a in the "Parrachos de Rio do Fogo (RN)", comparing them with a local stream. Between 2024 and 2025, nitrogen and silicon showed higher concentrations during the rainy season and peak tourist periods (Jan and Mar/2025), with ammonium peaking at 27.3 $\mu\text{mol/L}$, close to the limit established by CONAMA Resolution 357/2005. These peaks suggest domestic sewage influence, reinforced by the negative correlation between nutrients and salinity. More than 90% of households use rudimentary septic systems, increasing the risk of subterranean contamination and diffuse nutrient input to the reefs. Although chlorophyll-a did not increase proportionally, competition with macroalgae and the unbalanced Redfield ratio may explain the lack of phytoplankton biomass

growth. This highlights the need for monitoring and sanitation improvements, given the risk of eutrophication due to urban and tourism pressures.

Keywords: Eutrophication. Phytoplankton. Nitrogen. Contamination. Sanitation.

Introdução

Os ecossistemas marinhos são ambientes de notável complexidade e biodiversidade, abrigando uma vasta gama de formas de vida e desempenhando funções ecológicas cruciais. Dentre esses, os recifes de corais destacam-se como estruturas biogênicas de carbonato de cálcio, servindo como berçários e habitats vitais para inúmeros organismos (Principe et al., 2011). A complexa estrutura esquelética dos corais pétreos fornece habitat para o grande número e a diversidade de organismos marinhos que sustentam a pesca e turismo (McKinney, 1998). Nesse contexto, os recifes de corais exercem serviços econômicos e ecológicos em benefício de todos os organismos, categorizados em quatro grupos principais: (1) Serviços de Provisão: produtos retirados do ambiente natural para consumo e uso direto, como alimento (peixes e invertebrados) e materiais de construção (areia e agregados carbonáticos); (2) Serviços de Regulação: processos ecológicos que regulam o habitat, como a fotossíntese, que permite o sequestro de carbono; (3) Serviços Culturais: envolvem a recreação e o turismo, além da percepção dos recifes como elementos que proporcionam às comunidades costeiras um senso inerente de lugar; (4) Serviços de Suporte: essenciais para a manutenção de todos os outros serviços, incluem a produção biológica primária e secundária e a diversidade genética dos recifes de coral (Hassan et al., 2005). É fundamental compreender que a base de toda a vida marinha, bem como dos serviços ecossistêmicos fornecidos pelos recifes, tem início com a produção primária, processo realizado por organismos como o fitoplâncton, que iniciam a cadeia alimentar e sustentam todos os níveis tróficos dos ecossistemas oceânicos (Hassan et al., 2005). Esse processo demanda a aquisição de nutrientes inorgânicos dissolvidos na água, principalmente nitrogênio e fósforo, assimilados pelos produtores primários para a fotossíntese (Bell, 1992). Assim, a disponibilidade de nutrientes é de grande importância para a manutenção dos ecossistemas, desde que em concentrações adequadas e equilibradas (Ezzat et al., 2015). Contudo, o crescimento populacional humano e suas demandas crescentes resultam no descarte inadequado de resíduos, com consequente enriquecimento dos ambientes marinhos com nutrientes, impactando diretamente os serviços ecossistêmicos dos recifes de corais (U.S. Environmental Protection Agency, 2012). As principais fontes artificiais de nitrogênio e fósforo incluem fertilizantes agrícolas, esgoto industrial e doméstico, rejeitos animais e a queima de combustíveis fósseis (Esteves, 1999; Boyer et al., 2002). Em recifes, o enriquecimento por nutrientes é um problema porque aumenta a população de algas, que sufocam os corais. Além disso, gera competição por espaço e altera a estrutura da comunidade, favorecendo macroalgas em detrimento de corais pétreos/escleractíneos (Diaz Ortega; Hernandez, 2014). O aporte inadequado desses nutrientes também causa aumento na densidade de bioindicadores como ouriços-do-mar (*Echinometra lucunter* e *Eucidares* sp.), esponjas (*Anthosigmella* varians, *Spirastrella* sp., *Cinachirella albocladee*, *Cliona* sp.), além da redução da transparência da água, limitando a profundidade dos corais zooxantelados em recifes eutrofizados (Costa et al., 2000). Em nível de ecossistema, esse processo resulta em diminuição da biodiversidade dos recifes de corais (Ferrier-Pagès et al., 2000). Com base nisso, este trabalho visa avaliar a distribuição espaço-temporal dos nutrientes inorgânicos dissolvidos e identificar possíveis condições de contaminação nos ecossistemas recifais dos parrachos de Rio do Fogo, no estado do Rio Grande do Norte.

Metodologia

1. Área de estudo O estudo foi realizado nos Parrachos de Rio do Fogo, situado no município de Rio do Fogo (RN), 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. As coletas foram realizadas em 18 estações de amostragem distribuídas entre os subsistemas de Garças e Rastro e organizadas em três setores de acordo com as áreas do recife: Borda Externa (BE01, BE02, BE03), Central (C01, C02, C03) e Borda Interna (BI01, BI02, BI03; Figura 1). Para fins de avaliação de possíveis fontes de entrada de nutrientes para o ecossistema recifal em questão, também foram realizadas amostragens ao longo do córrego (CG01, CG02, CG03) que deságua no ambiente marinho (Figura 2).

2. Procedimentos de campo As medições e coletas de amostras de água foram executadas durante expedições bimestrais, incluindo períodos secos e chuvosos. O cronograma de amostragem considerou um ciclo anual, com coletas realizadas em maio, agosto e novembro de 2024, seguidas por expedições em janeiro, março e maio de 2025. As variáveis físico-químicas, temperatura, pH e salinidade foram medidas em campo com equipamento multiparâmetros (YSI PRO 1030). Alíquotas de 3000 ml de água foram armazenadas em frascos de polietileno para o processamento e análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos (nitrito, nitrato, n-amoniaco, ortofosfato e ortosilicato) e 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 de 0,45 µm de porosidade em sistema de filtração à vácuo, e o filtrado foi mantido congelado para a determinação de nutrientes inorgânicos dissolvidos até o momento da análise. Para análise de clorofila-a, as amostras foram filtradas até o ponto de saturação da membrana, e os filtros congelados para análise. Os nutrientes inorgânicos dissolvidos (ortofosfato, nitrito, nitrato, n-amoniaco) foram analisados por colorimetria e espectrofotometria de acordo com os métodos descritos por Grasshoff et al. (1999). As análises de nitrato foram realizadas por redução a nitrito em coluna de cádmio. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS, segundo os comprimentos de onda 810nm (ortofosfato), 543nm (nitrito e nitrato) e 630nm (n-amoniaco). Para a análise de clorofila-a, os pigmentos foram extraídos em acetona 90% por um período de 24 horas sob refrigeração e ao abrigo da luz, conforme os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). O extrato, então, foi submetido à centrifugação e o volume final foi registrado para a correção dos cálculos. A leitura realizada em espectrofotômetro UV-VIS utilizando cubetas de vidro óptico nos comprimentos de onda de 665nm, 647nm, 630nm e 750nm. Posteriormente, foi acrescentado 0,1mL de HCl 1N em cada cubeta para a conversão de clorofila-a em feopigmentos e uma nova leitura foi realizada nos mesmos comprimentos de onda. A determinação espectrofotométrica da concentração dos pigmentos fotossintéticos foi obtida através das equações pelo método monocromático de Lorenzen (1967). Para avaliar o grau de contaminação das áreas estudadas, 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 do sistema da Agência Nacional de Águas (ANA), para avaliar a influência da pluviosidade e vazão fluvial para a variação sazonal da qualidade da água nos ecossistemas estudados. 3. Análises estatísticas 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 nível de significância definido em $\alpha=5\%$ (Bates et al., 2015; Kuznetsova et al., 2017; Lenth, 2023).

Resultados e Discussões

1. Variáveis físico-químicas A salinidade demonstrou variações marcantes entre as estações e campanhas avaliadas. Para o subsistema Garças, a salinidade variou de 34,80 (Janeiro/25) a 41,6 (Maio/24), com uma amplitude total de 6,8. No subsistema Rastro, a variação foi de 31,00 (Março/25) a 41,90 (Agosto/24), com uma amplitude de 10,9. Para o Córrego, o teor de íons dissolvidos foi avaliado a partir da condutividade elétrica, cujos valores foram característicos de águas continentais (máximo de 2,170 mS/cm em Março/2025; Tabela 1). Esse resultado sugere a ausência de mistura salina e um fluxo hidrológico predominando no sentido continente - mar durante as coletas, que foram realizadas durante o período de baixa mar. A temperatura da água apresentou um padrão sazonal claro. As temperaturas mais baixas foram registradas em agosto de 2024 em Garças (26,38 °C) e Rastro (26,37 °C). Em contrapartida, os maiores valores foram observados nos meses de verão, com o máximo de 32,40 °C em Garças (Maio/24) e 31,50 °C em Rastro (Janeiro/25; Tabela 1). O pH variou de 7,64 (Novembro/24) a 8,25 (Março/25) em Garças. No Rastro, os valores ocorreram entre 7,87 (Janeiro/25) e 8,10 (Março/25). No Córrego, o pH exibiu mínimo de 6,40 (Janeiro/25) e máximo de 8,18 (Maio/24; Tabela 1). 2. Variação temporal de nutrientes e clorofila-a 2.1. Nutrientes inorgânicos dissolvidos As concentrações de nutrientes inorgânicos dissolvidos variaram ao longo do período de amostragem nas estações dos Parrachos, havendo um aumento significativo de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e silicato ($\text{Si}(\text{OH})_4$) nos meses de mar/25 (NO_2^- : $0,27 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$; NO_3^- : $16,2 \pm 9,3 \mu\text{mol/L}$; $\text{Si}(\text{OH})_4$: $7,19 \pm 3,45 \mu\text{mol/L}$) e mai/25 (NO_2^- : $0,23 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$; NO_3^- : $8,60 \pm 7,86 \mu\text{mol/L}$; $\text{Si}(\text{OH})_4$: $6,91 \pm 5,96 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,05$; Figura 2). Em jan/25, foi observado um aumento nos níveis de amônio (NH_4^+) e nitrito (máximo de $27,3 \mu\text{mol/L}$ e $0,49 \mu\text{mol/L}$, respectivamente) que não foram acompanhados por incremento em nitrato. Esse padrão foi encontrado tanto para o Córrego quanto para os Parrachos, sugerindo um aporte externo de nutrientes de origem antropogênica, possivelmente intensificado durante os períodos de aumento da descarga continental (evidenciado pelos menores níveis de salinidade em jan/25 e mar/25), além da estação de alta temporada e aumento da população transitória na região. O ciclo do nitrogênio em ecossistemas marinhos é marcado por diversos processos, que envolvem as etapas de fixação, nitrificação e desnitrificação. A nitrificação ocorre em condições oxigenadas, em que microrganismos promovem a oxidação do amônio a nitrito e, subsequentemente, a nitrato. Por este motivo, o nitrato é a principal forma nitrogenada encontrada em ambientes marinhos, enquanto nitrito e amônio tendem a se manter em baixas concentrações, com o aumento de amônio associado à produção regenerada por remineralização da matéria orgânica (Sarmiento; Gruber, 2006). O aporte de esgoto doméstico é uma das principais formas de enriquecimento em matéria orgânica e nutrientes para recifes costeiros, cujas vias de entrada incluem escoamento superficial, descarga fluvial e descarga subterrânea (Zhang et al., 2022).

No Brasil, processos de eutrofização foram reportados para ecossistemas recifais costeiros do sul da Bahia, com influência principal da descarga submarina de água subterrânea como fonte de nutrientes e nitrogênio orgânico provenientes de esgoto (Costa Jr. et al., 2006; Costa Jr. et al., 2007). 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%. Além dessa pressão crônica, soma-se o impacto sazonal decorrente do aumento do fluxo turístico durante o período de alta estação (janeiro a março). Apenas no primeiro trimestre de 2025, os operadores locais foram responsáveis pelo transporte de 3.736 visitantes em janeiro, 2.040 em fevereiro e 2.542 em março até os recifes de coral (FUNCITERN, 2025). Esse intenso fluxo, somado à precariedade do saneamento básico, contribui para o incremento da carga de nutrientes no ambiente recifal, potencializando processos de eutrofização e alterando a dinâmica da biomassa fitoplanctônica. Nos Parrachos, as concentrações de ortofosfato (PO_4^{3-}) variaram de 0,001 $\mu\text{mol/L}$ em mar/25 a 0,28 $\mu\text{mol/L}$ em nov/24, não havendo diferença significativa entre os períodos de amostragem ($p < 0,05$). Para o Córrego, os níveis de ortofosfato ocorreram entre 0,01 $\mu\text{mol/L}$ em ago/24, com incremento significativo em mar/25 (máximo de 0,80 $\mu\text{mol/L}$), nov/24 (até 0,56 $\mu\text{mol/L}$) e mai/25 (máximo de 0,54 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,05$). Assim, as entradas de ortofosfato no Córrego não se refletiram nas concentrações desse nutriente no ambiente recifal. O fósforo apresenta um ciclo biogeoquímico fortemente influenciado pela sua associação com partículas minerais e pela complexação com matéria orgânica em ecossistemas aquáticos. Ao ser transportado de um ambiente de baixa força iônica (Córrego) para águas marinhas com elevada força iônica, ocorre a liberação do fósforo de complexos orgânicos e coloidais, favorecendo sua sorção em partículas minerais ou carbonáticas e promovendo sua sedimentação e consequente remoção da coluna d'água (Froelich, 1988; Benitez-Nelson, 2000).

2.2. Clorofila-a A análise da distribuição temporal dos níveis de clorofila-a nos Parrachos mostrou um padrão de decréscimo entre os anos de 2024 a 2025, com destaque para os meses de mai/24 ($0,77 \pm 0,47 \mu\text{g/L}$) e nov/24 ($0,80 \pm 0,37 \mu\text{g/L}$), cujas concentrações foram superiores em comparação às demais campanhas ($p < 0,05$). Já no Córrego, as concentrações variaram de 0,81 $\mu\text{g/L}$ a 7,03 $\mu\text{g/L}$, não sendo observadas diferenças significativas entre as 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) 2.3. Comparação com os padrões de qualidade da água (CONAMA 357/2005) No Córrego, as concentrações de nutrientes permaneceram abaixo dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas doces de Classe 2 (nitrito: 71,4 $\mu\text{mol/L}$; amônio: 264 $\mu\text{mol/L}$; nitrato: 714 $\mu\text{mol/L}$; fósforo total: 1,61 $\mu\text{mol/L}$). Entretanto, observaram-se picos de nitrato (~ 35 $\mu\text{mol/L}$ em março/25) e amônio (~ 22 $\mu\text{mol/L}$ em janeiro/25), possivelmente associado tanto à precariedade do saneamento básico quanto ao aporte sazonal de esgoto e nutrientes durante a alta temporada turística. Essa diferença espacial reforça o papel do Córrego como uma fonte difusa de contaminação, que pode comprometer a qualidade da água nos recifes caso os aportes sejam contínuos e cumulativos. Por outro lado, nos Parrachos a comparação das concentrações com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 (Classe 1 – águas salinas) mostrou que nenhum dos parâmetros analisados ultrapassou os valores máximos permitidos. O nitrito (máx. 0,49 $\mu\text{mol/L}$), o nitrato (máx. 16,2 $\mu\text{mol/L}$), o ortofosfato (máx. 0,28 $\mu\text{mol/L}$) e o amônio (máx. 27,3 $\mu\text{mol/L}$) permaneceram abaixo dos limites de 5; 28,6; 2,0 e 28,6 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Ainda assim, os valores de amônio observados em janeiro de 2025 se aproximaram do limite legal, sugerindo influência direta de aportes antrópicos, possivelmente associados ao lançamento de esgoto doméstico pelo aumento da população transitória durante a estação de alta temporada. Em relação à clorofila-a, os valores oscilaram entre 0,23 e 1,57 $\mu\text{g/L}$, com máximos em mai/24 e nov/24. Embora não exista valor de referência estabelecido pelo CONAMA para águas salinas, esses níveis são compatíveis com ambientes recifais oligotróficos (Peter et al., 2014). Considerando que concentrações acima de 3–5 $\mu\text{g/L}$ são usualmente associadas a processos de eutrofização em recifes de coral (Bell, 1992), os resultados obtidos sugerem que, até o período de estudo, os Parrachos de Rio do Fogo não apresentam sinais críticos de enriquecimento trófico, embora pressões antrópicas crescentes possam alterar esse cenário. 3. 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 CO_2 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.

Conclusão

O presente estudo mostrou variações temporais nas concentrações de nutrientes, especialmente nitrogênio e silicato, tanto nos Parrachos quanto no córrego, às quais foram associadas tanto aos processos naturais quanto às pressões antrópicas na área. Os resultados

apontaram indícios de contaminação nos recifes, principalmente em função do incremento das concentrações de amônio e nitrato em períodos coincidentes com o aumento do aporte continental (decréscimo da salinidade) e a alta temporada turística, quando há aumento da população transitória e, possivelmente, maior lançamento de esgoto doméstico. Existe a hipótese de contaminação dos aquíferos e transporte de nutrientes por descarga submarina de água subterrânea, especialmente considerando a escassez do sistema de esgotamento sanitário reconhecido na região, representado por fossas rudimentares e fossas sépticas. Em médio e longo prazo, esses aportes de nutrientes podem provocar impactos substanciais aos ecossistemas recifais dos Parrachos de Rio do Fogo, através do estímulo ao crescimento de macroalgas em detrimento dos corais construtores. Ressaltamos a importância de um monitoramento na região para fins de subsidiar estratégias de gestão voltadas às melhorias de saneamento básico.

Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard method for examination of water and wastewater. Washington, DC, New York: American Public Health Association, 21st ed., 2005. 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, 1 maio 1992. BELTRÃO, Breno Augusto et al. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, estado do Rio Grande do Norte: relatório diagnóstico do município de Rio do Fogo. [S.l.]: CPRM, 2005. Disponível em: <<http://rigeo.sgb.gov.br/jspui/handle/doc/17070>>. Acesso em: 30 ago. 2025. BENITEZ-NELSON, Claudia R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth Science Reviews*, v. 51, p. 109–135, 1 ago. 2000. BOYER, Elizabeth et al. Antropogenic nitrogen sources and relationships to riverine nitrogen export in the northeastern USA. *Biogeochemistry*, v. 57, p. 137–169, 1 abr. 2002. COSTA, Ozeas et al. Nutrifcation impacts on coral reefs from northern Bahia, Brazil. *Hydrobiologia*, v. 440, p. 307–315, 1 dez. 2000. DIAZ ORTEGA, Geraldine; HERNANDEZ, Edwin. 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, 31 jul. 2014. Eighty years of Redfield | *Nature Geoscience*. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ngeo2319>>. Acesso em: 30 ago. 2025. EZZAT, Leila et al. 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, p. 20150610, 7 ago. 2015. FERRIER-PAGÈS, Christine et al. Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, v. 19, p. 103–113, 1 jul. 2000. FROELICH, Philip N. Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: A primer on the phosphate buffer mechanism. *Limnology and Oceanography*, v. 33, n. 4part2, p. 649–668, 1988. FUNCITERN. Programa de Monitoramento Turístico da Área de Proteção Ambiental dos Recifes de Corais. jan. 2025. 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. GRASSHOFF, K., KREMLING, K., EHRHARDT, M. *Methods of Seawater Analysis*, 3ªed., pp. 159–228. 1999. HASSAN, Rashid M. et al. (ORGS.). *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 DE GESTÃO DAS ÁGUAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE (IGARN). Plano Estadual de Recursos Hídricos: Relatórios HE-1358-R03-0397; HE-1358-R08-1297; HE-1358-R23-0998. Natal:

SEMARH/IGARN, 1997-1998. KERLIN, J.; BARNAS, D.; SILBIGER, N. Conspecific interactions between corals mediate the effect of submarine groundwater discharge on coral physiology. *Oecologia*, v. 207, 15 jan. 2025. LARKUM, Anthony; STEVEN, Andy. ENCORE: The effect of nutrient enrichment on coral reefs. 1. Experimental design and research programme. *Marine Pollution Bulletin*, v. 29, p. 112–120, 31 dez. 1994. LARNED, Scott. Nitrogen-versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae. *Marine Biology*, v. 132, p. 409–421, 1 out. 1998. MCKINNEY, Michael L. <http://www.jstor.org> Is Marine Biodiversity at Less Risk? Evidence and Implications. *Diversity and Distributions*, v. 4, n. 1, p. 3–8, 1998. PETER R. F. BELL; IBRAHIM ELMETRI; BRIAN E. LAPOINTE. 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, abr. 2014. PRINCIPE, Peter et al. Quantifying Coral Reef Ecosystem Services. [S.l.: S.n.]. Rio do Fogo - RN. Infosanbas, [S.d.]. Disponível em: <<https://infosanbas.org.br/municipio/rio-do-fogo-rn/>>. Acesso em: 30 ago. 2025 RIO DO FOGO lindo município do RN - YouTube. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=MXF9FQptLuo>>. Acesso em: 30 ago. 2025. SARMIENTO, Jorge L.; GRUBER, Nicolas. *Ocean Biogeochemical Dynamics*. [S.l.]: Princeton University Press, 2006. SILBIGER, N. J.; NELSON, C. E.; REMPLE, K.; SEVILLA, J. K.; QUINLAN, Z. A.; PUTNAM, H. M.; FOX, M. D.; DONAHUE, M. J. Nutrient pollution disrupts key ecosystem functions on coral reefs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 285, n. 1880, p. 20172718, 2018. SILVEIRA, Ana Beatriz Silva da. Análise da bacia hidrográfica do rio Punaú – Rio Grande do Norte utilizando ferramentas de geoprocessamento. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária, Natal, 2009. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2012 Guidelines for Water Reuse. [S.l.: S.n.]. Rio do Fogo - RN. Infosanbas, [S.d.]. Disponível em: <<https://infosanbas.org.br/municipio/rio-do-fogo-rn/>>. Acesso em: 30 ago. 2025 RIO DO FOGO lindo município do RN - YouTube. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=MXF9FQptLuo>>. Acesso em: 30 ago. 2025.

Anexos

Tabela 1 – Valores mínimo, máximo, médio e desvio-padrão das variáveis físico-químicas nas estações de monitoramento Córrego, Garça e Rastro, no período de maio/2024 a maio/2025.

Figura 1 - Distribuição das estações de coleta nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio do Fogo (RN).

Figura 2 – Pontos de amostragem no córrego de Rio do Fogo (CG01, CG02 e CG03).

Figura 3 – Variação temporal de nutrientes inorgânicos dissolvidos e Clorofila-a no Córrego de Rio do Fogo (RN)

Figura 4 – Variação temporal de nutrientes inorgânicos dissolvidos e Clorofila-a nos Parrachos de Rio do Fogo (RN)

Figura 5 – Matriz de correlação de Pearson entre variáveis físico-químicas e biológicas no recife dos Parrachos de Rio do Fogo (RN).

CÓDIGO: ET1753

AUTOR: YAN XAVIER LINDOLFO BARBOSA

ORIENTADOR: GILBERTO CORSO

TÍTULO: Regularização de traços sísmicos usando Aprendizado de Máquina Não Supervisionado

Resumo

Aquisições sísmicas idealmente usam uma malha regular de fontes e receptores, mas a prática mostra o contrário: limitações operacionais e fatores ambientais (ondas, correntes, obstáculos) geram espaçamentos irregulares que podem comprometer o imageamento. Apresentamos uma abordagem de aprendizado de máquina não supervisionado, que reconstrói traços em posições regulares a partir de registros irregulares. Usamos janelas de cinco traços: quatro vizinhos entram na rede e o traço central é estimado (“regularizado”). A ideia se apoia na Lei dos Grandes Números: com muitos exemplos sintéticos a rede converge para o valor esperado do traço alvo. Geramos dados sintéticos a partir de um modelo de velocidades representativo do pré-sal brasileiro (400 nós no fundo oceânico espaçados 40 m e 30 disparos).

Palavras-chave: Processamento sísmico. Interpolação. Rede neural

TITLE: Seismic Trace Regularization Using Unsupervised Machine Learning

Abstract

Seismic data acquisition ideally places sources and receivers on a regular grid, yet operational constraints and environmental factors (waves, currents, obstacles) introduce spatial irregularity that can degrade subsequent imaging. We present a machine learning approach that reconstructs traces at regular positions from irregular recordings without requiring explicit spatial coordinates. The model processes sliding windows of five traces: four neighboring traces feed the network, which estimates the central trace to be regularized. The method is grounded in the Law of Large Numbers: with a sufficiently large synthetic training set, the network’s prediction converges toward the expected value of the target trace. We generated synthetic data from a velocity model representative of Brazil’s pre-salt province (400 ocean-bottom nodes at 40 m spacing, 30 shots).

Keywords: Seismic processing. Interpolation. Neural network.

Introdução

A aquisição sísmica é uma etapa fundamental na exploração, estudo e monitoramento de estruturas geológicas, sendo amplamente utilizada por companhias offshore em suas pesquisas ambientais. Nesse processo, fontes geram ondas sísmicas que se propagam pelo subsolo, enquanto sensores dispostos na superfície ou no fundo do mar — a depender do tipo

de aquisição — captam essas ondas refletidas pelas camadas geológicas. A distribuição desses sensores, conhecida como grade de aquisição, exerce extrema influência na qualidade dos dados obtidos e, conseqüentemente, na resolução e validação das imagens sísmicas geradas. Uma grade regularmente espaçada facilita o processamento dos dados, tornando-o menos custoso, reduzindo ambigüidades e minimizando ruídos e artefatos relacionados à aquisição.

Diversos fatores logísticos e naturais dificultam a obtenção de uma distribuição ideal dos sensores e, conseqüentemente, impactam a qualidade dos dados sísmicos adquiridos. Obstáculos físicos e ambientais, como o desnível do terreno, a presença de plataformas e estruturas submarinas, fauna sensível e condições adversas de correnteza, impõem restrições à disposição regular dos sensores. Além disso, desafios logísticos, como o difícil acesso a determinadas áreas, limitações no transporte de equipamentos, riscos à equipe de campo, duração prolongada das campanhas de aquisição e falhas ou danos em sensores durante a operação, agravam ainda mais essa problemática. Buscar uma regularidade perfeita na malha de aquisição, além de tecnicamente desafiador, pode tornar os custos operacionais inviáveis. Assim, a aquisição sísmica se assemelha a um jogo de xadrez, no qual é necessário, por vezes, sacrificar algumas peças para viabilizar o processo como um todo.

Entre os métodos clássicos empregados para regularização e interpolação de dados sísmicos, destacam-se as abordagens baseadas em interpolação cúbica e em técnicas espectrais, como a interpolação no domínio frequência-espaco (f - x). A interpolação cúbica busca preencher lacunas entre dados amostrados, assumindo a continuidade e suavidade dos eventos sísmicos (UNSER, 1999). Já os métodos espectrais, como aqueles propostos por Spitz (1991), exploram a coerência dos eventos no domínio das frequências para estimar valores ausentes e minimizar artefatos. No entanto, a eficácia dessas técnicas depende diretamente da precisão na geometria da aquisição. Situações em que a distribuição dos sensores é altamente irregular ou incerta podem comprometer significativamente a qualidade da interpolação, resultando em perda de resolução e distorções nas imagens sísmicas (SPITZ, 1991; HALE, 1980). Diante dessas limitações, torna-se evidente a necessidade de métodos mais robustos, capazes de lidar com geometrias de aquisição imperfeitas e incertezas inerentes ao processo.

Diante desse cenário, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos capazes de compensar as irregularidades na malha de aquisição e garantir a qualidade das interpretações sísmicas. Com a crescente evolução da inteligência artificial, optamos por utilizar técnicas de machine learning com o intuito de minimizar custos e superar as limitações que os métodos convencionais apresentam no processamento de dados afetados por aquisições imperfeitas. O uso de modelos e arquiteturas de redes neurais, que buscam “criar” sensores em posições estratégicas na malha, visa cobrir uma área maior de forma regular, contribuindo de maneira estratégica para o processamento dessas informações.

ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura:

Este projeto reforça o ODS 9 ao estimular inovação e pesquisa aplicada em processamento sísmico, área estratégica para o setor offshore. A solução desenvolvida contribui para tornar a infraestrutura industrial mais eficiente e preparada para desafios tecnológicos.

Metodologia

Dados Sintéticos

Os dados sintéticos empregados neste trabalho foram gerados a partir de um modelo de velocidades representativo de um ambiente típico do pré-sal brasileiro, de modo a reproduzir características geológicas relevantes para a aplicação de técnicas de regularização sísmica. Para cada conjunto de dados, foram produzidas versões regularizadas (com amostragem espacial uniforme) e não regularizadas (com amostragem espacial irregular). Os dados não regularizados serviram como entrada para as redes neurais, enquanto os dados regularizados foram utilizados como referência (ground truth) para a avaliação do desempenho dos modelos de machine learning. A simulação da aquisição sísmica considerou um total de 30 fontes (tiros), responsáveis pela geração dos sinais, e 400 receptores (nodes), posicionados ao longo de uma linha com espaçamento de 30 metros entre eles. Essa configuração visa refletir as condições operacionais encontradas em campanhas reais.

Janela de Traços

Para alimentar as redes neurais, o sismograma foi particionado em janelas compostas por cinco traços consecutivos. A escolha de um número ímpar de traços tem como objetivo garantir que haja um traço central, que é definido como alvo da regularização enquanto os traços vizinhos são utilizados como entrada do modelo. O pré-processamento dos dados incluiu a normalização da amplitude de cada traço e, quando necessário, a remoção de tendências (detrending), visando garantir a consistência estatística entre as amostras apresentadas à rede.

Avaliação Conjunta de Arquiteturas e Pré-processamentos

Para identificar a combinação mais eficaz entre arquitetura de rede neural e abordagem de pré-processamento, conduzimos uma avaliação sistemática cruzando diferentes tipos de redes com diversas estratégias de preparação dos dados. Cada arquitetura foi treinada e avaliada em todos os conjuntos de dados pré-processados, de modo a comparar o desempenho de cada configuração de forma direta.

Foram consideradas as seguintes abordagens de pré-processamento: (i) diferença em relação a uma spline, seguida de normalização pelo valor máximo de cada traço; (ii) diferenciação individual por traço com normalização máxima; (iii) normalização individual por traço, sem aplicação de operador diferencial; e (iv) uma variação adicional da normalização por traço, também sem operador diferencial. Para cada tipo de pré-processamento, as mesmas arquiteturas de rede foram utilizadas, incluindo modelos convolucionais (CNNs), variantes profundas sem camadas de pooling, arquiteturas totalmente conectadas (FCN) e modelos mais compactos.

Esse desenho experimental permitiu analisar, de maneira abrangente, como a escolha do pré-processamento interage com o tipo de rede, possibilitando identificar as combinações mais eficazes para a tarefa de regularização dos traços sísmicos.

Modelo Selecionado

A arquitetura escolhida é composta por camadas totalmente conectadas, com a seguinte configuração: quatro camadas FNN com 8 neurônios cada e uma última camada com 2500

neurônios (o tamanho do traço de saída), todas utilizando a função de ativação ReLU, exceto a camada de saída, que é linear.

Procedimento de Treinamento

O treinamento do modelo foi conduzido utilizando a função de perda erro quadrático médio (MSE). Foi adotada uma taxa de aprendizado inicial de 10⁻³, ajustada dinamicamente por um scheduler, que reduz a taxa em um fator de 0,2 caso a perda de validação não apresente melhora após 25 épocas. O tamanho do batch foi fixado em 32 amostras, e o treinamento foi conduzido por até 700 épocas, com critério de parada antecipada (early stopping) baseado na estabilização da perda de validação.

Fundamentos Estatísticos

A abordagem proposta fundamenta-se na Lei dos Grandes Números, admitindo a hipótese de estacionariedade local dos dados sísmicos. Dessa forma, espera-se que, ao considerar múltiplos exemplos de janelas centradas em um mesmo traço ao longo do treinamento, a estimativa da rede para o traço regularizado convirja para o valor médio verdadeiro, mesmo sem informação explícita de posição espacial.

Resultados e Discussões

A análise dos resultados obtidos evidencia a eficácia das abordagens de regularização baseadas em aprendizado de máquina não supervisionado para reconstrução de traços sísmicos a partir de dados adquiridos em arranjos espaciais irregulares. O uso de dados sintéticos realistas, simulando condições do pré-sal brasileiro, permitiu avaliar de maneira controlada o impacto de diferentes estratégias de pré-processamento e arquiteturas de redes neurais na tarefa de regularização.

Desempenho Geral dos Modelos

De maneira geral, todos os modelos foram capazes de promover melhorias significativas na regularidade dos traços sísmicos, quando comparados à condição original dos dados irregulares. O principal parâmetro de avaliação adotado foi o erro quadrático médio (MSE) entre os traços reconstruídos e os traços de referência (regularizados), permitindo uma comparação objetiva entre diferentes configurações.

Robustez e Generalização

O método demonstrou robustez durante o treinamento, com rápida convergência e baixa incidência de overfitting. O critério de parada antecipada e o ajuste dinâmico da taxa de aprendizado contribuíram para a obtenção de modelos generalizáveis, capazes de atuar em diferentes regiões do modelo sintético sem degradação perceptível no desempenho.

Limitações e Perspectivas

Entre as limitações identificadas, destaca-se a dependência do modelo em relação à escolha da janela de entrada, que pode influenciar a capacidade de reconstrução em regiões com padrões sísmicos altamente heterogêneos. Além disso, embora o método tenha apresentado desempenho consistente em dados sintéticos, sua aplicação a dados reais poderá demandar ajustes adicionais, especialmente no que diz respeito ao tratamento de ruídos não modelados

ou desvios estatísticos não previstos no treinamento. Além disso, ainda é necessário avaliar se o aprendizado da rede pode ser generalizado, ou aproveitado através de Transfer Learning, para outras geometrias de aquisição e para lugares com outras características geológicas.

Conclusão

Os resultados obtidos reforçam o potencial das técnicas de aprendizado de máquina não supervisionado como ferramentas eficazes para regularização de dados sísmicos, especialmente quando combinadas com estratégias de pré-processamento adequadas. A interação entre o tipo de pré-processamento e a arquitetura da rede neural mostrou-se um fator crítico para o sucesso do método, indicando que soluções sob medida podem ser desenvolvidas para diferentes cenários de aquisição e desafios geológicos.

O estudo contribui, assim, para o avanço das metodologias de regularização sísmica, abrindo caminho para aplicações em ambientes reais e para o desenvolvimento de soluções ainda mais robustas e adaptativas no futuro.

Referências

GERON, Aurélien. Hands-On Machine Learning with Scikit-Learn, Keras, and TensorFlow: Concepts, Tools, and Techniques to Build Intelligent Systems. 2. ed. Sebastopol: O'Reilly Media, 2019.

OPPENHEIM, Alan V.; SCHAFER, Ronald W.; BUCK, John R. Discrete-Time Signal Processing. 3. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2010.

BILOTTI, Ricardo. Processamento Sísmico: Conceitos e Práticas. Rio de Janeiro: Interciência, 2022.

HALE, D. Interpolation methods in seismic data processing. SEG Annual Meeting Abstracts, 1980.

SPITZ, S. Seismic trace interpolation in the f-x domain. Geophysics, v. 56, n. 5, p. 785-794, 1991.

UNSER, M. Splines: A perfect fit for signal and image processing. IEEE Signal Processing Magazine, v. 16, n. 6, p. 22-38, 1999.

Anexos

Rede Neural

MSE da Rede

CÓDIGO: HS0107

AUTOR: ANDRIELLY REBECA VENANCIO DE LIMA

ORIENTADOR: ROVENA CLARA GALVAO JANUARIO ENGELBERTH

TÍTULO: Um piloto longitudinal de modelo para estresse crônico social: diferenças ontogenéticas e sexuais

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, a idade também influencia: jovens, ainda em fase de construção de vínculos sociais e desenvolvimento, e idosos, que já têm uma rede de apoio mais restrita, são mais sensíveis ao isolamento. O objetivo deste estudo é desenvolver um protocolo de estresse social crônico e investigar como sexo e idade influenciam as respostas comportamentais ao isolamento. Para isso, os sujeitos experimentais desses estudos serão ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos e fêmeas divididos em grupos controle e experimental da seguinte forma: Grupo isolamento social (G1); Grupo naïve (G2); Grupo isolamento social + fármaco (G3). 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 análises estatísticas serão realizadas usando STATISTICA statsoft®.

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

TITLE: A Longitudinal Pilot Model of Chronic Social Stress: Ontogenetic and Sex Differences

Abstract

Prolonged social isolation, such as that experienced during the pandemic, functioned as a chronic stressor with a significant impact on mental health. The lack of social interaction deeply affected people's behavior and has been associated with increased symptoms of anxiety and depression. However, stress responses are not uniform across individuals: for example, women tend to be more vulnerable to these disorders, possibly due to the influence of sex hormones on the stress-response system, such as the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Additionally, age is also a determining factor: young individuals, who are still developing social bonds and undergoing emotional development, and older adults, who typically have a more limited support network, are more susceptible to the effects of isolation.

The aim of this study is to develop a chronic social stress protocol and investigate how sex and age influence behavioral responses to isolation. To this end, the experimental subjects will be male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), divided into control and experimental groups as follows: Social Isolation Group (G1); Naive Group (G2); Social Isolation + Drug Group (G3). These groups will be duplicated to account for both age and sex. The behavioral tasks to be assessed include forced swim test, sucrose splash test, social interaction, open field test, and discriminative avoidance. Statistical analyses will be conducted using STATISTICA® (StatSoft).

Keywords: Stress. Isolation. Depression. Sex differences. Ontogeny.

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. Além disso, o estresse está fortemente associado à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático-adrenal 9. Disfunções no mecanismo de retroalimentação negativa e níveis elevados de cortisol sustentam a teoria neuroendócrina da depressão 10, 11,12,13. 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.

Alguns fatores podem influenciar a resposta ao estresse social e o desenvolvimento da depressão. Dentre esses fatores pode-se citar variações sexuais 28, 29, 30. Essas diferenças são perceptíveis em modelos animais de acordo com o tipo de estressor utilizado 31, 32 o qualas fêmeas apresentam uma maior sensibilidade ao estresse relacionado ao isolamento

social do que machos. A variação da resposta ao estresse pode estar relacionada à flutuação hormonal observada em roedores 33. Os hormônios sexuais, como estrogênio, podem modular a atividade neural em regiões do cérebro importantes para regulação do humor 24.

Além disso, o impacto do estresse social pode variar de acordo com a idade, influenciando tanto na resposta neuroendócrina quanto comportamental 34, 35. Em idosos, o estresse comporta-se como fator de risco relacionado ao desenvolvimento de depressão neste grupo 36. As modificações funcionais, metabólicas, físicas e cognitivas provenientes do processo de envelhecimento podem ser intensificadas pelo estresse crônico, incluindo maior produção de cortisol e inflamação 37. Em ratos jovens, é observado déficits cognitivos e aumento da temperatura corporal, enquanto idosos mostraram-se hiperresponsivos no comportamento 35. Na literaturanão se tem um estudo conjunto que tente avaliar nesses grupos a neurobiologia do estresse crônico social, e por isso esse é o objetivo desse plano de trabalho.

Metodologia

Sujeitos da pesquisa:

Serão utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) 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 isolamento social (G1); Grupo naive (G2); Grupo isolamento social + fármaco (G3)- 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 38. Enquanto isso, os animais do grupo controle irão permanecer em suas gaiolas. A condição de isolamento persistirá até 24h antes das tarefas comportamentais.

Tarefas comportamentais e Fármaco:

Serão utilizados alguns testes já validados pela literatura, a saber - teste de nado forçado 39 ;respingo de sacarose 40; teste de interação social 41 e teste de respingo de sacarose 41. 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 42. 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) 43 e o teste de reconhecimento de objetos 44, 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 (η^2). Os resultados são expressos como média $\pm$ 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

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 observar diferenças sexuais sob o comportamento depressivo pelo estresse social. Estudos têm evidenciado diferenças entre os sexos na resposta ao estresse causado pelo isolamento social, observando-se que as fêmeas tendem a apresentar comportamentos semelhantes aos sintomas depressivos após a exposição a esse tipo de estressor 45, características que não foram totalmente compreendidas em machos 46,47.

Ademais, é esperado observar diferenças na resposta ao estresse social entre ratos jovens e idosos. Animais isolados mais jovens apresentaram aumento significativo do tempo de imobilidade, enquanto os mais velhos não apresentaram diferença, sugerindo maior vulnerabilidade ao estresse social em fases mais precoces da ontogenia 38. Entretanto, em humanos, o prejuízo do isolamento social em idosos estaria relacionado com a potencialização dos déficits já associados ao envelhecimento e aumento do risco para o desenvolvimento de diversas doenças, tanto físicas quanto mentais 48,34,49.

Conclusão

Na literatura, é observada majoritariamente a utilização de machos e ratos jovens adultos para o entendimento do estresse social, sendo escassos os estudos que analisem as diferentes respostas do estresse por isolamento social em fêmeas e idosos. Com isso, a investigação da neurobiologia do estresse crônico social, considerando que a idade e o sexo podem influencia-los é importante para entender como o isolamento social, vivido durante a pandemia contribuiu para o desenvolvimento e aumento exponencial da depressão, e como as mulheres são mais sensíveis a esse tipo de estressor. O reconhecimento do estresse social como fator de risco para o desenvolvimento dos transtornos neuropsiquiátricos permite

direcionar e integrar intervenções não farmacológicas, que possam tornar mais eficaz o tratamento da depressão.

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 freastes on the heat. *American Journal of Psychiatry*, v. 172, n. 11, p. 1075-1091, 2015.
- 8- KUHLA, A. et al. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PloS one*, v. 8, n. 7, 2013.
- 9- 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.
- 10- Hollanders, J. J., van der Voorn, B., Rotteveel, J., & Finken, M. J. J. (2017). Is HPA axis reactivity in childhood gender-specific? A systematic review. *Biology of Sex Differences*, 8(1), Article 23. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0144-8>
- 11- JURUENA, M. F. et al. Different responses to dexamethasone and prednisolone in the same depressed patients. *Psychopharmacology*, v. 189, n. 2, p. 225-235, 2006.
- 12- COWEN, P. J. Not fade away: the HPA axis and depression. *Psychological medicine*, v. 40, n. 1, p. 1-4, 2010.
- 13- NUMAKAWA, T. et al. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC- γ signaling for glutamate release via a glutamate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 2, p. 647-652, 2009.
- 14- KELLER, J. et al. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular psychiatry*, v. 22, n. 4, p. 527-536, 2017.
- 15- LEE, Jae-Young; LEE, Hyun-Kyung. Gut microbiota and pathophysiology of depressive disorder. *Journal of Clinical Neurology*, Seoul, v. 17, n. 4, p. 469-480, 2021.
- 16- CARLESSI, Anelise S et al. Gut microbiota-brain axis in depression: The role of neuroinflammations, the european journal of neuroscience vol 53,1 (2021)
- 17- EVRENSSEL, 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 - KUDIELKA, B. M.; WUST, S. Sex differences in stress responses. Psychoneuroendocrinology, v. 35, n. 4, p. 615-631, 2010.

29- KANG, H-J et al. Sex differences in the genetic architecture of depression. Scientific reports, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.30-MERCHANT, H.; KHAR, P. B. Depression: Unraveling the gender differences. 2021.31- KENNETT, G. A. et al. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. Brain research, v. 382, n. 2, p. 416-421, 1986.

32- PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different?. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 25, n. 3, p. 219-233, 2001.

33- Rocks, D., & Kundakovic, M. (2023). Hippocampus-based behavioral, structural, and molecular dynamics across the estrous cycle. Journal of Neuroendocrinology, 35(2), Article e13216. <https://doi.org/10.1111/jne.13216>.34 -GARDINER, C.; GELDENHUYS, G.; GOTT, M. Intervenções para reduzir o isolamento social e a solidão entre os idosos: uma revisão integrativa. Saúde e Assistência Social na Comunidade, v. 26, n. 2, p. 147-157, 2018.

.35- BOLAND, E. M. et al. Aged rats are hypo-responsive to acute restraint: implications for

- psychosocial stress in aging. *Neurobiology of Aging*, v. 35, n. 6, p. 1425-1434, 2014. 36- LEVKOVICH, I.; SHINAN-ALTMAN, S.; ESSAR SCHVARTZ, N.; ALPERIN, M. Depressão e qualidade de vida relacionada à saúde entre pacientes idosos durante a pandemia de COVID-19 em Israel: um estudo transversal. *Journal of Primary Care & Community Health*, v. 12, 2021. DOI: 10.1177/2150132721995448. PMID: 33576290; PMCID: PMC7883147.37- LUPIEN, S. J. et al. Stress, aging, and the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009.
- .38- 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. 2.39 - 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, 1977.40- 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, 2009.41- 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. 42- ROYCE, J. R. On the construct validity of open field measures. *Psychological Bulletin*, [s. l.], 1977. (Artigo em publicação em 1977).

CÓDIGO: HS0340

AUTOR: JOSIVAN BERNARDINO SILVA DE FRANCA

ORIENTADOR: ROVENA CLARA GALVAO JANUARIO ENGELBERTH

TÍTULO: Enriquecendo e fortalecendo: Efeitos do enriquecimento ambiental e terapia de luz azul sobre aspectos cognitivos e emocionais de ratos machos e fêmeas, jovens e idosos

Resumo

O envelhecimento representa um processo natural, inevitável 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 emocional observado em indivíduos idosos ao decorrer do aumento da idade. Nesse sentido, diversas terapias alternativas têm se destacado como mecanismos de intervenção, como por exemplo o enriquecimento ambiental e a fototerapia utilizando luz azul, que vem mostrando resultados positivos no controle do declínio cognitivo. O objetivo deste trabalho é avaliar e comparar os efeitos do enriquecimento ambiental e da terapia de luz azul sobre os domínios cognitivos e emocionais de ratos machos e fêmeas, jovens e idosos. Para o grupo de enriquecimento ambiental, serão utilizados como itens brinquedos de madeiras, túneis de plástico e cobertura de cama extra. Já para o grupo luz azul, o ciclo será de C-C-E de 6:6:12, sendo às 6 primeiras horas da fase clara a luz branca enriquecida com luz azul de baixa intensidade, e os demais grupos em um ciclo de C-E de 12:12 para evitar vieses. Todos os grupos passaram por uma avaliação comportamental nos testes de campo aberto, reconhecimento de objeto e esquila discriminativa em labirinto em cruz elevada e ao final dos testes comportamentais, todos os animais terão seus cérebros removidos para análise dos níveis de expressão de substâncias neuroquímicas em áreas como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala.

Palavras-chave: Envelhecimento. Cognição. Enriquecimento ambiental. Diferenças sexuais.

TITLE: Enriching and strengthening: Effects of environmental enrichment and blue light therapy on cognitive and emotional aspects of young and old male and female rats

Abstract

Aging represents a natural, inevitable, and progressive process that affects living organisms individually. The morphological and functional changes that characterize aging are related to the cognitive and emotional decline observed in elderly individuals as age increases. In this sense, various alternative therapies have emerged as intervention mechanisms, such as

environmental enrichment and blue light phototherapy, which have shown positive results in controlling cognitive decline. The objective of this work is to evaluate and compare the effects of environmental enrichment and blue light therapy on the cognitive and emotional domains of young and elderly male and female rats. For the environmental enrichment group, wooden toys, plastic tunnels, and extra bed covers will be used as items. For the blue light group, the cycle will be of C-C-E 6:6:12, with the first 6 hours of the light phase having white light enriched with low-intensity blue light, and the other groups in a C-E cycle of 12:12 to avoid biases. All groups will undergo behavioral evaluations in open field tests, object recognition, and discriminative avoidance in elevated plus-maze. At the end of the behavioral tests, all animals will have their brains removed for analysis of neurochemical substance expression levels in areas such as the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala.

Keywords: Aging. Cognition. Environmental enrichment. Sexual differences.

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 processo. Algumas dessas teorias possuem embasamento em aspectos evolutivos caracterizados pela ação da seleção natural, ao passo que outras são formadas tendo como base aspectos sistemáticos e moleculares, como por exemplo a formação de radicais livres e o encurtamento dos telômeros.^{1,2} 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. Nessa perspectiva, a utilização da terapia de luz azul pode auxiliar na comparação de desempenho nas atividades comportamentais.

A fototerapia utilizando luz azul possui aspectos positivos no desempenho cognitivo como mostrado em estudos que avaliaram a realização de tarefas que demandam atenção sustentada, assim como também demonstrado em trabalhos que avaliaram a memória de trabalho através de testes comportamentais.¹² Muitas dessas melhorias cognitivas dependem da qualidade do sono, o que se relaciona diretamente com o padrão rítmico de atividade e repouso do organismo ao longo das 24 horas.¹³

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 e diferentes sexos.

Metodologia

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, jovens e idosos com 4 e 16 meses de idade (300g-600g), respectivamente, serão utilizados para a realização desse estudo. O número total de animais necessários para a realização do estudo, segundo a análise de poder vista no software Gpower 3.1.9.4, é de 304 animais. No entanto, um total de 192 animais seria suficiente, haja vista que serão necessários 12 animais em cada grupo controles e tratados para

ambos os sexos, divididos de forma aleatória, como sugerido nos trabalhos de (Birch & Kelly, 2018; Linhares, 2018; Silva et al., 2023; Stein et al., 2016), ficando apenas um animal em cada caixa. Antes do início dos experimentos, os animais ficarão no biotério experimental do LENq sob condições controladas de temperatura ($\sim 23^{\circ}\text{C}$), umidade do ar em torno de 60% e ciclo claro-escuro (C-E) de 12:12 horas, com as luzes sendo acesas às 06 horas e apagadas às 18

horas.

Os animais não serão submetidos a restrição quanto à disponibilidade de água e alimento, e serão alojados em caixas de polipropileno (32 x 39 x 16,5 cm) de forma individual. Todos os animais serão sempre manipulados por um único responsável nos dias de manutenção e controle do ciclo estral, no caso das fêmeas, para evitar fatores estressantes. Ao longo dos experimentos, todos os animais serão pesados antes e após cada etapa experimental, com

objetivo de verificar possíveis variações do peso. O enriquecimento ambiental e a terapia de luz azul ocorrerão na sala de avaliação cronobiológica, sob temperatura constante $23^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ e umidade relativa do ar em volta de 60%, com isolamento parcial para o som e total quanto a

iluminação externa e interna. Como os animais que receberão o tratamento de luz azul ficarão na caixa de ritmo, os animais destinados ao enriquecimento ambiental também serão submetidos ao mesmo ambiente para evitar vieses. Para o grupo luz azul, o ciclo será de C-C-E de 6:6:12, sendo às 6 primeiras horas da fase clara a luz branca enriquecida com luz azul de baixa intensidade, com aproximadamente 150 lux e dentro do comprimento de onda correspondente à 470-490 nm. Para o enriquecimento ambiental, serão utilizados como itens brinquedos de madeiras, túneis de plástico e cobertura de cama extra (Ali et al., 2021; Birch & Kelly, 2018; Singhal et al., 2019). Na sala de realização dos testes comportamentais, todos os animais (grupos controles e grupos experimentais), serão submetidos ao teste de campo aberto para habituação com o aparato, reconhecimento de objeto (fase de familiarização e teste), e teste de esquivas discriminativas em labirinto em cruz elevada (fase de treino e teste), respectivamente. Os animais serão divididos entre os grupos e os testes serão realizados sempre às 07 horas, com exceção do teste de reconhecimento de objeto que será realizado às 07 horas e às 19 horas. O teste de campo aberto e reconhecimento de objetos serão realizados em um aparato circular de fundo escuro, com 90 cm de diâmetro e 55 cm de altura, onde será avaliado a ação exploratória e tempo de permanência nas zonas (externa, intermediária e central), a capacidade locomotora e a memória de reconhecimento dos animais. Os protocolos serão baseados nos trabalhos de (Aykan et al., 2024; Birch & Kelly, 2018; Hamezah et al., 2017; Silva-Almeida et al., 2024). Esses testes terão duração de 5 minutos cada etapa e a fase de teste para o reconhecimento do objeto será realizada 12 horas após a fase de familiarização. A realização do teste de esquivas discriminativas em labirinto em cruz elevada será ocorrerá com base no protocolo desenvolvido por (Silva et al., 2002; Silva & Frussa-Filho, 2000), para avaliar os aspectos emocionais e aprendizagem dos animais. Esse aparelho consiste em 4 braços, 2 abertos e 2 fechados (49 x 13 x 40 cm) que formam um ângulo de 180 graus, sendo um dos braços fechados considerado aversivo, o qual contará com um estímulo luminoso e sonoro (80 dB e 100 watts). O tempo total de duração do teste será de 5 minutos para cada animal em cada uma das fases. Os testes serão registrados com câmera digital instalada sobre os aparelhos, onde os parâmetros comportamentais serão verificados através do programa ANY-maze. Tanto os aparatos quanto os objetos utilizados serão limpos com álcool 5% visando a eliminação de pistas olfativas. Além disso, todos os animais serão levados para a sala de realização dos testes 30 minutos antes de seu início, para a climatização. Ao final dos testes comportamentais, todos os animais serão perfundidos para fixação do tecido e seus cérebros serão removidos para análise neuroquímica. Para análise imunohistoquímica será utilizado o método AB (Engelberth et al., 2017; Linhares et al., 2022), no qual será possível verificar os níveis de expressão de substâncias neuroquímicas como GFAP, Neu-N, OX42, Iba I e doublecortin, coradas com Nissl para marcação de células neuronais e da glia.

Após essa etapa, as lâminas serão montadas com as devidas secções para posteriormente serem visualizadas e analisadas em microscópio óptico sob iluminação clara (Olympus Microscope, BX-41). As imagens serão capturadas utilizando câmera digital (Nikon, DXM-1200) acoplada ao microscópio para que a análise morfométrica seja realizada, sendo as localizações das áreas determinadas através do atlas Paxinos e Watson (2007). O software imageJ será utilizado para a análise das imagens obtidas e auxiliar na contagem de células e delimitação dessas áreas como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala.

Para verificação dos dados de todos os testes, será realizada uma análise prévia de normalidade através do teste de Shapiro Wilk. Todos os dados serão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Para dados com distribuição normal, será utilizada ANOVA

multivariada seguida do teste post hoc de Tukey. O teste t student não pareado será utilizado para amostras de grupos diferentes. O nível de significância considerado será de $p < 0,05$, e o GraphPad Prism

8 será o software utilizado para as análises

Resultados e Discussões

Até o momento não foi realizada a análise estatística dos dados, no entanto é esperado um aumento na interação animal-ambiente naqueles que passaram pelo protocolo de enriquecimento ambiental quando comparado com o grupo controle.⁸ Já em relação aos animais que passaram pelo protocolo de luz azul, é esperado uma robustez no padrão de atividade e repouso desses animais quando comparados com o grupo controle.¹² Sendo assim, é esperado que ambas as terapias apresentem resultados significativos nos testes comportamentais quando comparados com os respectivos grupos controles.

Tendo em vista que o envelhecimento é um fator que contribui para o declínio das funções cognitivas, a avaliação dos efeitos das diferentes terapias em diferentes idades pode auxiliar no entendimento das particularidades da senescência. É esperado que apesar da idade avançada desses animais, ambas as terapias possam promover uma estabilização ou até mesmo uma melhora nas funções cognitivas analisadas, tendo em vista que alguns estudos publicados demonstraram um aumento no nível de neurotransmissores e na neurogênese.^{7,12}

No que diz respeito às diferenças sexuais, ainda é observado algumas lacunas que impossibilita o entendimento da interação dos diferentes hormônios sexuais com os protocolos terapêuticos apresentados neste estudo. Com isso, espera-se observar uma diferença significativa entre machos e fêmeas, tendo em vista que a testosterona e estrógeno possuem ação em vários tecidos e órgãos de maneira distinta, principalmente no sistema nervoso, onde atuam como marcadores principais na diferenciação sexual do cérebro.¹⁴

Conclusão

O presente estudo busca investigar os efeitos do enriquecimento ambiental e da terapia de luz azul sobre os aspectos cognitivos e emocionais em diferentes idades e diferentes sexos. Os resultados esperados poderão oferecer dados para um melhor entendimento dos mecanismos neurobiológicos por trás dos efeitos observados, além de auxiliar na padronização dos protocolos a fim de maximizar os benefícios promovidos pelo uso das terapias. Assim, este estudo reforça a importância da utilização de terapias não invasivas como ferramentas para mitigar o declínio cognitivo e emocional ao longo do envelhecimento em diferentes sexos.

Referências

1. Bwiza, C., Son, J., & Lee, C. (2019, July 29). Integrated Theories of Biological Aging. Oxford Research Encyclopedia of Psychology. Retrieved 26 Aug.2023,from

<https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190236557.013.334>

2. Teixeira, 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>
3. 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_ALEXANDRA_NASCIMENTO_ALVES.pdf
4. De 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
5. 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/>
6. 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>
7. 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.101923>
8. Birch, 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>
9. Baliai, 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>
10. 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>
11. 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>
12. Silva, E. H. A., Santana, N. N. M., Seixas, N. R. M., Bezerra, L. L. F., Silva, M. M. O., Santos, S. F., ... & Engelberth, R. C. (2023). Blue light exposure-dependent improvement in robustness of circadian rest-activity rhythm in aged rats. *Plos one*, 18(10), e0292342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292342>

13. Zhong, H. H., Yu, B. O., Luo, D., Yang, L. Y., Zhang, J., Jiang, S. S., ... & Yang, S. L. (2019). Roles of aging in sleep. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 98, 177-184.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.01.013>
14. Gund, B., & Hamdan, A. C. (2024). Diferenças entre homens e mulheres na saúde cognitiva e sexual durante o envelhecimento: revisão sistemática. *Psicologia Argumento*, 42(118).

CÓDIGO: HS0436

AUTOR: RICK JOB SANTOS PEREIRA DA SILVA

COAUTOR: IGOR ELOI MOREIRA

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Se falta satisfação, falta motivação? A relação entre sinalização de opioide endógenos e forrageio em formigas gigantes (*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 o seu bloqueio com Naloxona (NAL) diminui a exploração. Para testar essa hipótese, 72 operárias forrageadoras de *D. quadriceps* receberam diferentes dosagens de NAL (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 o grupo controle apresentava, predominantemente, comportamento de caminhada (exploração), os grupos submetidos à cirurgia e à NAL exibiram maior incidência de limpeza, sugerindo estereotipia por estresse. Notavelmente, todas as dosagens de NAL causaram uma diminuição significativa na locomoção e, conseqüentemente, na exploração do ambiente. Essas descobertas corroboram estudos prévios e sugerem que a NAL inibe a motivação para a exploração, mimetizando o comportamento de operárias inativas. 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. Naloxona. Neuropeptídeo.

TITLE: IF LACK SATISFACTION, LACK MOTIVATION? THE RELATIONSHIP BETWEEN ENDOGENOUS OPIOID SIGNALING AND EXPLORATION IN GIANT ANTS (*DINOPONERA QUADRICEPS*).

Abstract

This study investigated the relationship between endogenous opioid signaling and exploratory behavior in giant ants (*Dinoponera quadriceps*). Exploration, a component of foraging, is a motivated behavior regulated by neural reward systems, such as the endogenous opioid system (EOS). Although the EOS is supposedly absent in invertebrates, previous studies have indicated that blocking the EOS with Naloxone (NAL) decreases exploration. To test this hypothesis, 72 foraging workers

of *D. quadricaps* were treated with different dosages of NAL (0,005 g/ml, 0,01 g/ml, 0,02 g/ml), in addition to control groups. The ants were anesthetized and the solution was administered intracranially. Their behaviors were filmed and analyzed. The results showed that while the control group predominantly exhibited walking behavior (exploration), the groups that underwent surgery and were treated with NAL showed a higher incidence of grooming, suggesting stress stereotypy. Notably, all NAL dosages caused a significant decrease in locomotion and, consequently, in environmental exploration. These findings corroborate previous studies and suggest that Naloxone inhibits the motivation for exploration, mimicking the behavior of inactive workers. Despite the absence of exclusive EOS receptors in invertebrates, the results indicate an effect of endogenous opioid signaling, possibly through the binding of neuropeptides to receptors in other neural pathways.

Keywords: Exploration. Ponerinae. Naloxone. Neuropeptide.

Introdução

Na etologia, 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, a exploração pode se 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 quadricaps* (Lanam, 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 todo a ação 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 baratas *Periplaneta americana*, em que elas diminuíram a exploração e perderam o apetite após receberem dosagens do medicamento Naloxona (NAL), antagonista sintético das moléculas de endorfina, que atua como bloqueador de amplo espectro do SOE, se acoplando temporariamente aos receptores dessas moléculas e inibindo a ação delas (Kavaliers et al., 1986). 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 das formigas e de “lazy ants” (inativas que servem como trabalhadoras reserva) (Charbonneau et al., 2017a; Charbonneau et al., 2017b). 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. quadriciceps* 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 NAL num ambiente sem pistas químicas, em laboratório.

Metodologia

Procedimento experimental

Foram utilizadas 72 operárias forrageadoras de *Dinoponera quadriciceps* (méd. peso = 0,334g) (Azevedo, 2014) de três colônias (24 operárias por colônia), coletadas na Floresta Nacional de Nísia Floresta (6°5'S, 35°12'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 aclimação 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 naloxona 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 naloxona, 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 naloxona 1 (NAL 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 naloxona. Após a injeção o orifício era fechado com resina.
- Grupo naloxona 2 (NAL 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 naloxona. Após a injeção o orifício era fechado com resina.
- Grupo naloxona 3 (NAL 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 naloxona. 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 cm 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 vídeos 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 Naloxona, foram construídos modelos lineares mistos.

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 demais grupos (cirurgia; cirurgia + salina; Nal 0,005; Nal 0,01; Nal 0,02), o comportamento com maior incidência foi o de limpeza (Figura 3), 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, o efeito do bloqueador de SOE em todas as dosagens (0,005 g/ml, 0,01 g/ml, 0,02 g/ml), apresentou significativa diminuição na locomoção dos indivíduos em comparação aos demais tratamentos (Figura 4), resultando numa redução da exploração do ambiente pelos insetos. Kavaliers et al. (1986) testou a mesma inibição do sistema de satisfação em baratas *Periplaneta americana*, obteve resultados similares aos nossos e os associou ao desfalque de motivação. Além disso, essa diminuição da exploração também pode ser explicada pelo papel dos neuropeptídeos como potenciais moduladores de transição comportamental em formigas (Habenstein et al. 2021), pois as interferências feitas nessas moléculas, nas forrageadoras, tornaram seus comportamentos semelhantes ao padrão da “lazy ants”, que são caracterizadas por permanecerem majoritariamente inativas (Charbonneau et al., 2017a; Charbonneau et al., 2017b).

Por fim, nossos resultados são intrigantes, tendo em vista que Elphick et al., (2018); Mirabeau & Joly (2013) apontam o surgimento do SOE, geneticamente, a partir dos vertebrados. Nossos resultados apontam modificações comportamentais por provável impedimento da ligação 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 do bloqueio da sinalização de opioides endógenos no comportamento das formigas forrageadoras da espécie *Dinoponera quadricaps*, mostrando a diminuição em seu ato de 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 quadricaps*. 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 quadricaps*. *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>.

CHARBONNEAU, D. et al. Who Are the “Lazy” Ants? The Function of Inactivity in Social Insects and a Possible Role of Constraint: Inactive Ants Are Corpulent and May Be Young and/or Selfish. *Integrative and Comparative Biology*, v. 57, n. 3, p. 649–667, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/icb/ix029>.

CHARBONNEAU, D.; SASAKI, T.; DORNHAUS, A. Who needs ‘lazy’ workers? Inactive workers act as a ‘reserve’ labor force replacing active workers, but inactive workers are not replaced when they are removed. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184074>.

ELPHICK, M. R.; MIRABEAU, O.; LARHAMMAR, D. Evolution of neuropeptide signalling systems. *Journal of Experimental Biology* Company 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>.

HABENSTEIN, J.; THAMM, M.; RÖSSLER, W. Neuropeptides as potential modulators of behavioral transitions in the ant *Cataglyphis nodus*. *Journal of Comparative Neurology*, v. 529, n. 12, p. 3155–3170, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.25166>.

KAVALIERS MARTIN; ANN GUGLICK MARY; HIRST MAURICE. OPIOID INVOLVEMENT IN THE CONTROL OF FEEDING IN AN INSECT. *Life Sciences*, v. 40, p. 665–672, 12 nov. 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90268-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90268-2).

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, 2025.

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, 2025.

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, 2025.

Figura 4. Comparação entre a velocidade média de movimentação das formigas de diferentes tratamentos e o grupo Controle. Legenda: Os círculos cinzas representam observações, enquanto as barras de erro representam intervalos de confiança da média. Fonte: a

Tabela 1 - Comportamentos observados durante o estudo. Fonte: Autoria própria, 2025

CÓDIGO: HS0452

AUTOR: MARÍLIA SOARES FERNANDES

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: HÁ O EMPREGO DE SOLUÇÕES SUBÓTIMAS NA TOMADA DE DECISÃO POR D. QUADRICEPS?

Resumo

Este estudo investigou o uso de estratégias heurísticas em operárias de *Dinoponera quadriceps* durante o forrageamento, buscando entender a frequência, eficiência e evidência de uso dessas estratégias. Em um labirinto em forma de "Y", 38 formigas foram submetidas a 6 ensaios sequenciais, onde a posição da oferta alimentar era alternada. As estratégias classificadas foram "go last" (retornar ao último local de sucesso) e "go different" (escolher o lado oposto ao último local de sucesso). Os resultados indicaram que ambas as estratégias foram utilizadas proporcionalmente. Contudo, a estratégia "go different" demonstrou maior taxa de sucesso. Foi observado que há transições flexíveis entre as heurísticas, com as formigas mudando de estratégia com base nos resultados anteriores (61,3% para "go different" após erro em "go last"; 57% para "go last" após "go different"). Apesar da flexibilidade individual, não houve evidência de aprendizado ao longo das sessões. Concluímos que as operárias de D. quadriceps exibem fidelidade ao local, mas também flexibilidade cognitiva ao alternar estratégias individualmente, baseadas no último resultado de forrageamento, sem influência colonial. Os resultados contribuem para compreender mecanismos básicos de resolução de problemas em ambientes complexos e sugerem a necessidade de futuras pesquisas em ambientes naturais.

Palavras-chave: Ponerinae. Cognição. Heurística. Solução de problemas.

TITLE: IS THERE EMPLOYMENT OF SUBOPTIMAL SOLUTIONS IN DECISION-MAKING BY D. QUADRICEPS?

Abstract

This study investigated the use of heuristic strategies in *Dinoponera quadriceps* workers during foraging, aiming to understand the frequency, efficiency, and evidence of use of these strategies. In a "Y"-shaped maze, 38 ants were subjected to 6 sequential trials, where the position of the food offering was alternated. The strategies classified were "go last" (returning to the last successful location) and "go different" (choosing the opposite side to the last successful location). The results indicated that both strategies were used proportionally. However, the "go different" strategy demonstrated a higher success rate. Flexible transitions between heuristics were observed, with ants changing strategies based on previous results (61.3% to "go different" after error in "go last"; 57% to "go last" after "go different"). Despite individual flexibility, there was no evidence of learning throughout the sessions. We conclude that D. quadriceps workers exhibit site fidelity, but also cognitive flexibility by individually alternating strategies based on the last foraging outcome, without colonial influence. These

results contribute to understanding basic problem-solving mechanisms in complex environments and suggest the need for future research in natural environments.

Keywords: Ponerinae. Cognition. Heuristics. Problem-solving.

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). Esse tipo de estudo contribui para aplicações em diversas áreas, desde a biologia teórica até robótica (Denebourg & Goss, 1989).

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). 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, aqui objetivou-se responder três perguntas: (1) qual estratégia heurística foi utilizada com maior frequência pelas formigas (2) qual estratégia foi mais eficiente e (3) se houve evidência de aprendizagem, manifestada pela mudança na escolha da estratégia ao longo dos ensaios.

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” (figura 1). O tronco do labirinto 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 usadas 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: $0,11 \pm 0,027$ 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.

Estratégias heurísticas testadas

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).

Análise de dados

Todas as análises foram realizadas usando o *software* R, e assumiram um nível de significância de 0,05. Para investigar qual das estratégias é mais usada pelas formigas, foi construído um modelo linear generalizado misto (glmm), usando o pacote glmmTMB (McGillcuddy et al., 2025), sob distribuição Poisson generalizada. Para corrigir a interdependência entre as observações, incluímos a identidade individual dos sujeitos experimentais como fator randômico. Já para averiguar qual das estratégias resultou em maior taxa de sucesso (Proporção de acertos), foi construído um glmm sob distribuição Gaussiana. Para avaliar se há evidências de aprendizado ao longo do experimento,

construímos um glmm sob distribuição Binomial, onde a estratégia escolhida foi modelada em função da sequência de ensaios. Para todos os modelos, a adequação dos resíduos foi inspecionada usando o pacote DHARMA (Hartig, 2024). Para averiguar qual a probabilidade das operárias mudarem de estratégia, foi construída uma cadeia de Markov.

Resultados e Discussões

Primeiramente, foi analisado se havia diferença na frequência da estratégia utilizada pelas formigas, sendo possível observar que o uso das estratégias “go last” e “go different” fora utilizado de forma proporcional, sem que nenhuma se sobressaísse à outra entre colônias ($\chi^2=0,19$, $P = 0,66$) (figura 3). Na etapa seguinte do estudo buscamos identificar a estratégia mais bem sucedida entre os indivíduos testados, considerando como sucesso a escolha correta da localização da oferta na primeira tentativa (direita ou esquerda). Os resultados indicaram que as formigas que adotaram a estratégia “go different” obtiveram uma maior proporção de acertos em suas tentativas se comparadas com aquelas que utilizaram “go last” ($\chi^2=19,79$, $P < 0,001$) (figura 4), o que se alinha ao modelo de experimento alternado empregado.

Nas formigas, é comum que forrageadoras que tiveram sucesso na busca por alimento retornem exatamente ao local onde encontraram recursos ou pontos próximos, esse comportamento é conhecido como “site fidelity” (Traniello, 1989), isso pode ajudar a explicar grande parcela de emprego da estratégia de “go last” adotada pelos indivíduos submetidos ao labirinto ao retornarem ao lugar onde encontraram a recompensa pela última vez. Assim como o “site fidelity”, uma estratégia também observada em outro estudo e em nossos experimentos é o “go different”, onde as formigas apresentaram variações entre si nas formas de resolver o mesmo problema, não retornando ao lugar que obtiveram recompensa da última vez (Oberhauser, et al., 2020). Segundo Oberhauser et al., as formigas tendem a recorrer a heurísticas diante de desafios complexos, indicando que, enquanto algumas seguem uma estratégia específica outras podem adotar abordagens distintas. O fato de ambas as estratégias surgirem de forma equilibrada nos resultados do experimento entre as colônias sugere que essas variações são heurísticas usadas oriundas de fatores individuais, – possivelmente de aprendizado – baseadas em reforços positivos ou negativos vivenciados pelas formigas durante o experimento (Harrison & Breed, 1987).

Partindo desse ponto, foi construída uma matriz de Markov (figura 5) para verificar a probabilidade de transições entre as heurísticas utilizadas. Nas seções onde a formiga realizava “go last” primeiro e errava, na sua próxima tentativa a probabilidade de usar “go different” passava a ser 61,3%; enquanto que para as formigas que iniciavam com a estratégia “go different” a probabilidade de voltar para “go last” era de 57%. Essas descobertas, atreladas à grande adaptabilidade (Azevedo et al., 2021), sugere que a capacidade de usar heurísticas de forma simples pode permitir um melhor desempenho desses animais diante de ambientes complexos e de rápida mudança na paisagem (e.g. deposição de serapilheira), tendo impacto diretamente nas chances de sobrevivência, sendo também um reflexo da evolução da cognição em insetos (Oberhauser et al., 2020). Além do mais, sugere que o emprego de estratégias heurísticas não é cognitivamente flexível, com uma mesma operária sendo capaz de realizar transições entre estratégias com base no último resultado.

Tendo em vista que a espécie em questão possui forrageio solitário (Araújo e Rodrigues, 2006), esse estudo também reforça a importância de observar o desempenho de cada indivíduo separadamente (figura 6) ao demonstrar que as formigas que participaram do

experimento apresentaram sequências comportamentais distintas entre si ainda que fossem da mesma colônia. Em uma pesquisa feita com abelhas, os autores destacaram a importância das diferenças individuais no comportamento de escolha de analisar estratégias individuais para entender a flexibilidade cognitiva (Madboudi, et al. 2020). Neste trabalho as abelhas 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). Em nosso experimento, as formigas apresentaram resultados semelhantes na forma em que faziam as suas escolhas, sem apresentar evidências de aprendizado ao longo das sessões, uma vez que a escolha de estratégia usada não variou conforme a experiência ($\chi^2=0,04$; $P = 0,83$).

Além das transições entre as diferentes heurísticas, também analisamos a probabilidade de a formiga não alterar sua estratégia. Deste modo, obtivemos os seguintes resultados: se a formiga iniciava com “go different” a probabilidade de fazer “go different” novamente era de 43%; já quando optava por fazer o “go last” primeiro, as chances de utilizar a mesma estratégia na próxima sessão era de 39% (figura 5). Essa variação de estratégia que consiste em retornar ao local onde encontraram comida da última vez, está de acordo com outros estudos realizados em espécies de formiga diferentes, reforçando novamente a ideia de que os animais alternam suas escolhas baseados em suas experiências anteriores, variando de indivíduo para indivíduo sem requerer uma abstração (Czaczkes, 2022).

Conclusão

Com os nossos resultados podemos inferir que, as formigas apresentam diferenças individuais utilizando heurísticas durante o forrageamento e demonstram grande flexibilidade cognitiva ao alternarem entre essas estratégias com base em suas experiências prévias. Assim, podemos concluir que (1) operárias de *D. quadriceps* apresentam fidelidade a local, mas também podem ser flexíveis em sua escolha de retornar a esses locais, (2) a decisão para mudar o local é feita com base no resultado do último encontro de alimento, repetindo estratégias que estejam gerando frutos e (3) essas decisões são individuais, não havendo influência colônias sobre o uso de heurísticas. Estudos como este são essenciais para entender o emprego de mecanismos básicos para resolução de problemas feitos por estes animais em ambientes complexos, que são de suma importância para sua sobrevivência. Tendo em vista que há uma certa escassez de estudos nesse campo, futuras pesquisas podem investigar como essas heurísticas são aplicadas em ambiente natural - onde as modificações na paisagem são abruptas, auxiliando o entendimento da ecologia dessas formigas.

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.

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*. [Local de Publicação]: Academic Press, 2010. p. 601–603.

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 labirinto em acrílico usado no experimento. Autoria própria, 2025.

Figura 2. Esquema do modelo de labirinto conectado a arena contendo o ninho utilizado no experimento. Autoria própria, 2025.

Figura 3. Ocorrência de escolha (média) de cada estratégia heurística pelas operárias das cinco colônias. Autoria própria, 2025.

Figura 4. Acerto proporcional (média) em função da estratégia heurística usada. Autoria própria, 2025.

Figura 5. Matriz de escolha (Cadeia de Markov) de uso de estratégia. Autoria própria, 2025.

Figura 6. Escolha individual de estratégia heurística em função da experiência da operária. Autoria própria, 2025.

CÓDIGO: HS0506

AUTOR: ICARO GABRIEL PAIVA GE

COAUTOR: IGOR ELOI MOREIRA

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Um protocolo experimental para acessar o “cerebro” de formigas gigantes
(*Dinoponera quadriceps*)

Resumo

Resumo

Em formigas, a arquitetura cerebral reflete suas particularidades comportamentais e fisiológicas, demonstrando notável plasticidade entre espécies e castas. Neste trabalho a morfologia cerebral da formiga neotropical *Dinoponera quadriceps* é descrita por meio de análises morfométricas. Para isso, indivíduos de *D. quadriceps* foram coletados em campo e mantidos em laboratório. Selecionamos operárias para processamento histológico, fixando e dissecando suas cabeças. A análise morfométrica focou em áreas como os Corpos Cogumelares, Áreas centrais, Lobos Antenais, Lobos Ópticos e o Complexo Central, além de avaliar a proporção entre os lobos ópticos e antenais. As análises demonstraram que os Corpos Cogumelares representam a maior parte do cérebro, seguidos pelas Áreas Centrais, Lobos Antenais, Lobos Ópticos e Complexo Central. A predominância dos Corpos Cogumelares e Áreas Centrais em *D. quadriceps* corrobora seu comportamento de forrageamento solitário, que demanda memória avançada e processamento sensorial refinado.

Palavras-chave: Neuroanatomia. Protocolo. Ponerinae. Áreas do cérebro. Morfometria.

TITLE: An experimental protocol to access the “brain” of giant ants (*Dinoponera quadriceps*)

Abstract

Abstract

The architecture of the ant brain reflects the behavioral and physiological traits, that show a plasticity among species and castes. In this present study, the brain morphology of the neotropical ant *Dinoponera quadriceps* is described through morphometrical analyses. The individuals were collected in the field and maintained in the lab. Workers were selected for histological procedure, their heads were fixed and dissected. The morphometrical analysis focuses on some structures, like Mushroom Bodies, Central Areas, Antennal Lobes, Optic Lobes and the Central Complex. Furthermore, the proportion among optical and antennal lobes was evaluated. The analyses revealed that the Mushroom Bodies represent the largest

part of the brain, followed by the Central Areas, Antennal Lobes, Optical Lobes and the Central Complex. The predominance of Mushroom Bodies and Central Areas in *D. quadricaps* reflect their behavioral profile, of solitary forager, which demands advanced memory and refined sensory processing.

Keywords: Neuroanatomy, Protocol, Ponerinae, Brain Areas. Morphometry

Introdução

O sistema nervoso de insetos é amplamente estudado, animais experimentais como moscas do gênero *Drosophila* foram importantes modelos experimentais para a produção de conteúdo sobre o assunto, como estudos da ontogenia cerebral em *D. melanogaster*, (Meinertzhagen, 1998; Takemura et al, 2017); bem como outros estudos, como comparativos que relacionam a morfologia externa e comportamento com as proporções cerebrais (Gronenberg e Holldobler, 1999).

A união do gânglios nervosos supra-esofágico e sub-esofágico formam o considerado cérebro do inseto, dentre as diversas estruturas presentes no gânglio cefálico quatro delas possuem destaque nos estudos; (1) os Corpos Cogumelares, (CC), estrutura responsável pela cognição de alto nível, como memória (Takemura et al, 2017) – especialmente o calyx medial memória de forrageio (Riveros e Gronenberg, 2009) – e associações olfativas e visuais (Namiki e Kanzaki, 2019). Além disso, o CC é dividido em três subdivisões, Calyx medial, Calyx lateral e Pedúnculo. (2) O complexo central (CX), estrutura ímpar – dividida em corpo em leque, corpo elipsoide e ponte protocerebral – responsável pela navegação, caminhada, vôo e coordenação motora – (Guo e Ritzmann, 2013; Buehlmann, 2023), (3) os lobos antenais (LA), importantes centros sensoriais divididos em glomérulos, responsáveis pela sensibilidade química das antenas (Kleineidam e Rossler, 2009) (4) os lobos visuais (LO), divididos em lâmina, medula e lobula, áreas responsáveis pelo processamento visual do inseto (Gronenberg, 2008).

Além disso, áreas como procerebro superior e inferior, importantes centros de processamento secundário – como o protocerebro lateral, relacionado ao processamento olfativo secundário e o os neurópilos superiores um conjunto de áreas associativas relacionadas a visão e locomoção (Namiki e Kanzaki, 2019) – foram condensados em uma medida chamada Áreas centrais (AC).

Assim como em outros grupos, a morfologia cerebral das formigas remonta características inerentes de seu comportamento e fisiologia. Com isso, observa-se que o sistema nervoso de formigas se aproxima muito de vespas, mas com uma grande redução no LO, entretanto, possuem uma grande plasticidade morfológica entre espécies e entre castas, como mostrado em operárias fecundadas e não fecundadas em formigas Ponerinae do gênero *Harpegnathos*, nas quais operárias fecundadas possuem um cérebro cerca de 20% menor que outras operárias (Gronenberg, 1999, Gronenberg, 2008).

Em síntese, o presente trabalho tem por objetivo a descrição da morfologia cerebral da formiga neotropical *Dinoponera quadricaps*, o gênero com as maiores formigas do mundo, de forma a descrever proporções de diferentes áreas, através do uso de medidas morfométricas.

Metodologia

Área de coleta e manutenção de colônias

Os indivíduos foram coletados na Floresta Nacional de Nísia Floresta, um fragmento secundário de floresta atlântica, sob a licença SISBIO nº 88316-1. As operárias foram coletadas diretamente da entrada dos ninhos, utilizando uma isca de goiabada para atraí-las para a entrada do ninho, posteriormente, o ninho foi escavado para coleta de mais operárias, machos, larvas e pupas. Dentro do ambiente de laboratório, as colônias foram mantidas em ninhos de gesso, conectados a arenas de forrageio de 1m² preenchidas com vermiculita, com intuito de reter a umidade e enriquecer o ambiente. Todas as colônias foram mantidas em 25 °C e em um fotoperíodo de 12h/12h.

Dissecação e procedimentos histológicos

Primeiramente, três operárias foram selecionadas aleatoriamente e sacrificadas em uma câmara fria a - 20 ° C por 4 minutos. Consecutivamente, as operárias foram pré-fixadas por 24h em formaldeído 4%, com um furo na região occipital (Figura 1), para facilitar a difusão do fixador. Após 24h, a cabeça do indivíduo foi dissecada sob um estereomicroscópio, com o auxílio de pinças e tesouras. A porção dorsal da cutícula foi manualmente removida, expondo o tecido muscular e nervoso. Posteriormente, a cápsula cefálica voltou a ser embebida em formaldeído 4% por no mínimo 24h. Em seguida, o tecido passou pelos processos de desidratação, diafanização e inclusão, posteriormente foi processado em um microtomo rotativo manual, os cortes foram feitos com 5µm de espessura sob o plano transversal e selecionados a cada 15µm. O corante majoritariamente utilizado foi a hematoxilina e a eosina, entretanto, também foram feitas lâminas coloridas em thionina, as utilizadas nas fotografias. Um esquema do estudo pode ser encontrado na Figura 1.

Morfometria

Os dados morfométricos coletados neste trabalho foram a média das áreas de cada uma das cinco estruturas cerebrais consideradas; posteriormente as imagens foram analisadas com o software Nikon NIS-Elements 6.10.01, através do método de seleção de polígonos. Posteriormente, a média das áreas de cada estrutura foi calculada, levando em consideração a ausência da estrutura no corte analisado, nesse caso sua área foi considerada nula. Com isso, é possível ter uma noção tridimensional das estruturas. Além disso, foi calculada a razão entre as áreas médias de LO e LA, doravante razão LOLA, com o intuito de avaliar a proporção entre as áreas visuais e antenais.

Resultados e Discussões

Resultados

Foram identificadas cinco áreas do cérebro das operárias (Figura 2 e 3). A média de uma secção completa foi de 619684,4 µm², sendo representada majoritariamente pelos corpos cogumelares (CC) com uma média de 259154,7 µm², além disso, essa estrutura foi observada em toda a extensão dos cortes, com uma área maior em estratos mais superficiais da estrutura. A segunda maior área foi a intitulada Área central (AC), que se tratava de um conjunto de áreas associativas, com uma média de 204241 µm². Posteriormente, os lobos antenais (LA) aparecem em estratos mais profundos do cérebro, entretanto possuem uma área bastante

representativa, com 68683,47 μm^2 de área. Os lobos ópticos (LO) possuem uma pequena área, muito relativa a ausência desta área em alguns cortes, com uma média de 36890,27 μm^2 (Figura 4; Tabela 1). Foi observado que para operárias de *D. quadriceps* a razão LOLA é de 0,57.

A menor área observada foi o complexo central (CX) que aparece apenas em estratos médios com uma área de 3450,016 μm^2 (Tabela 1). Já em estratos superficiais, as estruturas mais aparentes eram os corpos cogumelares, com uma área mais representativa, reduzindo gradualmente. Além disso, estruturas como CX e LA não se mostraram presentes em todos os estratos, sendo reveladas apenas em estratos médios e profundos dos cortes.

Os corpos cogumelares apresentaram características particulares, ambos os calyx, medial e lateral, possuem áreas médias similares (Tabela 2), embora não se distribuam de forma uniforme nos cortes. Assim como a presença de vacúolos teciduais entre as células nervosas do CC (Figura 5).

Discussão

Neste estudo, realizamos a primeira descrição morfológica dos neuropilos mais proeminentes em operárias da formiga *D. quadriceps*. Essa espécie é conhecida por apresentar hábitos de forrageio solitário (Araújo e Rodrigues, 2006); portanto, sua ecologia prediz a necessidade de capacidade de memorização individual e aparato neural para integração e processamento de informações sensoriais multimodais. Tal integração é uma evidente explicação para a grande área de CC e AC, como supracitado, áreas relacionadas à memória (Takemura et al, 2017) e processamentos sensoriais secundários (Namiki e Kanzaki, 2019), respectivamente.

A razão entre LO e LA de *D. quadriceps* foi de 0,57. Para essa medida, valores abaixo de 0 denotam uma maior utilização dos sentidos químicos do que visuais. Entretanto, o valor observado sugere que formigas *D. quadriceps* estão mais próximas a espécies com orientação bimodal, como *Ectatomma ruidum* (0,43) e *Myrmecia gulosa* (0,71) (Gronenberg, 1999).

Formigas do gênero *Dinoponera* apresentam forrageadoras que exploram exclusivamente o solo (Fourcassié e Oliveira, 2001), um contexto rico em pistas químicas denotando uma necessidade maior de processamento olfativo. No entanto, a razão LO/LA sugere que o processamento visual é importante, mesmo que o LO seja pouco desenvolvido (Figura 2 e 3).

Com base nesse primeiro passo de estudo, podemos fazer algumas previsões dos trabalhos que seguem: 1) apenas investigamos o cérebro de formigas que estavam em ambiente de laboratório, o que pode influenciar o tamanho das estruturas, devido a alterações nos estímulos ambientais (Heisenberg 1995). Dessa forma, investigações comparando o campo e o laboratório serão bem vindas; 2) rotação de tarefas (Gordon 1999) pode levar a neuroplasticidade (Gronenberg 1999, Rossler 2019), o que deve ser melhor investigado se através de um ranqueamento social; e 3) a neuroanatomia pode ser ligada à idade, uma vez que foi observado a presença de vacúolos teciduais entre as células nervosas - um indicador de idade (Koch 2020).

Conclusão

Em síntese, o presente trabalho realizou a primeira análise exploratória do cérebro de *D. quadriceps*, no qual foram descritas as proporções das estruturas cerebrais, indicando a

prevalência de estruturas relacionadas a processamento de memória e processamento sensorial secundário. Dessa forma, criando margem para diversos estudos sobre a morfologia cerebral.

Referências

- ARAÚJO, Arrilton; RODRIGUES, Zenilde. Foraging behavior of the queenless ant *Dinoponera quadriceps* Santschi (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 159-164, 2006.
- BUEHLMANN, Cornelia et al. Impact of central complex lesions on innate and learnt visual navigation in ants. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 209, n. 4, p. 737-746, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00359-023-01613-1>
- FOURCASSIÉ, Vincent; OLIVEIRA, Paulo S. Foraging ecology of the giant Amazonian ant *Dinoponera gigantea* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae): activity schedule, diet and spatial foraging patterns. *Journal of Natural History*, v. 36, n. 18, p. 2211-2227, 2002. DOI: 10.1080/00222930110097149
- GORDON, Deborah M. Interaction patterns and task allocation in ant colonies. In: *Information processing in social insects*. Basel: Birkhäuser Basel, 1999. p. 51-67.
- GRONENBERG, Wulfila; HÖLLDOBLER, Bert. Morphologic representation of visual and antennal information in the ant brain. *Journal of Comparative Neurology*, v. 412, n. 2, p. 229-240, 1999.
- GRONENBERG, Wulfila; LIEBIG, Jürgen. Smaller brains and optic lobes in reproductive workers of the ant *Harpegnathos*. *Naturwissenschaften*, v. 86, n. 7, p. 343-345, 1999.
- GRONENBERG, Wulfila. Structure and function of ant (Hymenoptera: Formicidae) brains: strength in numbers. *Myrmecological News*, v. 11, p. 25-36, 2008.
- GUO, Peiyuan; RITZMANN, Roy E. Neural activity in the central complex of the cockroach brain is linked to turning behaviors. *Journal of Experimental Biology*, v. 216, n. 6, p. 992-1002, 2013. doi:10.1242/jeb.080473
- HEISENBERG, Martin; HEUSIPP, Monika; WANKE, Christiane. Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 3, p. 1951-1960, 1995.
- KLEINEIDAM, Christoph; RÖSSLER, Wolfgang. Adaptations in the olfactory system of social hymenoptera. *Organization of insect societies: from genome to sociocomplexity*, p. 195-219, 2009.
- KOCH, Sandra C.; NELSON, Annie; HARTENSTEIN, Volker. Structural aspects of the aging invertebrate brain. *Cell and tissue research*, v. 383, n. 3, p. 931-947, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03314-6>
- MEINERTZHAGEN, I. A.; EMSLEY, J. G.; SUN, X. J. Developmental anatomy of the *Drosophila* brain: neuroanatomy is gene expression. *Journal of Comparative Neurology*, v. 402, n. 1, p. 1-9, 1998.

NAMIKI, Shigehiro; KANZAKI, Ryohei. Morphology and physiology of olfactory neurons in the lateral protocerebrum of the silkworm *Bombyx mori*. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 16604, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53318-8>

RIVEROS, Andre J.; GRONENBERG, Wulfil. Brain allometry and neural plasticity in the bumblebee *Bombus occidentalis*. Brain, behavior and evolution, v. 75, n. 2, p. 138-148, 2010. DOI: 10.1159/000306506

RÖSSLER, Wolfgang. Neuroplasticity in desert ants (Hymenoptera: Formicidae)–importance for the ontogeny of navigation. Myrmecological News, v. 29, 2019 https://doi.org/10.25849/myrmecol.news_029:001.

TAKEMURA, Shin-ya et al. A connectome of a learning and memory center in the adult *Drosophila* brain. eLife, v. 6, p. e26975, 2017. DOI: 10.7554/eLife.26975.001

Anexos

Figura 4: Gráfico representando as proporções do determinadas áreas do cérebro

Figura 2: Corte do cérebro de *D. quadricaps* em estrato mediano colorido com Tionina. As estruturas mais proeminentes são destacadas com as setas.

Figura 3: As diferentes estruturas cerebrais separadas por cores, em um corte mediano. Lobo visual esquerdo foi perdido durante microtomia do espécime.

Fig 1 : Protocolo de dissecação da cabeça de *D. quadricaps*.

Tabela 1: Médias das áreas gerais de cada lobo cerebral, CC (Corpos Cogumelares), AC (Área central), LA (Lobo antenal), LO(Lobo Óptico) e CX(Complexo Central).

Tabela 2: Médias da área de MB e suas respectivas subdivisões. CC(Corpos cogumelares), E(esquerdo) e D(Direito)

CÓDIGO: HS0911

AUTOR: TICYANA DIAS COSTA DA SILVA

COAUTOR: EMANUEL LINEGLEY RIBEIRO DA SILVA JÚNIOR

ORIENTADOR: CAROLINA VIRGINIA MACEDO DE AZEVEDO

TÍTULO: Relação entre cronotipo, padrões temporais de sono e atenção em adolescentes do turno matutino

Resumo

O presente estudo investigou a relação entre cronotipo, padrões temporais de sono, jetlag social e atenção em adolescentes do turno matutino. Um total de 186 estudantes do ensino médio de uma instituição pública de Natal/RN, preencheram o Questionário de Cronotipo de Munique e o Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh. Além disso, a atenção foi avaliada por meio de uma Tarefa de Execução Contínua. A regressão linear indicou que a tendência à vespertinidade foi associada a horários de dormir (dias livres) e acordar mais tarde (dias de escola e dias livres), maior irregularidade nos horários de dormir e acordar, maior débito de sono, valores mais altos de jetlag social e maior tempo de reação no alerta fásico. Esses achados sugerem que a tendência à vespertinidade está associada a um maior desalinhamento entre os padrões de sono e os horários sociais, além de prejuízos no desempenho atencional, reforçando a necessidade de políticas escolares que considerem o cronotipo na organização dos horários escolares.

Palavras-chave: Cronotipo; Sono; Jetlag social; Atenção; Adolescentes.

TITLE: Relationship between chronotype, temporal sleep patterns and attention in morning shift adolescents

Abstract

This study investigated the relationship between chronotype, temporal sleep patterns, social jetlag, and attention in morning-shift adolescents. A total of 186 high school students from a public institution, in Natal, filled the Munich Chronotype Questionnaire and the Pittsburgh Sleep Quality Index. Besides, attention was evaluated through a Continuous Performance Task. Linear regression analysis indicated that eveningness was associated with later sleep (free days) and wake-up times (school and free days), greater irregularity in sleep times, higher sleep debt, higher social jetlag values, and longer reaction times in phasic alertness. These findings suggest that eveningness is associated with higher misalignment between sleep patterns and social times, besides prejudices in attentional performance, reinforcing the need for school policies that take chronotype into account when organizing school schedules.

Keywords: Chronotype; Sleep; Social jetlag; Attention; Adolescents.

Introdução

Na adolescência ocorre mudanças nos padrões de sono, em que se observa uma tendência à vespertinidade devido à um atraso de fase (Crowley et al., 2018), ou seja, os adolescentes

tendem a atrasar os horários de sono, em comparação com outras fases da vida. Apesar disso, a comunidade escolar não se adequa à esse padrão, pois grande parte das escolas iniciam suas atividades entre 7h e 7h30 da manhã, levando os adolescentes a terem que se adaptar a um horário incompatível com o seu padrão temporal de sono, podendo resultar em uma duração de sono abaixo do recomendado. Nesta faixa etária, é recomendado entre oito a dez horas de sono por noite para um bom desempenho cognitivo (Hirshkowitz et al., 2015), o que não é atingido em dias letivos (Crowley et al., 2018), pois, devido à tendência à vespertinidade, os adolescentes dormem tarde, mas acordam cedo devido aos horários de aula. Desse modo, o horário das aulas, associado aos mecanismos de biorregulação do sono na adolescência resultam em uma “tempestade perfeita” de sono curto e irregular (Carskadon, 2011 ; Crowley et al., 2018). Outro aspecto relevante é o jetlag social, definido como a diferença entre o horário do meio do sono nos dias livres e nos dias letivos (Wittmann et al., 2006). Esse desalinhamento entre o tempo biológico e o tempo social imposto pelas obrigações escolares é especialmente pronunciado na adolescência, devido ao atraso de fase característico dessa faixa etária (Crowley et al., 2018; Roenneberg et al., 2019). Valores elevados de jetlag social têm sido associados a pior desempenho acadêmico, maior sonolência diurna e sintomas depressivos (Beauvalet et al., 2017; Mathew et al., 2019). Diante disso, um fator que influencia os padrões de sono é o cronotipo, definido como sendo as diferenças individuais na expressão dos ritmos circadianos (Horne & Östberg, 1976). Assim, o cronotipo é indicado através das preferências de horários para realização de atividades diárias, classificando os indivíduos como matutinos, intermediários e vespertinos (Horne & Östberg, 1976). A realidade do sono insuficiente e irregular entre adolescentes pode comprometer o desempenho escolar, uma vez que a privação de sono afeta negativamente processos cognitivos essenciais, como a atenção (Lo et al., 2016). No que se refere à atenção, Valdez et al. (2005), com base no modelo proposto por Posner e Rafal (1987), a subdividem em quatro componentes: alerta tônico, alerta fásico, atenção seletiva e atenção sustentada. O alerta representa a capacidade do organismo de reagir ao ambiente, sendo classificado em duas formas: o alerta tônico, que se refere à prontidão geral para responder a estímulos, e o alerta fásico, que corresponde à resposta após um sinal. A atenção seletiva é definida como a habilidade de focar em um estímulo específico enquanto ignora outros, e a atenção sustentada (ou vigilância) refere-se à capacidade de manter o foco ao longo do tempo (Valdez et al., 2005). Estudos mais recentes reforçam esse cenário, mostrando que, em diversos países, mais de 70% dos adolescentes não atingem as horas de sono recomendadas em dias letivos, principalmente devido ao desalinhamento entre o cronotipo e os horários escolares (Wahlstrom et al., 2017; Becker et al., 2025). Essa privação crônica de sono está associada a pior desempenho acadêmico, maior sonolência diurna, aumento de sintomas depressivos e prejuízos na atenção sustentada e seletiva (Mathew et al., 2019; Becker et al., 2025). Intervenções como o atraso no início das aulas demonstraram melhorar a duração e regularidade do sono, além de favorecer o desempenho cognitivo e o bem-estar dos estudantes (Wahlstrom et al., 2017; de Araújo et al., 2022). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar a relação entre os padrões temporais de sono e atenção em função do cronotipo em adolescentes do turno matutino.

Metodologia

O recrutamento dos estudantes foi realizado através de convites feitos em sala de aula de forma presencial. Foram realizadas coletas de dados nos anos de 2024 e 2025 em uma instituição pública de ensino médio técnico-integrado em Natal/RN, com estudantes do primeiro e segundo anos, no turno matutino (início das aulas às 7h). Para a análise do sono,

os dados de 186 estudantes foram analisados, e para a análise da atenção, foram utilizados os dados dos mesmos estudantes com algumas exclusões, sendo 164 o número amostral. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP - UFRN - parecer: 5.456.242 parecer emenda: 5.905.464 ; CEP - UFRN - parecer: 6.944.700) e pela equipe pedagógica da escola pesquisada. Critérios de inclusão Foram incluídos na amostra estudantes de ambos os sexos matriculados no turno matutino do ensino médio da escola pesquisada, com idade entre 14 e 18 anos, que entregaram o Termo de Assentimento e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados respectivamente pelo participante e pelo responsável. Critérios de exclusão Foram excluídos da amostra os participantes que, através de questionários, relataram utilizar psicofármacos regularmente, ter distúrbios do sono, neurológicos (atuais e no passado) e de saúde, deficiências sensoriais e/ou motoras sérias, além de déficits cognitivos, Depressão Maior, Transtorno do Humor Bipolar, Transtorno Psicótico, Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) e participantes que não preencheram os questionários por completo. Coleta de dados Para a coleta de dados, os participantes preencheram um total de três questionários de aplicação única, disponibilizados de forma online, sendo eles: (1) A Saúde e o Sono, o (2) Questionário de Cronotipo de Munique, e o (3) Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh. Para avaliar o desempenho da atenção dos participantes, foi utilizada a Tarefa de Execução Contínua (TEC). Questionário “A Saúde e o Sono” O questionário “A Saúde e o Sono” utilizado foi a versão modificada por Mathias et al. (2006). Contém questões sobre saúde geral e os hábitos de sono do indivíduo (anexo 1). Questionário de Cronotipo de Munique O Questionário de Cronotipo de Munique, desenvolvido por Roenneberg et al. (2007), apresenta perguntas sobre horários de sono nos dias de aula/trabalho e dias livres, como o horário em que vão para a cama, o tempo que o indivíduo leva para adormecer, horário de acordar, tempo que demoram para levantar e se houve necessidade do despertador (anexo 2). Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh (IQSP) O Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh (IQSP), 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. A soma dos escores resulta em um índice global, no qual valores mais altos indicam pior qualidade de sono (anexo 3). Tarefa de Execução Contínua (TEC) A Tarefa de Execução Contínua (TEC), proposta por Valdez et al. (2005), avalia os componentes da atenção através de uma tarefa realizada em um computador, em que na tela, são apresentados números de 0 a 9. Os participantes devem posicionar os dedos nas teclas “1, 2, 3” indicadas no computador, respeitando a mão dominante de cada um. No surgimento dos números de 0 a 8, a tecla 1 deve ser pressionada. No surgimento do número 9, a tecla 2 deve ser pressionada, e no surgimento do número 4 após um 9 ter surgido anteriormente, a tecla 3 deve ser pressionada. O alerta tônico é avaliado pela capacidade de responder aos estímulos de 0 a 8. A atenção seletiva corresponde à resposta ao estímulo 9. O alerta fásico é indicado pela resposta ao estímulo 4 apresentado após o 9, enquanto a atenção sustentada é medida pela capacidade do participante em manter o foco ao longo de toda a tarefa. A aplicação dessa tarefa ocorreu entre terça-feira e sexta-feira, no período das 7h30 às 9h00, com os estudantes. Análise A análise estatística foi realizada no software Jamovi, com nível de significância de 5%. Aplicou-se regressão linear, tendo o cronotipo como variável independente e as variáveis de sono e atenção como dependentes. As variáveis de sono analisadas foram: horário de dormir e acordar (dias de aula e livres), duração do sono (dias de aula e livres), variabilidade nos horários de dormir e acordar, débito de sono, jetlag social e

qualidade de sono. Com exceção da qualidade de sono, os dados dessas variáveis foram obtidos pelo Questionário de Cronotipo de Munique. O cronotipo foi calculado pela meia fase do sono nos dias livres (Roenneberg et al., 2019), enquanto a variabilidade nos horários de dormir e acordar foi calculada pela diferença, em minutos, entre os horários médios dos dias de aula e livres; o débito de sono pela diferença na duração entre dias de aula e livres; e o jetlag social pela diferença entre as meias fases do sono entre os dias de aula e livres (Wittmann et al., 2006). A qualidade do sono foi avaliada pelo Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh (IQSP), no qual escores mais altos indicam pior qualidade subjetiva de sono. As variáveis de atenção, obtidas pela Tarefa de Execução Contínua (TEC), incluíram alerta tônico e fásico, atenção seletiva e atenção sustentada. Para os três primeiros, foram analisados tempo de reação, percentual de respostas corretas e percentual de omissões (Valdez et al., 2005). A atenção sustentada foi avaliada pela estabilidade geral, medida pelo desvio padrão do tempo de reação das respostas corretas ao longo da tarefa.

Resultados e Discussões

O cronotipo não se relacionou aos horários de dormir nos dias de aula (Tabela 1 – $r^2 = 0,00348$; $p = 0,425$). Entretanto, houve associação nos dias livres (Tabela 1 – $r^2 = 0,0239$; $p = 0,035$), indicando que indivíduos com maior tendência à vespertinidade dormem mais tarde nesses dias. Observou-se associação entre o cronotipo e o horário de acordar, tanto nos dias de aula (Tabela 1 – $r^2 = 0,0870$; $p < 0,001$) quanto nos dias livres (Tabela 1 – $r^2 = 0,334$; $p < 0,001$), com indivíduos com maior tendência à vespertinidade acordando mais cedo. A duração do sono não apresentou associação com o cronotipo, nos dias de aula (Tabela 1 – $r^2 = 0,0206$; $p = 0,846$) e nos dias livres (Tabela 1 – $r^2 = 0,00753$; $p = 0,240$). Quanto às irregularidades, houve associação entre o cronotipo e a variabilidade nos horários de dormir (Tabela 1 – $r^2 = 0,0510$; $p = 0,002$) e acordar (Tabela 1 – $r^2 = 0,262$; $p < 0,001$), com indivíduos com maior tendência à vespertinidade apresentando maior diferença entre dias de aula e dias livres. O débito de sono apresentou associação com o cronotipo (Tabela 1 – $r^2 = 0,159$; $p < 0,001$), com a tendência à vespertinidade relacionada a maior diferença de duração do sono entre dias letivos e livres. Houve ainda associação com o jetlag social (Tabela 1 – $r^2 = 0,482$; $p < 0,001$), sendo que indivíduos com maior tendência à vespertinidade apresentando maiores valores. O Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (IQSP) não apresentou associação significativa (Tabela 1 – $r^2 = 0,00960$; $p = 0,196$). Em relação aos componentes de atenção, o cronotipo não apresentou associação com o tempo de reação (Tabela 2 – $r^2 = 0,00274$; $p = 0,718$), porcentagem de respostas corretas (Tabela 2 – $r^2 = 0,00135$; $p = 0,800$) e de omissões (Tabela 2 – $r^2 = 0,0212$; $p = 0,313$) no alerta tônico. No alerta fásico, houve associação apenas com o tempo de reação (Tabela 2 – $r^2 = 0,101$; $p = 0,025$), em que indivíduos com maior tendência à vespertinidade apresentaram tempos mais longos. A porcentagem de respostas corretas (Tabela 2 – $r^2 = 0,0149$; $p = 0,398$) não apresentaram associação significativa, embora a porcentagem de omissões tenha apresentado tendência à significância (Tabela 2 – $r^2 = 0,0737$; $p = 0,057$), fazendo-se necessário uma análise com número maior de participantes para analisar esta relação. Para a atenção seletiva, não houve associações com o cronotipo, tanto para o tempo de reação (Tabela 2 – $r^2 = 0,00400$; $p = 0,663$) quanto para a porcentagem de respostas corretas (Tabela 2 – $r^2 = 0,00834$; $p = 0,842$) e de omissões (Tabela 2 – $r^2 = 0,00674$; $p = 0,571$). Por fim, na atenção sustentada (estabilidade geral), não foi observada associação significativa (Tabela 2 – $r^2 = 0,00527$; $p = 0,616$). De forma geral, observa-se que o cronotipo está associado aos horários de acordar, à variabilidade nos horários de sono, ao débito de sono, ao jetlag social e, de forma pontual, ao horário de dormir em dias livres e ao tempo de reação no alerta fásico.

Indivíduos com maior tendência à vespertinidade tendem a apresentar maior irregularidade e desalinhamento com o tempo social, o que pode refletir em dificuldades na adaptação aos horários escolares e em desempenho reduzido em tarefas que exigem respostas rápidas a estímulos sinalizados. Os resultados deste estudo indicam que o cronotipo exerce influência relevante sobre a regularidade do sono. A associação significativa entre cronotipo e horários de dormir nos dias livres, horários de acordar nos dias livres e de aulas, variabilidade nos horários de sono e débito de sono sugere que indivíduos vespertinos apresentam maior dificuldade de alinhar seus ritmos biológicos aos horários sociais, como os horários de início das aulas pela manhã. Esse desalinhamento 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), como observado nos resultados deste estudo. Esse descompasso entre o horário biológico e o horário social imposto, especialmente em dias letivos, tem sido associado a piores indicadores de saúde física e mental, menor desempenho acadêmico e maior sonolência diurna (Beauvalet et al., 2017; Becker et al., 2025). A ausência de associação entre o cronotipo e a duração total de sono nos dias de aula e livres pode indicar estratégias compensatórias, como dormir mais tarde e acordar mais tarde nos dias livres, sendo um comportamento típico de adolescentes (Hirshkowitz et al., 2015; Díaz-Morales et al., 2015). Contudo, essa compensação não elimina os impactos da irregularidade e do débito acumulado, que podem comprometer o desempenho acadêmico e o bem-estar mental (Phillips et al., 2017; Lo et al., 2016). Além disso, o Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (IQSP) não apresentou associação significativa com o cronotipo, sugerindo que, independentemente da preferência circadiana, a percepção subjetiva da qualidade do sono não variou entre os participantes. Esse resultado indica que, embora o cronotipo influencie aspectos objetivos do sono, como horários e regularidade, a avaliação subjetiva da qualidade pode ser modulada por múltiplos fatores, como estresse, demandas escolares e hábitos de vida (Beauvalet et al., 2017; Hirshkowitz et al., 2015). Os achados de atenção mostram que, embora a maioria dos componentes não tenha se associado significativamente ao cronotipo, o tempo de reação no alerta fásico apresentou relação positiva com adolescentes com maior tendência à vespertinidade, sugerindo possível lentidão na resposta a estímulos precedidos por um sinal. Além disso, a tendência observada no aumento de omissões no alerta fásico indica um possível padrão de maior vulnerabilidade atencional, que provavelmente poderia ser evidenciado em uma amostra maior. Esses resultados sugerem que padrões de sono irregulares e atrasados podem afetar de forma seletiva não apenas a velocidade de processamento, mas também a precisão das respostas em condições específicas, sem necessariamente impactar de maneira ampla outras dimensões da atenção como a atenção sustentada (Killgore, 2010; Valdez, 2019; Lo et al., 2016). Estudos recentes reforçam que o desalinhamento entre o cronotipo e os horários escolares não apenas prejudica o sono, mas também está ligado a piores resultados acadêmicos, menor atenção sustentada e maior vulnerabilidade a sintomas depressivos e ansiedade (Mathew et al., 2019; Preckel et al., 2011; Becker et al., 2025). Portanto, atrasar o início das aulas tem se mostrado uma boa estratégia para aumentar a duração e regularidade do sono, reduzir a sonolência diurna e melhorar o humor e o desempenho cognitivo (Wahlstrom et al., 2017; de Araújo et al., 2022). A partir dos resultados sugere-se que políticas educacionais e intervenções de saúde pública devem considerar o papel do cronotipo na organização dos horários escolares. Além disso, é fundamental promover educação em cronobiologia no ambiente escolar para conscientizar estudantes, pais e professores sobre a importância de alinhar o ritmo biológico às demandas diárias, minimizando os impactos negativos no sono, atenção e desempenho acadêmico (Carvalho-Mendes & Menna-Barreto, 2022).

Conclusão

Os resultados indicam que o cronotipo está associado ao horário de dormir nos dias livres, aos horários de acordar nos dias de aula e livres, à variabilidade nos horários de sono, ao débito de sono e ao jetlag social, mas não com a duração do sono. Indivíduos com maior tendência à vespertinidade apresentam maior irregularidade, maior acúmulo de débito de sono, maiores valores de jetlag social e maior tempo de reação no alerta fásico. Esses achados reforçam que o cronotipo pode impactar tanto a regularidade do sono quanto aspectos específicos da atenção, evidenciando a importância de considerar o cronotipo em estratégias voltadas à promoção da saúde e do desempenho acadêmico de adolescentes. Pesquisas futuras com um maior número de participantes são necessárias para avaliar o impacto do cronotipo nos outros componentes da atenção.

Referências

- BEAUVALET, J. C. et al. Social jetlag in health and behavioral research: a systematic review. *ChronoPhysiology and Therapy*, v. 7, p. 19-31, 2017. BECKER, S. P. et al. Later school start time, chronotype, and adolescent mental health: A review of recent findings. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcpp.14030>. BRUCE, E. S.; LIRA, F. S.; LOUNSBURY, D. E. Short sleep duration and obesity in adolescents: a systematic review. *Sleep Medicine*, v. 37, p. 103-114, 2017. CARSKADON, M. A. Sleep in adolescents: the perfect storm. *Pediatric Clinics*, v. 58, n. 3, p. 637-647, 2011. CARVALHO-MENDES, R. P.; MENNA-BARRETO, L. Why should chronobiology be included in teachers' training? *Pro-Posições*, v. 33, p. e20210030, 2022. COLRAIN, I. M.; BAKER, F. C. Changes in sleep as a function of adolescent development. *Neuropsychology Review*, v. 21, p. 5-21, 2011. CROWLEY, S. J. et al. An update on adolescent sleep: New evidence informing the perfect storm model. *Journal of Adolescence*, v. 67, p. 55-65, 2018. DE ARAÚJO, L. B. G. et al. Multiple positive outcomes of a later school starting time for adolescents. *Sleep Health*, v. 8, n. 5, p. 451-457, 2022. DÍAZ-MORALES, J. F.; ESCRIBANO, C. Social jetlag, academic achievement and cognitive performance: understanding gender/sex differences. *Chronobiology International*, v. 32, n. 6, p. 822-831, 2015. HIRSHKOWITZ, M. et al. National Sleep Foundation's updated sleep duration recommendations. *Sleep Health*, v. 1, n. 4, p. 233-243, 2015. HORNE, J. A.; ÖSTBERG, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology*, v. 4, n. 2, p. 97-110, 1976. KILLGORE, W. D. S. Effects of sleep deprivation on cognition. *Progress in Brain Research*, v. 185, p. 105-129, 2010. LO, J. C. et al. Cognitive performance, sleepiness, and mood in partially sleep deprived adolescents: the need for sleep study. *Sleep*, v. 39, n. 3, p. 687-698, 2016. MATHEW, G. M.; HALE, L.; CHANG, A. M. Sex moderates relationships among school night sleep duration, social jetlag, and depressive symptoms in adolescents. *Journal of Biological Rhythms*, v. 34, n. 2, p. 205-217, 2019. PHILLIPS, A. J. K. et al. Irregular sleep/wake patterns are associated with poorer academic performance and delayed circadian and sleep/wake timing. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 3216, 2017. POSNER, M. I.; RAFAL, R. D. Cognitive theories of attention and the rehabilitation of attentional deficits. In: MEIER, M. J. (Ed.). *Attention and Performance*. Cambridge: MIT Press, 1987. p. 182-194. PRECKEL, F. et al. Chronotype, cognitive abilities, and academic achievement: a meta-analytic investigation. *Learning and Individual Differences*, v. 21, n. 5, p. 483-492, 2011. ROENNEBERG, T. et al. A marker for the end of adolescence. *Current Biology*, v. 14, n. 24,

p. R1038-R1039, 2004. ROENNEBERG, T. et al. Chronotype and social jetlag: a (self-) critical review. *Biology*, v. 8, n. 3, p. 54, 2019. VALDEZ, P. Focus: attention science: circadian rhythms in attention. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 92, n. 1, p. 81-90, 2019. VALDEZ, P. et al. Circadian and homeostatic variation in sustained attention. *Chronobiology International*, v. 27, n. 2, p. 393-416, 2010. VALDEZ, P. et al. Circadian rhythms in components of attention. *Biological Rhythm Research*, v. 36, n. 1-2, p. 57-65, 2005. WAHLSTROM, K. L.; BERGER, A. T.; WIDOME, R. Relationships between school start time, sleep duration, and adolescent behaviors. *Sleep Health*, v. 3, n. 3, p. 216-221, 2017. WITTMANN, M. et al. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiology International*, v. 23, n. 1-2, p. 497-509, 2006.

Anexos

Tabela 1

Tabela 2

Anexo I

Anexo I

Anexo I

Anexo I

Anexo I

Anexo I

Anexo I

Anexo II

Anexo III

CÓDIGO: HS1078

AUTOR: MANUELA LIMA VALÉRIO DOS SANTOS

ORIENTADOR: FIVIA DE ARAUJO LOPES

TÍTULO: Relações parassociais: quando a ficção se torna real

Resumo

A partir da década de 1950, com a popularização da televisão, surgiu a interação parassocial (IPS), que consiste em uma relação unilateral entre o público e personagens midiáticos, marcando uma nova forma de contato social mediado por telas. Esse fenômeno evolui para o relacionamento parassocial (RPS), no qual o vínculo afetivo pode perdurar além do momento imediato da exposição, gerando conexões emocionais profundas, semelhantes a amizades reais. Este trabalho revisa as principais teorias que explicam os RPSs, destacando a Hipótese da Compensação, que associa esses vínculos a deficiências e dificuldades sociais dos indivíduos, e a Hipótese de Panksepp-Jakobson, que entende os RPSs como uma extensão natural das relações sociais reais, refletindo o círculo social do indivíduo. Além disso, são discutidos aspectos psicológicos relevantes, como dimensões do apego, solidão, depressão, ansiedade e estresse, e a influência dessas variáveis no bem-estar subjetivo dos indivíduos. Buscou-se caracterizar os perfis dos indivíduos mais propensos a desenvolver relacionamentos parassociais intensos, além de investigar através de um estudo experimental o impacto que esses laços exercem sobre o bem-estar dos fãs. Espera-se que este trabalho contribua para a compreensão aprofundada dos fenômenos parassociais na era digital e sua relevância para a saúde mental contemporânea, especialmente considerando as mudanças nos meios de comunicação e as novas formas de interação social.

Palavras-chave: Interação parassocial. Relacionamento parassocial. Apego. Solidão

TITLE: Parasocial Relationships: When Fiction Becomes Real

Abstract

Since the 1950s, with the popularization of television, parasocial interaction (PSI) emerged as a one-sided relationship between audiences and media characters, marking a new form of social contact mediated by screens. This phenomenon evolves into parasocial relationships (PSRs), in which affective bonds can persist beyond the immediate moment of exposure, generating deep emotional connections similar to real friendships. This study reviews the main theories explaining PSRs, highlighting the Compensation Hypothesis, which associates these bonds with social deficits and difficulties experienced by individuals, and the Panksepp-Jakobson Hypothesis, which views PSRs as a natural extension of real social relationships, reflecting an individual's social circle. Furthermore, relevant psychological aspects such as attachment dimensions, loneliness, depression, anxiety, and stress are discussed, along with their influence on individuals' subjective well-being. The profiles of individuals more prone to developing intense parasocial relationships were characterized, as well as the impact of these bonds on fans' well-being was investigated through an

experimental study. This work aims to contribute to a deeper understanding of parasocial phenomena in the digital age and their significance for contemporary mental health, especially considering the changes in media and new forms of social interaction.

Keywords: Parasocial interaction.Parasocial relationship.Attachment.Loneliness

Introdução

A partir da década de 1950, a popularização da televisão revolucionou as formas de comunicação e interação social, possibilitando pela primeira vez que as pessoas tivessem contato diário com personagens midiáticos por meio de uma tela dentro de suas casas. Esse fenômeno abriu espaço para a chamada interação parassocial (IPS) (Horton & Wohl, 1956), uma forma unilateral de interação social entre o público e personagens da mídia, especialmente televisivos. A IPS é caracterizada por uma sensação subjetiva de reciprocidade, em que o espectador sente que há uma interação mútua, e incluem comportamentos como falar com o personagem na tela ou a percepção de que o personagem está ciente da presença do espectador. Embora limitada ao momento da recepção midiática, a IPS representa um novo tipo de vínculo social mediado por tecnologia.

Com a frequência e continuidade desse contato, a IPS pode evoluir para relacionamentos parassociais (RPSs), nos quais os vínculos afetivos vão além do contato imediato e se tornam mais duradouros e profundos, semelhantes às amizades convencionais. Os indivíduos passam a perceber figuras midiáticas como conhecidos íntimos e amigos, desenvolvendo sentimentos de proximidade e confiança. Assim, os RPSs tornaram-se uma importante dimensão da experiência social contemporânea, especialmente diante do avanço e diversificação dos meios de comunicação.

Para explicar o fenômeno dos RPSs, duas principais hipóteses, ambas provenientes do estudo original de Horton e Wohl (1956), vêm sendo discutidas: A Hipótese da Compensação sugere que indivíduos com dificuldades em estabelecer relações sociais satisfatórias no ambiente real recorrem a vínculos parassociais como um mecanismo compensatório. Essa teoria considera que pessoas que enfrentam solidão, timidez extrema ou ansiedade social, por exemplo, tendem a buscar conforto e conexão em figuras da mídia, cuja unilateralidade das relações reduz o risco de rejeição e demanda menos habilidades sociais. Por outro lado, a Hipótese de Panksepp-Jakobson propõe que os RPSs não são meramente substitutos das relações reais, mas sim uma extensão do círculo social do indivíduo, operando pelos mesmos modelos mentais das relações face a face. Assim, pessoas predispostas a formar muitos laços sociais também tendem a desenvolver mais RPSs, enquanto indivíduos que evitam relações interpessoais na vida real tendem a evitar também os vínculos parassociais.

Aspectos psicológicos como solidão, depressão, ansiedade e estresse têm sido investigados em conexão com os RPSs. Enquanto alguns estudos sugerem que sintomas depressivos e insatisfação com relacionamentos reais aumentam a busca por vínculos parassociais, outros indicam que indivíduos com boas redes de apoio tendem a formar menos desses laços. O que há de consenso é que as relações parassociais exercem efeitos psicológicos reais, e que a perda desses vínculos, como o cancelamento de séries ou a morte de personagens, pode causar sentimentos comparáveis ao fim de relações sociais tradicionais.

Este trabalho se propôs a investigar as características dos indivíduos mais propensos a desenvolver RPS intensos e a analisar como esses vínculos influenciam o bem-estar subjetivo dos fãs. No Estudo 1, foram examinadas variáveis relacionadas à apegos, sintomas de

depressão, ansiedade e estresse (DASS), além do apoio social, a fim de compreender os fatores associados à intensidade dos relacionamentos parassociais. Já no Estudo 2, por meio de um experimento, buscou-se avaliar se a evocação mental de uma celebridade favorita impactaria o bem-estar subjetivo. A relevância dessa pesquisa reside na necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os fenômenos parassociais na era digital, considerando suas implicações para a saúde mental e para as novas formas de interação social mediadas por tecnologias de comunicação.

Metodologia

Este estudo foi dividido em dois momentos distintos: o primeiro, de caráter correlacional, e o segundo, experimental. Para ambos os estudos, o tamanho amostral mínimo foi calculado com o software G*Power, considerando efeito médio ($f = 0,25$), nível de significância $\alpha = 0,05$ e poder estatístico de 0,80, indicando a necessidade de ao menos 159 participantes para o Estudo 1 e 162 para o Estudo 2. No total, participaram 491 indivíduos no Estudo 1 (362 mulheres, 117 homens e 12 não identificados) e 163 no Estudo 2 (92 mulheres, 67 homens e 4 não identificados). A faixa etária predominante foi de 18 a 29 anos, representando 78,8% dos participantes no Estudo 1 e 92,6% no Estudo 2.

Ambos os estudos utilizaram um questionário sociodemográfico composto por 13 itens específicos para coletar informações relevantes sobre idade, gênero, orientação sexual, etnia, estado civil, nome da celebridade favorita, frequência de interação, percepção da celebridade e motivos para consumo do conteúdo relacionado. Para avaliar a força do relacionamento parassocial (RPS), aplicou-se a escala PRISM (Parasocial Relationship in Social Media - Boyd et al., 2022) traduzida para o português. A PRISM contém 22 itens organizados em quatro subescalas: interesse, conhecimento, identificação e interação com a celebridade. As respostas seguem uma escala Likert de 1 (discordo completamente) a 5 (concordo completamente). No Estudo 1, a saúde mental foi avaliada com a escala DASS-21 (Vignolia & Tucci, 2014), composta por 21 itens divididos em três subescalas: depressão, ansiedade e estresse. As respostas variaram de 0 (não se aplicou) a 3 (aplicou-se muito). A solidão foi medida com a Escala de Solidão Social e Emocional (SELSA-S), validada para o português por Guimarães et al. (2019), composta por 15 itens que avaliam os domínios social, familiar e romântico. As respostas variaram de 1 (discordo totalmente) a 7 (concordo totalmente). As dimensões de apego (evitação e ansiedade) foram mensuradas pela Escala de Apego Adulto (EAA), adaptada por Teixeira et al. (2019) a partir do instrumento original de Collins e Read (1990). A escala contém 18 itens em escala Likert de 1 (nem um pouco) a 5 (muito). O suporte social foi avaliado pela Escala de Satisfação com o Suporte Social (ESSS) de Marôco et al. (2014), composta por 15 itens que avaliam satisfação com família, amigos, intimidade e atividades sociais. As respostas variam em escala Likert de 5 pontos. No Estudo 2, além do questionário sociodemográfico e o PRISM, o bem-estar subjetivo foi medido pela Escala de Bem-Estar Subjetivo (EBES) de Albuquerque e Tróccoli (2004), que contém 47 adjetivos e 15 afirmações. Essa escala mensura afetos positivos, negativos e satisfação com a vida. No Estudo 1, o questionário contendo todos os instrumentos foi disponibilizado online via Google Forms e divulgado por meio de redes sociais, fanclubs e panfletos com QR Code, aproveitando a significativa presença virtual dos fãs e grupos de apoio a celebridades.

No Estudo 2, a coleta foi realizada presencialmente no Laboratório de Evolução do Comportamento Humano (LECH) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em

ambiente controlado. Os 163 participantes foram alocados aleatoriamente em três grupos: Grupo RPS (n=55), Grupo Social (n=54) e Grupo Controle (n=54). Os dois primeiros grupos responderam a quatro perguntas específicas sobre sua celebridade favorita ou sobre um amigo/familiar próximo. Essas questões foram baseadas nos estágios fundamentais do desenvolvimento relacional, tanto para relações sociais quanto parassociais, conforme fundamentado em Knapp (1978) e Tukachinsky & Stever (2019). O grupo controle respondeu a perguntas de conhecimento geral neutro. Em seguida, todos responderam ao questionário sociodemográfico, à escala PRISM e à EBES.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando os softwares RStudio, Jamovi e Microsoft Excel. No Estudo 1, foram realizadas regressões lineares para testar se solidão, apego, saúde mental (DASS) e suporte social são preditores da força do relacionamento parassocial. Modelos foram comparados por meio de análises de variância (ANOVA). Para investigar diferenças na força do RPS por gênero, orientação sexual e estado civil, foram usados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Também se analisou a associação entre frequência de interação com a celebridade e força do RPS.

No Estudo 2, foram aplicadas ANOVAs de uma via para comparar os níveis de bem-estar subjetivo (afetos positivos, negativos e satisfação com a vida) entre os grupos RPS, Social e Controle, testando a hipótese de que pensar na celebridade influencia positivamente o bem-estar, assim como pensar em um amigo ou familiar próximo. A relação entre intensidade do RPS e bem-estar foi avaliada por meio de correlação de Pearson. Também foram investigadas diferenças na força do RPS e bem-estar com base na frequência de interação e percepção da celebridade, usando ANOVA e testes de Kruskal-Wallis conforme a normalidade dos dados.

As respostas abertas referentes às semelhanças percebidas e sentimentos associados nos grupos RPS e Social foram codificadas e quantificadas no Excel, permitindo a identificação das palavras e emoções mais recorrentes em ambos os grupos.

Resultados e Discussões

O Estudo 01 analisou a relação entre o RPS, e aspectos como solidão, apego emocional, sintomas de depressão, ansiedade, estresse, e também a satisfação com o apoio social. Os resultados indicaram que a solidão, em suas diferentes formas, não influencia o quanto as pessoas se envolvem emocionalmente com suas celebridades favoritas. Quando olhamos para o apego, apenas a ansiedade no apego (que envolve medo de abandono ou insegurança) teve uma relação significativa, embora pequena, explicando parte da intensidade desse vínculo com a celebridade. Já a evitação, que é o afastamento emocional, não teve impacto nesse envolvimento. Além disso, um conjunto de fatores psicológicos como depressão, ansiedade e estresse explicou um pouco da variação no envolvimento parassocial, mas somente o estresse teve um efeito importante. A satisfação com o suporte social, ou seja, o quanto a pessoa se sente apoiada pelas pessoas ao seu redor, não influenciou o grau desse relacionamento com a celebridade.

Também foi observado que quem interage com mais frequência com a celebridade apresenta um vínculo parassocial mais forte. Outro ponto importante é como as pessoas percebem suas celebridades favoritas. O estudo identificou que aqueles que veem a celebridade como um amigo, membro da família ou parceiro romântico têm um vínculo mais intenso do que aqueles que as enxergam apenas como um exemplo ou modelo a ser seguido.

Os resultados mostraram que a solidão não está associada à intensidade dos RPSs, indicando que pessoas solitárias não buscam compensar sua falta de relações sociais por meio dessas conexões. Isso apoia a ideia de que os RPSs não substituem, mas complementam as relações sociais. A satisfação com o apoio social, por sua vez, só foi um bom preditor da força do RPS para mulheres, que também apresentaram vínculos parassociais mais fortes que homens, reforçando que essas relações seguem padrões semelhantes às relações sociais reais. Quanto ao apego, apenas a ansiedade no apego (medo de abandono) teve relação com a intensidade do RPS, enquanto a evitação não influenciou, alinhado a estudos anteriores. Além disso, não houve diferenças no envolvimento parassocial entre pessoas solteiras e aquelas em relacionamentos estáveis, sugerindo que os RPSs não servem para substituir relacionamentos românticos ausentes. Em relação à saúde mental, depressão e ansiedade não se relacionaram com os RPSs, mas o estresse teve uma associação fraca, indicando que os fãs podem usar o relacionamento parassocial como uma forma de escapar do estresse do dia a dia, o que foi confirmado pelo fato de escapismo ser uma das principais motivações para seguir celebridades.

No Estudo 02, os participantes foram questionados se percebiam semelhanças entre eles mesmos e a pessoa que escolheram, que poderia ser um amigo, um membro da família querido ou sua celebridade favorita. A maioria respondeu que sim, com 96,26% do Grupo S (que escolheu pessoas próximas) e 87,27% do Grupo RPS (que escolheu celebridades) reconhecendo aspectos parecidos, que incluíam características físicas, emocionais e de personalidade.

Quando questionados sobre o que sentem ao encontrar essa pessoa próxima, o Grupo S relatou principalmente alegria, mencionada por 71,15% dos participantes, além de sentimentos de conforto (28,84%) e segurança (21,15%). Algumas respostas destacaram a sensação de bem-estar, a liberdade de ser eles mesmos e a leveza que sentem, como se os problemas desaparecessem ao estar com essa pessoa. Já o Grupo RPS, ao ser perguntado sobre o que sentem quando se deparam com sua celebridade favorita — por exemplo, ao ouvir sua voz ou assistir a um vídeo —, também relatou emoções positivas, como alegria (43,63%), euforia (27,27%) e conforto (16,36%). Outros sentimentos mencionados incluíram orgulho, nostalgia e paz. Alguns participantes descreveram essas experiências como momentos de calma e esperança, felicidade com reações físicas como aceleração do coração, e até uma sensação confortável semelhante à companhia de um amigo próximo.

Apesar das expectativas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao bem-estar subjetivo. Os níveis de afeto positivos, afetos negativos e satisfação com a vida foram muito similares. Uma correlação significativa foi encontrada entre a intensidade do RPS e os afetos positivos, indicando que quanto maior o envolvimento com a celebridade, maior a tendência a sentir emoções positivas. Porém, não houve associação entre o RPS, afetos negativos e satisfação com a vida.

Em relação à frequência de interações com a celebridade favorita, a análise revelou que as pessoas que interagem mais frequentemente possuem um vínculo parassocial mais forte, repetindo um padrão semelhante ao encontrado no Estudo 01. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos de frequência em termos de afetos positivos, afetos negativos ou satisfação com a vida. Por fim, a percepção que as pessoas têm de suas celebridades favoritas também se relaciona com o bem-estar subjetivo. A análise revelou que os participantes que veem suas celebridades como parceiros românticos apresentaram níveis

menores de satisfação com a vida e menor identificação com a celebridade em comparação com aqueles que as veem como amigos, membros da família ou exemplos a serem seguidos.

No Estudo 02, tanto os participantes que pensaram em pessoas próximas quanto os que pensaram em suas celebridades favoritas reconhecem semelhanças com esses objetos de afeto e relataram emoções positivas, mostrando que RPSs podem contribuir para o bem-estar subjetivo. Porém, a tarefa usada para ativar essas relações pode ter sido pouco eficaz, já que não houve diferenças significativas entre os grupos em termos de bem-estar. Mulheres apresentaram não só RPSs mais intensos, mas também maior bem-estar subjetivo. Por outro lado, quem vê a celebridade como parceiro romântico mostrou menor satisfação com a vida e menos identificação, sugerindo que a falta dessa identificação pode afetar negativamente seu bem-estar.

Uma das limitações de nosso estudo foi que ele não distinguiu tipos específicos de RPS ou celebridades; também reconhecemos que relacionamentos parassociais românticos, ainda pouco explorados, merecem mais atenção. Por fim, sugerimos que futuras pesquisas investiguem temas inovadores, como a relação entre RPS e criatividade ou o impacto das interações imaginadas na solução de problemas pessoais.

Conclusão

Este trabalho investigou a formação e os efeitos dos relacionamentos parassociais (RPSs) a partir de duas perspectivas teóricas principais: a Hipótese da Compensação, Substituição ou Deficiência (CSD) e a Hipótese de Panksepp-Jakobson (PJ). Os resultados dos dois estudos indicam que os RPSs não são utilizados para suprir deficiências em relações sociais reais, como sugerido pela hipótese CSD. Pelo contrário, indivíduos que apresentam maior satisfação com o suporte social tendem a desenvolver relações parassociais mais intensas, especialmente entre mulheres, corroborando a hipótese PJ, que entende os RPSs como extensões ou reflexos das relações sociais. No segundo estudo, embora o experimento não tenha detectado mudanças significativas no bem-estar subjetivo ao evocar mentalmente a celebridade favorita, a análise qualitativa mostrou que pensar na celebridade gera sentimentos positivos similares aos provocados por amigos ou familiares próximos. Isso sugere que os RPSs podem ter um papel emocional qualitativo, promovendo conforto e bem-estar no cotidiano. A diversidade da amostra permitiu observar variações na força dos RPSs de acordo com gênero, frequência de interação e percepção da celebridade, mostrando que tais vínculos são influenciados por fatores sociais e culturais. Este trabalho contribui para uma compreensão mais ampla dos RPSs, afastando-os da visão simplista de mera compensação emocional, e destaca a importância dessas relações na dinâmica social contemporânea, especialmente no ambiente digital. Esperamos que este estudo sirva de base para futuras pesquisas que aprofundem a compreensão dos relacionamentos parassociais e suas implicações para o bem-estar emocional e social dos indivíduos.

Referências

- Horton, D., & Wohl, R. R. Mass communication and para-social interaction; observations on intimacy at a distance. *Psychiatry*, v. 19, p. 215–229, 1956.
- Bowlby, J. *Attachment and loss: Vol. 1. Attachment*. London, UK: Hogarth, 1969.

Ainsworth, M. Patterns of attachment: A psychological study of the strange situation. Hillsdale, NJ: Erlbaum, 1978.

Baumeister, R. F., & Leary, M. R. The need to belong: Desire for interpersonal attachments as a fundamental human motivation. *Psychological Bulletin*, v. 117, n. 3, p. 497–529, 1995.

Hartmann, T. Parasocial interaction, parasocial relationships and well-being. In: Reinecke, L. & Oliver, M. B. (Eds.). *The Routledge handbook of media use and well-being*. New York: Routledge, 2017. p. 131–145.

Boyd, A. T., Morrow, J. A., & Rocconi, L. M. Development and validation of the Parasocial Relationship in Social Media Survey. *The Journal of Social Media in Society*, v. 11, n. 2, p. 192–208, 2022.

Guimarães, A. L. L., Fonsêca, P. N., Machado, G. M. A., Guimarães, C. L. C., & Silva, P. G. N. Social and Emotional Loneliness Scale for Adults: evidências psicométricas no nordeste brasileiro. *Ciências Psicológicas*, v. 13, n. 2, p. 283–295, 2019.

Vignola, R. C., & Tucci, A. M. Adaptation and validation of the depression, anxiety and stress scale (DASS) to Brazilian Portuguese. *Journal of Affective Disorders*, v. 155, p. 104–109, 2014.

Tukachinsky, R., Walter, N., & Saucier, C. J. Antecedents and effects of parasocial relationships: A meta-analysis. *The Journal of Communication*, v. 70, n. 6, p. 868–894, 2020.

Mikulincer, M., & Shaver, P. R. Attachment orientations and emotion regulation. *Current Opinion in Psychology*, v. 25, p. 6–10, 2019.

Cohen, J. Parasocial breakup from favorite television characters: The role of attachment styles and relationship intensity. *Journal of Social and Personal Relationships*, v. 21, p. 187–202, 2004.

Bernhold, Q. S. Parasocial relationships with disliked television characters, depressive symptoms, and loneliness among older adults. *Journal of Applied Communication Research*, v. 47, n. 5, p. 548–570, 2019.

Liebers, N. Unfulfilled romantic needs: Effects of relationship status, presence of romantic partners, and relationship satisfaction on romantic parasocial phenomena. *Psychology of Popular Media*, v. 11, n. 2, p. 237–247, 2022.

Stein, J. P., Liebers, N., & Faiss, M. Feeling Better...But Also Less Lonely? An Experimental Comparison of How Parasocial and Social Relationships Affect People's Well-Being. *Mass Communication and Society*, v. 27, n. 3, p. 576–598, 2022.

Diener, E., Oishi, S., & Tay, L. Advances in subjective well-being research. *Nature Human Behaviour*, v. 2, n. 4, p. 253–260, 2018.

Schiappa, E., Allen, M., & Gregg, P. B. Parasocial relationships and television: A meta-analysis of the effects. *Mass media effects research*, p. 301–314, 2007.

Bond, B. J. Parasocial Relationships with Media Personae: Why They Matter and How They Differ Among Heterosexual, Lesbian, Gay, and Bisexual Adolescents. *Media Psychology*, v. 21, n. 3, p. 457–485, 2018.

Marôco, J. P., Campos, J. A. D. B., Vinagre, M. da G., & Pais-Ribeiro, J. L. Adaptação Transcultural Brasil-Portugal da Escala de Satisfação com o Suporte Social para Estudantes do Ensino Superior. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v. 27, n. 2, p. 247–256, 2014.

Tukachinsky, R. Para-romantic love and para-friendships: Development and assessment of a multiple parasocial relationships scale. *American Journal of Media Psychology*, v. 3, n. 1/2, p. 73-94, 2011.

Kanazawa, S. Bowling with our imaginary friends. *Evolution and Human Behavior*, v. 23, n. 3, p. 167–171, 2002.

CÓDIGO: HS1144

AUTOR: THAMIRES GRAZIELA MARINHO MAIA

COAUTOR: LARA GOMES DE SOUZA SILVEIRA

COAUTOR: SYLVIA GALVÃO DE VASCONCELOS PINHEIRO

ORIENTADOR: FIVIA DE ARAUJO LOPES

TÍTULO: Nível socioeconômico e pró-sociabilidade em crianças

Resumo

Status socioeconômico subjetivo (SSS) é a percepção do indivíduo sobre sua posição socioeconômica, o que tem potencial modulador de comportamentos por respostas emocionais e fisiológicas. O SSS não tem correlação exata com o status socioeconômico objetivo (SSO), mas estudos com adultos e adolescentes mostram correlação baixa ou moderada entre eles. O meio da infância é discutido como um período crucial para a diminuição do SSS com o aprendizado sobre o ambiente social com familiares e comunidade. Este estudo teve como objetivo investigar o SSS de crianças brasileiras de acordo com sua idade e com o seu SSO. Para medir o SSS, foi utilizada a escala MacArthur para adultos e adaptada para crianças. Coletamos dados sociodemográficos com medidas objetivas de status e classe social. Realizamos correlações de Spearman entre as variáveis. Participaram do estudo 62 crianças de 6 a 10 anos (31 meninas, Idade = 7,9 anos e Média da classe social = "B1"). Encontramos que o SSS das crianças tem uma associação inversa com a idade, crianças mais jovens têm SSS mais elevado que mais velhas. Esses achados corroboram transições anteriores detectadas em crianças de diversas populações e a importância dos marcos cognitivos do meio da infância. Não encontramos uma relação entre o SSS das crianças e o SSS e o SSO familiar. Pretendemos atingir uma amostra maior para ampliar os conhecimentos sobre o desenvolvimento do SSS e avaliar o efeito em importantes comportamentos sociais como partilha.

Palavras-chave: Desenvolvimento social. Status socioeconômico. Autopercepção.

TITLE: Socioeconomic status and pro-sociability in children

Abstract

Subjective socioeconomic status (SSS) is an individual's perception of their socioeconomic position, which has the potential to modulate behavior through emotional and physiological responses. SSS does not correlate exactly with objective socioeconomic status (OS), but studies with adults and adolescents show a low or moderate correlation between them. Middle childhood is discussed as a crucial period for the decline of SSS through learning about the social environment from family and community. This study aimed to investigate the SSS of Brazilian children according to their age and SSO. To measure SSS, we used the MacArthur scale for adults and adapted for children. We collected sociodemographic data with objective measures of status and social class. We performed Spearman correlations

between the variables. Sixty-two children aged 6 to 10 participated in the study (31 girls, M age = 7.9 years, and mean social class = "B1"). We found that children's SSS is inversely associated with age, with younger children having higher SSS than older children. These findings corroborate previous transitions detected in children from diverse populations and the importance of middle childhood cognitive milestones. We found no relationship between children's SSS and family SSS and SSO. We aim to reach a larger sample to expand our knowledge about SSS development and assess its effect on important social behaviors such as sharing.

Keywords: Social development. Socioeconomic status. Self-perception.

Introdução

A espécie humana tem, na cooperação, um dos seus pilares para a vida em grupo. Apesar disso, a compreensão da cooperação na espécie sempre se mostrou um desafio a partir de uma perspectiva evolucionista, uma vez que ações cooperativas envolvem custos para quem as realiza em benefício de outras pessoas. Estudos recentes sugerem que fatores ambientais como status socioeconômico e a desigualdade econômica podem modular comportamentos cooperativos. No caso de comportamentos pró-sociais como a partilha, os achados se dividem em relação ao papel da classe socioeconômica em motivar ou desencorajar a generosidade de adultos e crianças (Benenson et al., 2007; Guinote et al., 2015; Rochat et al., 2009). Poucas pesquisas focam em como aspectos mais subjetivos, como a percepção da classe e da desigualdade social influenciam na disposição para compartilhar recursos, sendo em sua maioria estudos feitos com populações adultas e em países com baixa ou moderada taxa de desigualdade social (Côté et al., 2015).

A posição socioeconômica da população consiste em uma importante medida para pesquisas em saúde, pois pode ajudar a direcionar programas de políticas públicas, monitorando e avaliando os aspectos financeiros e de possibilidades de acesso da população. Desse modo, para mensurar esse status econômico, normalmente, são utilizados indicadores como renda, gastos com consumo e índice de riqueza, analisando propriedades de bens de consumo duráveis, acesso a serviços e características da moradia. Essas medidas são consideradas quantitativas e são tidas como "objetivas", caracterizando, assim, o Status Econômico Objetivo (SSO) (Howe et al., 2011; Zhao et al., 2023).

Entretanto, essa maneira de avaliar a posição socioeconômica mostra-se, por vezes, insuficientes em retratar a realidade de vida da população. Portanto, torna-se imprescindível outras formas de avaliação da posição socioeconômica complementares ao modo objetivo. Dessa forma, o Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) aparece como alternativa, designando a percepção dos indivíduos sobre sua própria posição socioeconômica (Zhao et al., 2023). De acordo com pesquisas anteriores, esse modo de avaliar mostra-se, por sua vez, um melhor preditor sobre a saúde, elucidando uma maior influência sobre aspectos de saúde mental e física. Isso acontece, uma vez que a autopercepção sobre a situação financeira, posição e oportunidades sociais resultam em respostas emocionais e fisiológicas, como depressão, problemas cardiovasculares e obesidade (Adler et al., 2008; Sanchón-Macias et al., 2013; Singh-Manoux et al., 2003; Zhao et al., 2023).

Além disso, essa autopercepção pode também resultar em interferência em aspectos do comportamento social, interferindo em atitude e escolhas políticos, por exemplo (Benenson et al., 2007, Brown-Iannuzzi et al., 2017; Medeiros, 2014), sendo o meio da infância um período crucial para o aprendizado sobre ambiente social (Schffer, 2022), por meio de

relacionamentos familiares e comunitários (Almeida, 2013), o qual contribui para a formação da perspectiva da posição socioeconômica ocupada.

Sendo a redução da desigualdade um dos principais objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU, é relevante investigar o impacto do contexto socioeconômico em comportamentos sociais, auxiliando a compreensão de mecanismos que moldam sociedades mais justas. Nesse sentido, o objetivo de nosso trabalho reflete uma primeira etapa dessa compreensão, se propondo a identificar as relações entre a percepção do SSS em crianças, seu SSO e escolaridade dos pais, de acordo com as faixas etárias das crianças, a partir de uma tarefa on-line.

Metodologia

Participantes

Participaram crianças de 6 a 10 anos de idade, com desenvolvimento típico, e seus cuidadores. O recrutamento dos participantes foi pelo método bola de neve (snowball sampling), no qual as pesquisadoras contactaram pessoas próximas com filhos na faixa etária adequada e as convidaram a participar. Estas, por sua vez, recomendam outras pessoas para participar da pesquisa, e assim por diante. Tal método possui limitações, mas é uma maneira de estabelecer uma relação de confiança com os participantes. Também foi realizada divulgação em redes sociais como Facebook (incluindo grupos com temática de atividades para crianças), Instagram, Whatsapp e X (antigo Twitter).

Instrumentos

Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) – Para avaliar o SSS, foi utilizada, junto às crianças, a escala MacArthur adaptada. Essa escala originalmente busca obter uma percepção mais do senso comum sobre status econômicos, em que consiste na pessoa se posicionar em uma escada com dez degraus a partir de como ela enxerga sua situação socioeconômica, sendo quanto mais alto na escada, mais alto o status (Ferreira et al., 2018). Na versão adaptada para as crianças foram utilizadas cinco casas de tamanhos diferentes, em que a criança deveria selecionar a que ela achava que correspondia a sua residência.

Os instrumentos abaixo eram preenchidos pelos responsáveis, antes das crianças participarem da pesquisa:

Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) – Para avaliar o SSS, foi utilizada, junto aos cuidadores, a escala MacArthur (Ferreira et al., 2018).

Status Socioeconômico Objetivo (SSO) – Para avaliar o SSO, foi utilizado o Critério Brasil (Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa, 2024), o qual se estrutura em identificar a capacidade de consumo e classificar os domicílios por meio de informação sobre recursos e estruturas tidas na residência, operacionalizando conforme a geografia brasileira. Tal medida fornece uma indicação da classe social da família, podendo ir de classe A à classe E.

Questionário sociodemográfico – Instrumento que continha questões variadas, incluindo renda familiar (calculada com a renda mensal da família), nível educacional dos pais (calculada com uma soma de pontos entre os dois cuidadores da família – a escala usou

pontos para cada nível educacional, entre “1” para Ensino médio incompleto e 10 para Diploma de Doutorado) e etnia dos participantes.

Aspectos éticos

O projeto foi devidamente aprovado pelo comitê de ética, parecer nº 5.611.979.

Análise dos dados

Foram realizadas correlações de Spearman entre medidas de status subjetivo, objetivo, idade dos participantes, educação familiar e renda familiar. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Participaram da pesquisa 62 crianças entre 6 e 10 anos, sendo a amostra constituída por 31 meninos e 31 meninas, com a média de idade de 7,95 anos, pertencentes em média à classe B1 de acordo com o Critério Brasil, correspondendo a classe média/média alta. Além disso, com relação à etnia, a amostra teve 45,1% de etnia branca, 41,8% de etnia parda e 12,9% de outras etnias.

As correlações entre as variáveis destacadas neste estudo, podem ser visualizadas na Tabela 1. Com relação ao Status Socioeconômico Subjetivo das crianças e sua idade, foi encontrada uma correlação negativa entre as variáveis ($r^2 = -0,44$; $p < 0,01$) (Figura 1), ou seja, quanto mais novas as crianças, mais elevados elas percebem seu SSS, corroborando pesquisas anteriores no mundo. Um exemplo foi a pesquisa realizada por Amir et al. (2019), usando a escala MacArthur para ver o SSS de crianças e adolescentes de 4 a 18 anos, na Índia, Estados Unidos, Argentina e em duas comunidades indígenas da Amazônia equatoriana, em que os resultados foram na mesma direção dos encontrados em nosso estudo.

Já com relação entre o Status Socioeconômico Subjetivo das crianças e dos pais não foi possível encontrar correlação significativa entre as medidas ($r^2 = 0,03$; $p > 0,05$), tal como pode ser observado na Figura 2. Esse resultado difere de padrões anteriores, como no estudo de Mistry et al. (2015), em que foi realizada uma pesquisa com 117 crianças de 10 a 12 anos na escola primária laboratorial no sul da Califórnia, o qual foi possível ver uma correlação entre o SSS das crianças com a posição socioeconômica da família. Acreditamos que o fato de termos crianças mais jovens em nossa amostra, possa ter relação com essa diferença.

Por fim, o SSS das crianças não se correlacionou nem com Educação familiar ($r^2 = -0,08$; $p > 0,05$), nem com Renda familiar ($r^2 = 0,05$; $p > 0,05$), duas medidas fornecidas pelos cuidadores, que são parâmetros consistentes do Status social objetivo (SSO) da família.

Conclusão

Apesar do resultado no Brasil em concordância com outros lugares do mundo quanto ao dado de que crianças com menos idade apresentam uma percepção mais elevada do Status socioeconômico subjetivo (SSS), os resultados encontrados foram insuficientes para caracterizar, minimamente, como se dá o processo de formação da percepção sobre a posição socioeconômica, principalmente no que se refere a influência familiar nesse processo. Dessa

maneira, torna-se indiscutível a necessidade de novas pesquisas na área a fim de ampliar os conhecimentos sobre SSS. Além disso, tal assunto se mostra de extrema relevância, uma vez que tem grande influência em aspectos de bem-estar, saúde e comportamento da população, impactando no surgimento de doenças físicas e mentais, nos níveis de estresse e comportamentos de colaboração social, justiça e formação de preconceitos (Baum & Yali, 1999; Elenbaas, 2019; Gaspar & Balancho, 2017; Sanchón-Macias et al., 2013).

Referências

- Adler, N., Singh-Manoux, A., Schwartz, J., Stewart, J., Matthews, K., & Marmot, M. G. (2008). Social status and health: A comparison of British civil servants in Whitehall-II with European- and African-Americans in CARDIA. *Social Science & Medicine*, 66(5), 1034–1045. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2007.11.031>
- Almeida, F. P. L de (2013). As origens evolutivas da cooperação humana e suas implicações para a teoria do direito. *Revista Direito Gv*, 9(1), 243–268. <https://doi.org/10.1590/s1808-24322013000100009>
- Amir, D., Vallengia, C., Srinivasan, M., Sugiyama, L. S., & Dunham, Y. (2019). Measuring subjective social status in children of diverse societies. *Plos One*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226550v>
- Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (2024). Critério de Classificação Econômica Brasil. 1-7. https://abep.org/wp-content/uploads/2024/09/01_cceb_2024.pdf
- Baum, A., Garofalo, J. P., & Yali, A. M. (1999). Socioeconomic Status and Chronic Stress: Does Stress Account for SES Effects on Health? *Annals of the New York 133 Academy of Sciences*, 896(1), 131–144. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08111.x>
- Benenson, J. F., Pascoe, J., & Radmore, N. (2007). Children’s altruistic behavior in the dictator game. *Evolution and Human Behavior*, 28(3), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2006.10.003>
- Brown-Iannuzzi, J. L., Lundberg, K. B., & McKee, S. (2017). The politics of socioeconomic status: how socioeconomic status may influence political attitudes and engagement. *Current Opinion in Psychology*, 18(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.06.018>
- Côté, S., House, J., & Willer, R. (2015). High economic inequality leads higher-income individuals to be less generous. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 15838–15843.
- 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>
- Ferreira, W. de A., Giatti, L., Figueiredo, R. C. de, Mello, H. R. de, & Barreto, S. M. (2018). Validade Concorrente e de Face da Escala de MacArthur para Avaliação do Status Social Subjetivo: Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil). *Ciência & Saúde Coletiva*, 23(4), 1267–1280. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018234.16972016>

Gaspar, T., & Balancho, L. (2017). Fatores pessoais e sociais que influenciam o bem-estar subjetivo: diferenças ligadas estatuto socioeconômico. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(4), 1373–1380. <https://doi.org/10.1590/1413-81232017224.07652015>

Guinote, A., Cotzia, I., Sandhu, S., & Siwa, P. (2015). Social status modulates prosocial behaviour and egalitarianism in preschool children and adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 731-736.

Howe, L. D., Hargreaves, J. R., Ploubidis, G. B., De Stavola, B. L., & Huttly, S. R. A. (2011). Subjective measures of socio-economic position and the wealth index: a comparative analysis. *Health Policy and Planning*, 26(3), 223–232. <https://doi.org/10.1093/heapol/czq043>

Medeiros, M. W. A. de . (2014). O comportamento pró-social de crianças com sintomatologia do transtorno da conduta [Dissertação O comportamento pró-social de crianças com sintomatologia do transtorno da conduta].

Mistry, R. S., Brown, C. S., White, E. S., Chow, KA & Gillen-O'Neel, C. (2015). Raciocínio de crianças do ensino fundamental sobre classe social: um estudo de métodos mistos. *Child Dev*, 86: 1653-1671. <https://doi.org/10.1111/cdev.12407>

Rochat, P., Dias, M. D., Liping, G., Broesch, T., Passos-Ferreira, C., Winning, A., & Berg, B. (2009). Fairness in distributive justice by 3-and 5-year-olds across seven cultures. *Journal of Cross-Cultural Psychology*, 40(3), 416-442.

Sanchón-Macias, M. V., Prieto-Salceda, D., Bover-Bover, A., & Gastaldo, D. (2013). Relação entre status social subjetivo e saúde percebida entre mulheres imigrantes latino-americanas. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 21(6), 1353-9. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.2943.2374>

Schffer, C. C. R. (2022). Fundamentos da teoria piagetiana do desenvolvimento cognitivo. *Paidéia*, 17(27), 19-44. <https://revista.fumec.br/index.php/paideia/article/view/9461>

Singh-Manoux, A., Adler, N. E., & Marmot, M. G. (2003). Subjective social status: its determinants and its association with measures of ill-health in the Whitehall II study. *Social Science & Medicine*, 56(6), 1321–1333. [https://doi.org/10.1016/s0277-9536\(02\)00131-4](https://doi.org/10.1016/s0277-9536(02)00131-4)

Zhao, M., Huang, C.-C., Mendoza, M., Tovar, X., Lecca, L., & Murray, M. (2023). Subjective socioeconomic status: an alternative to objective socioeconomic status. *BMC Medical Research Methodology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12874-023-01890-z>

Anexos

Anexos dos resultados

Anexos dos resultados

Anexos dos resultados

CÓDIGO: HS1759

AUTOR: ELLEN ABIGAIL LIMA DE SOUSA

COAUTOR: KAREN CRISTINA PUGLIANE

ORIENTADOR: JOHN FONTENELE ARAUJO

TÍTULO: Relação entre a estabilidade e variabilidade do ciclo sono e vigília e a variabilidade da glicemia.

Resumo

O presente estudo explorou a relação entre o ciclo sono-vigília e o controle glicêmico em 17 estudantes de medicina. A investigação utilizou actimetria para avaliar a estabilidade (IS) e a variabilidade (IV) do ciclo de atividade-reposo, e monitoramento contínuo de glicose para mensurar a variabilidade glicêmica. Os resultados, obtidos através de correlações de Spearman, mostraram que uma maior Estabilidade Interdiária (IS) foi significativamente associada a um menor Coeficiente de Variação (CV) da glicose ($\rho=-0,483$; $p=0,049$), indicando que rotinas mais regulares de sono-vigília estão ligadas a uma melhor estabilidade da glicemia. O Índice de Regularidade de Exposição à Luz (LRI) também apresentou uma correlação negativa notável com o CV ($\rho=-0,574$; $p=0,016$), sublinhando a importância da luz como um fator sincronizador. Por outro lado, a Variabilidade Intradiária (IV) e outras métricas de sono, como sua duração e eficiência, não se correlacionaram significativamente com o CV. Isso sugere que a regularidade circadiana tem um papel mais proeminente na homeostase glicêmica do que a fragmentação do sono. Embora a glicemia média fosse mais alta em homens, não houve diferenças sexuais significativas na variabilidade glicêmica ou nas métricas circadianas. A pesquisa destaca a relevância da regularidade do ritmo circadiano para a saúde metabólica, apesar das limitações impostas pelo pequeno tamanho amostral.

Palavras-chave: Ritmo circadiano. Metabolismo. Sono. Glicose. Estabilidade Interdiária

TITLE: Relationship between the stability and variability of the sleep-wake cycle and glycemic variability.

Abstract

This study investigated the link between the sleep-wake cycle and glycemic control in 17 medical students. It used actimetry to assess interdaily stability (IS) and intradaily variability (IV) of the rest-activity rhythm and continuous glucose monitoring to measure glycemic variability. Spearman's correlations revealed that greater Interdaily Stability (IS) was significantly associated with a lower Coefficient of Variation (CV) of glucose ($\rho=-0.483$; $p=0.049$), indicating that a more regular sleep-wake routine is linked to improved glycemic stability. The Light Regularity Index (LRI) also showed a strong negative correlation with the CV ($\rho=-0.574$; $p=0.016$), highlighting the crucial role of light as a synchronizing factor. In contrast, Intradaily Variability (IV) and other sleep metrics, such as duration and efficiency, did not correlate significantly with the CV. This suggests that

circadian regularity may play a more dominant role in glycemic homeostasis than sleep fragmentation. While mean glucose levels were higher in men, no significant sex differences were found in glycemic variability or circadian metrics. The findings underscore the importance of circadian rhythm regularity for metabolic health, despite the study's limitations due to its small sample size.

Keywords: Circadian rhythm. Metabolism. Sleep. Glucose. Interdaily stability.

Introdução

A regulação do metabolismo glicêmico envolve uma complexa interação entre mecanismos celulares e respostas fisiológicas, sendo fortemente influenciada pelo aumento da glicose plasmática após a ingestão alimentar. Além disso, o metabolismo da glicose apresenta variações ao longo do dia devido à modulação circadiana, de modo que a resposta glicêmica a uma mesma refeição pode diferir conforme o horário (SUYOTO, V. et al., 2024). Nesse contexto, o sono emerge como um fator crítico para a homeostase metabólica, uma vez que distúrbios no sono têm sido associados a um maior risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (COPINSCHI, G. et al., 2014). O ciclo sono-vigília é regulado por um modelo de processos que integra componentes homeostáticos e circadianos. (BORBÉLY, A.A., 1982) O componente homeostático reflete a necessidade acumulada de sono e vigília, explicando fenômenos como o rebote do sono após privação parcial ou total, associado a alterações metabólicas, incluindo aumento da atividade simpática e da temperatura corporal (ANCOLI-ISRAEL, 2009). O componente circadiano, por sua vez, determina os períodos de maior propensão ao sono e à vigília, influenciando respostas fisiológicas, como a regulação glicêmica (ASHER, G.; SASSONE-CORSI, P., 2015). A quantificação dos componentes de regulação do ciclo sono-vigília pode ser realizada por meio da actimetria, permitindo a obtenção das variáveis Estabilidade Interdiária (IS) e Variabilidade Intradiaária (IV), que descrevem, respectivamente, a regularidade diária do ciclo sono-vigília e a fragmentação ao longo do dia que correspondem ao componente circadiano e homeostático definido pelo modelo dos dois processos, conforme preconiza o trabalho de Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES, B. S. B. et al. 2015). Paralelamente, a variabilidade glicêmica, obtida por meio do monitoramento contínuo da glicose, constitui um indicador robusto da regulação metabólica, fornecendo informações mais precisas do que medidas isoladas, como a glicemia de jejum (HJORT, A. et al. 2024). No entanto, permanece pouco explorada a relação direta entre IS e IV e a variabilidade glicêmica, bem como potenciais diferenças entre homens e mulheres. A escolha por adicionar à pesquisa um recorte de diferenças entre sexos é crucial, visto que o sexo e o gênero atuam como modificadores significativos na saúde e na medicina, influenciando a fisiologia, as manifestações clínicas e a resposta ao tratamento de doenças, incluindo as de origem metabólica (DUARTE, F. G. et al., 2019). Diante disso, diversos estudos ressaltam que projetos científicos devem considerar as especificidades relacionadas ao sexo e ao gênero, uma vez que estas influenciam mecanismos fisiológicos e resultados em saúde (RICH-EDWARDS et al., 2018). Ademais, evidências reforçam que fatores hormonais intrínsecos das pessoas do sexo feminino podem influenciar a ritmicidade do comportamento atividade-reposo (HAJALI et al., 2019). Além disso, diferenças relacionadas ao ciclo menstrual também têm impacto sobre o sono em mulheres, reforçando a necessidade de considerar o sexo biológico e aspectos hormonais nas investigações sobre sono e metabolismo (MANBER; BOOTZIN, 1997). Dessa forma, o presente estudo visa compreender se a estabilidade (IS) e a variabilidade (IV) do ciclo sono-vigília influenciam o metabolismo glicêmico, avaliando também a influência da duração e qualidade do sono e comparando diferenças entre os sexos. A compreensão dessas relações poderá fornecer

subsídios para estratégias de prevenção de distúrbios metabólicos, contribuindo para a promoção da saúde e do bem-estar.

Metodologia

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (parecer nº 5.678.410, CAAE 60610322.7.0000.5537). Ocorreu a leitura e assinatura física em duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), sendo uma via arquivada no laboratório e outra entregue ao participante. Critérios de Inclusão e Exclusão A coleta de dados foi conduzida na UFRN, com o recrutamento de 23 ingressantes no período de 2025.1 do curso de Medicina. A amostra final consistiu em 17 participantes (73,9% do total de recrutados), sendo 11 homens (64,7%) e 6 mulheres (35,3%) que atingiram os critérios de inclusão. Os critérios de exclusão consistiram em: dificuldades no manejo dos dispositivos, insuficiência de dados para processamento, falhas nos equipamentos ou diagnóstico de doenças crônicas metabólicas, como diabetes. Essa triagem resultou em uma perda amostral de aproximadamente 26,1%, sendo necessários para reduzir vieses na análise.

Medidas Subjetivas

Para avaliação subjetiva, foram aplicados questionários validados: dados demográficos e hábitos de vida (questionário sócio-demográfico), saúde mental (DASS-21), atividade física (IPAQ) e perfil crononutricional (QPC). O sono e o cronotipo foram investigados com Horne-Ostberg, MCTQ, PSQI, Escala de Sonolência de Epworth, Índice de Gravidade de Insônia, Questionário de Berlim e Índice de Higiene do Sono. A análise completa dos questionários será realizada em estudos subsequentes. Além disso, os participantes registraram diários de sono via Google Forms, incluindo horários de início, término e cochilos diurnos. Concomitantemente, os registros alimentares foram coletados por meio do aplicativo WhatsApp por meio de um sistema automatizado para captura de dados e registro em planilha, em que os voluntários enviavam horários e conteúdos das primeiras e últimas refeições diárias, facilitando o registro da janela alimentar e análise temporal dos padrões de horário alimentar.

Medidas

Objetivas

A coleta ocorreu no período de transição entre outono e inverno brasileiro (junho a julho de 2025). O ritmo de atividade-reposo foi monitorado por 4 semanas com o actímetro ACT10®, coletando movimento, exposição luminosa e temperatura corporal e ambiental a cada minuto. Momentos em que o aparelho foi removido do pulso (offwrist) foram excluídos pelo software Actstudio. Posteriormente, o processamento foi realizado para a análise detalhada dos parâmetros de sono-vigília utilizando o script da condor instruments. A variação glicêmica foi monitorada por 14 dias com sensor FreeStyle Libre, registrando medições a cada 15 minutos. Os participantes realizaram leituras do sensor a cada 8 horas. A aquisição dos dados foi realizada pelo software Libre View e foram gerados relatórios posteriormente disponibilizados aos participantes. *Processamento e Análise Estatística* Os dados coletados foram conduzidos pelo Google Colab, utilizando a linguagem Python. Para a organização e análise descritiva, foi utilizada a biblioteca Pandas. A visualização gráfica foi realizada por meio da Matplotlib e da Seaborn. Ademais, o fluxograma foi construído com a linguagem de diagramação Mermaid e o serviço de Interface de Programação de Aplicações (API) Kroki. As análises estatísticas, elaboração de tabelas e gráficos, ocorreu utilizando o programa Jamovi versão 2.6.44, além das análises estatísticas inferenciais e os testes de normalidade que foram executados com o mesmo programa. Para avaliar a influência das variáveis do ritmo de repouso-atividade sobre o controle glicêmico,

foram realizadas correlações de Spearman, sendo estabelecido para interpretação dos dados nível de significância convencional $p = 0,05$, sendo valores inferiores a esse indicadores de significância do resultado da matriz de correlação. Foi realizada a análise da relação entre as variáveis não paramétricas do ritmo atividade e repouso associados ao componente circadiano (SLETTE, T. L. et al., 2023 ;DAVID, M. C. M. M. et al.,2022), como a Estabilidade Interdiária (IS) e o Índice de Regularidade de Exposição à Luz (LRI), Índice de Regularidade do Sono (SRI) bem como ao componente homeostático, representado pela Variabilidade Intradiária (IV), L5, M10, a Amplitude Relativa (RA). As variáveis rítmicas foram correlacionadas com os seguintes parâmetros de controle glicêmico: glicose média, Coeficiente de Variação (CV) intradia e o desvio padrão do tempo do primeiro pico glicêmico pós-vigília. O CV, um índice de variabilidade glicêmica, foi calculado pela razão entre o desvio padrão (DP) e a média da glicose, expresso em porcentagem ($CV = DP/média \times 100$). O primeiro pico glicêmico pós-vigília foi determinado a partir de dados do monitoramento contínuo de glicose (CGM), os quais foram submetidos à suavização e análise. A seleção do pico considerou apenas eventos ocorridos durante o período de vigília, com base em critérios fisiológicos de amplitude mínima em relação ao nadir precedente e latência em relação ao horário de despertar. Em seguida, foi perquirida a duração e a qualidade do sono, também por meio da correlação de Spearman. As variáveis de sono — como o tempo total de sono, o tempo na cama e a eficiência do sono — foram correlacionadas com as mesmas métricas de controle glicêmico já mencionadas.

Essa abordagem metodológica permitiu avaliar a influência de aspectos clássicos do sono sobre a homeostase glicêmica. Por fim, para explorar possíveis diferenças sexuais, foi realizada uma análise de comparação entre os grupos de homens(grupo 2) e mulheres(grupo 1). Para as métricas de ciclo sono-vigília, ritmo de atividade e repouso, regularidade de exposição à luz e controle glicêmico, os dados foram comparados utilizando o teste t de Student para amostras independentes ou o teste de Mann-Whitney. A escolha entre os testes paramétricos e não paramétricos foi feita com base na verificação prévia dos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Levene).

Resultados e Discussões

Correlação de variáveis ritmo repouso-atividade com o regulação glicêmica

A análise estatística revelou correlações relevantes entre parâmetros circadianos e variabilidade glicêmica. A Estabilidade Interdiária (IS) apresentou correlação negativa significativa com o Coeficiente de Variação da Glicose (CV) ($\rho = -0,483$; $p = 0,049$), indicando que maior regularidade no padrão repouso-atividade se associa a menor dispersão glicêmica — um indicador de controle metabólico mais eficiente. De forma complementar, o Índice de Regularidade de Exposição à Luz (LRI) apresentou correlação negativa ainda mais expressiva com o CV ($\rho = -0,574$; $p = 0,016$), ressaltando a importância da luz como sincronizador biológico fundamental na regulação da glicemia (ARAÚJO, J.F.,2025). Por outro lado, a Variabilidade Intradiária (IV) ($\rho = 0,108$; $p = 0,692$), bem como as demais métricas de ritmo como RA, M10, L5 e SRI, não apresentaram correlações significativas com o CV. Isso sugere que a regularidade circadiana — mais do que a fragmentação do sono ou a intensidade da atividade isoladamente — seja mais determinante para a homeostase glicêmica. Essas variáveis fazem parte do conjunto de índices não paramétricos de actimetria, cujas vantagens metodológicas foram discutidas por GONÇALVES et al. (2015). Os autores argumentam que métodos não paramétricos capturam aspectos fundamentais do ritmo repouso-atividade — como estabilidade (IS), fragmentação (IV) e amplitude (RA, M10, L5) — com maior realismo e sensibilidade que modelos paramétricos baseados em ajustes

cosinóides tradicionais. Intuitivamente, o IS reflete a sincronização ao zeitgeber luz-escuro — isto é, a consistência temporal do ritmo circadiano — enquanto o IV reflete a fragmentação, recortes intradiários geradores de instabilidades comportamentais e fisiológicas. A consistência entre os achados e as propostas metodológicas de GONÇALVES et al. (2015) reforça a adequação das métricas empregadas nesta investigação. Além disso, o modelo dos dois processos do sono-vigília proposto por Borbély (1982) permanece como uma base teoricamente relevante. Nesse modelo, o Processo C (circadiano) — modulável pelo núcleo supraquiasmático e sincronizado com fatores ambientais — se manifesta por meio da IS e LRI, enquanto o Processo S (homeostático) reflete a fragmentação do ciclo (IV). A associação significativa com IS/LRI e a ausência de associação com IV e outras métricas amparam a hipótese de que a estabilidade do Processo C tem maior impacto no metabolismo glicêmico do que a fragmentação per se. Outro aspecto a considerar é o cronotipo individual, tema clássico introduzido por HORNE e ÖSTBERG (1977). Os autores demonstraram que indivíduos matutinos tendem a dormir e acordar mais cedo, enquanto os vespertinos apresentam horários mais tardios, independentemente da duração do sono ou de traços de personalidade. Essa preferência circadiana individual pode influenciar tanto o alinhamento com os zeitgebers quanto os padrões de atividade-luz, funcionando como um moderador relevante em estudos que investigam metabolismo e glicemia. Podemos inferir que o tamanho amostral pode ter comprometido a detecção de associações mais sutis em outras variáveis; e fatores como dieta, uso de medicamentos, cronotipo, exposição sazonal à luz e estresse não foram controlados, podendo influenciar os resultados. Contudo, os achados reforçam a plausibilidade de que intervenções orientadas à promoção da regularidade circadiana, como rotinas consistentes de sono-vigília e exposição luminosa (em especial matinal), podem representar estratégias eficazes para prevenção ou mitigação de distúrbios metabólicos. Nesse contexto, os índices não paramétricos mostram-se ferramentas valiosas tanto para monitoramento quanto para aplicação em intervenções cronobiológicas (GONÇALVES et al., 2015). Assim, os resultados revelam que a sincronização temporal com os zeitgebers ambientais — refletida na estabilidade do ritmo repouso-atividade e regularidade luminosa — exerce influência importante sobre o metabolismo glicêmico. Para avançar na compreensão dessa interface, foi crucial avaliar também aspectos clássicos do sono, como sua duração e qualidade subjetiva.

Avaliação da duração e a qualidade do sono

Parte do estudo consistiu em investigar a potencial influência da duração e da qualidade do sono sobre o metabolismo glicêmico. Para tal, as variáveis do sono derivadas da actimetria — notadamente o tempo total de sono, o tempo na cama e a eficiência do sono — foram consideradas como parâmetros primários de análise. As variáveis foram apresentadas por meio de suas medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio-padrão), proporcionando uma visão abrangente de seus padrões, correlacionadas às métricas de controle glicêmico — média da glicose, coeficiente de variação da glicose (CV) e o desvio da marcação do primeiro pico glicêmico. A análise foi conduzida por meio de correlação de Spearman, método não paramétrico que se mostrou apropriado diante da distribuição não normal de parte das variáveis avaliadas (CONOVER, 1999). De acordo com os resultados, não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre as métricas de sono e os parâmetros glicêmicos. Por exemplo, o tempo total de sono médio não apresentou associação robusta com a média glicêmica ($\rho = 0,333$; $p = 0,301$) nem com o coeficiente de variação ($\rho = 0,151$; $p = 0,651$). De forma semelhante, o tempo na cama e a eficiência do sono — tanto na média quanto na variabilidade — não demonstraram impacto relevante sobre a variabilidade glicêmica. Esses achados sugerem que, no presente conjunto amostral, a quantidade de sono e sua eficiência objetiva não se configuraram como moduladores

significativos do metabolismo da glicose. A análise das variáveis circadianas revelou que a amostra apresenta padrões de ritmo bem definidos e saudáveis, condizentes com a faixa etária de adultos jovens. A média de Estabilidade Intradiaária (IS) do grupo foi de 0,438, um valor que se alinha ao padrão de referência de 0,49 ($\pm 0,12$). Isso sugere que o ritmo de atividade e repouso dos participantes se manteve estável ao longo dos dias. De forma semelhante, a média de Variabilidade Interdiaária (IV) foi de 0,849, muito próxima do valor de referência de 0,86 ($\pm 0,24$), indicando um ritmo com baixa fragmentação. Esses resultados são positivos, pois a estabilidade e a pouca fragmentação são características de ritmos circadianos robustos, ao contrário do que se observa em populações mais velhas ou com certas patologias, onde o IS tende a ser menor e o IV, maior. Esse resultado contrasta parcialmente com a literatura, que tem descrito a duração insuficiente de sono ou seu excesso como fatores de risco para resistência insulínica e desregulação metabólica (LIAN et al., 2019). Estudos experimentais em laboratório demonstraram que noites curtas de sono reduzem a sensibilidade à insulina e aumentam a secreção de cortisol noturno (SPIEGEL; LEPROULT; VAN CAUTER, 1999). Além disso, metanálises recentes apontam que tanto a curta duração de sono ($<6h$) quanto o sono excessivamente prolongado ($>9h$) estão associados a maior risco de diabetes tipo 2 (ITANI et al., 2017; ANCOLI-ISRAEL, S, 2009). A ausência de significância estatística em várias medidas em nossa amostra pode estar relacionada ao número reduzido de participantes, às características clínicas específicas do grupo (jovens adultos) ou ainda à limitação inerente da actimetria em captar nuances da arquitetura do sono, como estágios NREM e REM (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO SONO, 2021). Outro ponto relevante diz respeito à eficiência do sono. Os dados descritivos do estudo revelaram que a média de Tempo Total de Sono (TST) da amostra foi de 371,15 minutos, o que equivale a aproximadamente 6,19 horas. Esse valor está abaixo do intervalo recomendado pela Academia Americana de Medicina do Sono para adultos, que é de 7 a 9 horas por noite (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO SONO, 2021). A média de Eficiência do Sono (EFF), por sua vez, foi de 0,823 (ou 82,3%). Embora não haja um valor de referência único para a EFF, o documento sugere que valores abaixo de 90% podem indicar um sono menos consolidado, já que em exemplos de crianças saudáveis a eficiência chega a 99%. Apesar da baixa correlação estatística entre as métricas de sono e os parâmetros glicêmicos, a análise descritiva dos dados aponta para um padrão de sono que merece atenção, com o TST médio do grupo abaixo da recomendação. Essa constatação por si só representa um achado interessante, pois sugere que o sono insuficiente pode ser uma característica do estilo de vida da amostra, o que pode influenciar a saúde metabólica a longo prazo. Embora considerada um índice objetivo da qualidade do sono, refletindo a proporção do tempo na cama efetivamente dormido, sua relação com desfechos metabólicos ainda é controversa. Alguns estudos relatam associação entre baixa eficiência e maior risco de síndrome metabólica (COPINSCHI, G. et al., 2014), enquanto outros não encontram correlações consistentes. No presente estudo, tanto a média quanto a variabilidade da eficiência não se relacionaram com a variabilidade glicêmica, o que reforça a ideia de que a qualidade percebida e a regularidade circadiana podem ser determinantes mais relevantes para o metabolismo do que a eficiência do sono isoladamente. É igualmente necessário considerar o papel dos cronotipos individuais. Indivíduos vespertinos, por exemplo, tendem a apresentar menor duração de sono em dias úteis devido a restrições sociais e maior risco de descompasso circadiano, condição associada a prejuízos no metabolismo glicêmico (HORNE; ÖSTBERG, 1977; ROENNEBERG; MERROW, 2016). A avaliação exclusiva de médias e desvios de duração do sono pode não captar adequadamente esses efeitos moduladores, apontando para a necessidade de análises específicas que possam indicar o cronotipo dos participantes através de questionários, sendo esse procedimento já realizado nesta pesquisa e os dados obtidos serão analisados em estudos futuros. Apesar da ausência de

correlações significativas em nosso conjunto de dados, os resultados não descartam a relevância clínica da duração e da qualidade do sono. Pelo contrário, sugerem que, nesse grupo específico, o componente circadiano da organização temporal do sono-vigília — conforme discutido no trecho anterior — parece ter maior peso sobre o metabolismo glicêmico do que os indicadores tradicionais de quantidade e eficiência do sono. Nesse sentido, a análise aqui apresentada abre caminho para a próxima etapa dos resultados, em que será considerada a influência de fatores biológicos intrínsecos, como o sexo, sobre a modulação dos ritmos circadianos e metabólicos. Essa abordagem permitirá verificar se diferenças sexuais contribuem para explicar a variabilidade observada e se modulam de forma distinta os efeitos da duração e qualidade do sono sobre a glicemia.

Diferenças sexuais na modulação dos ritmos biológicos

As análises comparativas entre os sexos revelaram padrões distintos em algumas métricas de interesse, embora a maior parte das variáveis não tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas. Entre os achados mais expressivos, destaca-se a diferença nos valores médios de glicose, em que se observou efeito robusto tanto pelo teste t de Student ($t = -3,44$; $p = 0,004$; $d = -1,74$) quanto pelo teste de Mann-Whitney ($U = 9,00$; $p = 0,015$), indicando que a glicemia média foi significativamente superior no grupo masculino. Esse resultado converge com evidências de que fatores sexuais modulam de maneira diferenciada a sensibilidade insulínica e o metabolismo energético, em especial sob influência de hormônios gonadais (SPIEGEL; LEPROULT; VAN CAUTER, 1999). No entanto, quando se analisam parâmetros derivados da variabilidade glicêmica, como o coeficiente de variação da glicose, não foram verificadas diferenças significativas entre os sexos ($p > 0,60$). Com isso, não podemos negar ou afirmar que os mecanismos compensatórios que estabilizam a flutuação glicêmica ao longo do tempo atuam de forma relativamente homogênea entre homens e mulheres. É plausível supor que a juventude dos participantes — em sua maioria jovens adultos no início da graduação — favoreça maior resiliência homeostática, suavizando a expressão de diferenças sexuais que são mais evidentes em populações mais velhas ou clinicamente vulneráveis (MALLAMPALLI; CARTER, 2014). Entre as métricas circadianas, variáveis como IS, IV, RA, SRI, M10 e L5 mantiveram-se estatisticamente equivalentes entre os grupos. Ainda assim, algumas aproximações merecem ser destacadas. O tempo na cama (média) apresentou diferença entre os sexos ($t = 1,45$; $p = 0,166$; $U = 23,00$; $p = 0,350$), com efeito de tamanho moderado ($d = 0,74$), sugerindo possível viés em direção a maior tempo de permanência no leito do grupo feminino. De modo semelhante, a eficiência do sono (desvio) exibiu efeito de tamanho relevante ($d = 0,62$), embora sem alcançar significância estatística ($p \approx 0,23$). Esses resultados próximos ao limiar reforçam a hipótese de que a amostra possui características similares de idade e rotina que pode ter limitado o poder estatístico da análise, dificultando a detecção de diferenças sutis. O conjunto de achados indica que a expressão de diferenças sexuais no contexto circadiano e glicêmico pode ser contingente a condições específicas, como idade, estado hormonal e presença de fatores de risco metabólicos. A ausência de distinções marcantes nas métricas de sono e de atividade-reposo, por exemplo, pode refletir tanto a homogeneidade comportamental do grupo quanto a plasticidade fisiológica de jovens adultos, cuja capacidade de recuperação diante de eventuais desajustes é elevada. Essa interpretação é coerente com estudos que apontam para maior eficiência compensatória do sistema circadiano em indivíduos jovens, em contraste com a maior vulnerabilidade observada em fases posteriores da vida (DUFFY; CAINE; CZEISLER, 2015), sendo reforçada pelo pensamento de que Ontogeneticamente falando, a cronobiologia também elucidou sobre como os mesmos ritmos mudam em cada indivíduo, ao longo da vida. Portanto, deve-se considerar que os indivíduos diferem temporalmente tanto inter individualmente quanto individualmente (ao longo do tempo) e, nesse sentido, é fácil

imaginar que não apenas a expressão fisiológica, mas também a patológica, reflete tais diferenças. (LEOCADIO-MIGUEL; MORENO, 2025, p. 189). Sob essa perspectiva, cabe ainda considerar a influência de fatores contextuais, como a rotina acadêmica e a relativa uniformidade nos horários de exposição à luz natural e artificial, que podem ter atuado como equalizadores ambientais. Tais condições tendem a reduzir a variabilidade entre os sexos, mascarando diferenças fisiológicas que poderiam emergir em populações com maior diversidade ocupacional, social ou clínica (ROENNEBERG; MERROW, 2016). Em síntese, embora apenas a glicemia média tenha apresentado diferença estatisticamente significativa entre os sexos, a análise detalhada evidencia tendências que, em amostras mais amplas ou em contextos fisiológicos distintos, poderiam revelar efeitos mais consistentes. O conjunto de resultados sugere que a influência do sexo sobre os ritmos circadianos e metabólicos é multifatorial, dependendo tanto de condicionantes biológicos — como a ação hormonal — quanto de variáveis contextuais e ambientais. Esses achados encerram a presente seção de resultados apontando para a necessidade de investigações futuras que integrem diferentes faixas etárias, condições clínicas e marcadores fisiológicos, permitindo elucidar com maior precisão a interface entre sexo biológico, estabilidade circadiana e metabolismo glicêmico.

Conclusão

Os resultados deste estudo destacam a importância fundamental da regularidade circadiana na regulação da glicose. A correlação negativa e significativa entre a Estabilidade Interdiária (IS) e a variabilidade glicêmica sugere que manter um ritmo de sono-vigília consistente é crucial para a homeostase metabólica. O papel da luz como sincronizador biológico foi reforçado pela forte associação entre o Índice de Regularidade de Exposição à Luz (LRI) e a menor flutuação da glicose. Curiosamente, métricas clássicas de sono, como duração e eficiência, não se correlacionaram significativamente com a glicemia, o que aponta que a regularidade circadiana pode ser um fator mais determinante para o controle metabólico do que a quantidade de sono isolada, ao menos na população estudada. Observamos que a glicemia média foi mais alta em homens, um achado que converge com a literatura sobre diferenças sexuais no metabolismo. No entanto, a ausência de distinções significativas nas métricas circadianas ou na variabilidade glicêmica entre os sexos pode ser atribuída à juventude e à rotina homogênea dos participantes. Essas características, embora limitem a generalização dos resultados, ressaltam a necessidade de estudos com amostras mais amplas e diversificadas. Futuras pesquisas poderiam se beneficiar da análise de dados de cronotipo para entender como a preferência circadiana individual modula essas relações. Além disso, a combinação de actimetria com polissonografia e a inclusão de biomarcadores hormonais e dados detalhados sobre a dieta podem aprofundar a compreensão da complexa interação entre o ciclo sono-vigília e o metabolismo. Em última análise, este estudo fornece subsídios importantes para estratégias de saúde que priorizam a estabilidade da rotina como forma de promover o bem-estar metabólico.

Referências

ANCOLI-ISRAEL, S. Sleep and its disorders in aging populations. *Sleep Medicine*, v. 10, n. Suppl. 1, p. S7–S11, set. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2009.07.004> . Acesso em: 31 ago. 2025.

ARAÚJO, John Fontenele; ANDRADE, Tiago Gomes de (org.). Medicina Circadiana: fundamentos e aplicações clínicas. Natal: EDUFRN, 2025. E-book (22,4 MB). DOI: <https://doi.org/10.21680/978-65-5569-566-3> . Disponível em: <http://repositorio.ufrn.br> . Acesso em: 29 ago. 2025.

ASHER, Gad; SASSONE-CORSI, Paolo. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*, [s. l.], v. 161, p. 84-89, 26 mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.015> . Acesso em: 31 ago. 2025.

BORBÉLY, Alexander; DAAN, Serge; WIRZ-JUSTICE, Anna; DEBOER, Tom. The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. *Journal of Sleep Research*, v. 25, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jsr.12371> . Acesso em: 31 ago. 2025.

BORBÉLY, A. The two-process model of sleep regulation: beginnings and outlook. *Journal of Sleep Research*, v. 31, n. 4, p. e13598, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jsr.13598> . Acesso em: 31 ago. 2025.

CARNEIRO, Breno Tercio Santos; MIGUEL, Mario André Leocadio; ARAÚJO, John Fontenele. Relógio alimentar: mecanismos da sincronização circadiana por alimento. *Revista da Biologia*, v. 19, n. 1, p. 7-18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7594/revbio.19.01.02> . Acesso em: 31 ago. 2025.

COPINSCHI, Georges; LEPROULT, Rachel; SPIEGEL, Karine. The important role of sleep in metabolism. *Frontiers of Hormone Research*, v. 42, p. 59-72, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1159/000358858> . Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/358858> . Acesso em: 31 ago. 2025.

DAVID, M. C. M. M. et al. Changes in the rest-activity rhythm in migraine patients are associated with anxiety symptoms. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 44, n. 6, p. 611-620, out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.47626/1516-4446-2021-2367> . Acesso em: 31 ago. 2025.

DUFFY, J. F.; CAINE, J. F.; CZEISLER, C. A. Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neuroscience Letters*, v. 318, n. 3, p. 117-120, fev. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02427-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02427-2) . Acesso em: 31 ago. 2025.

GONÇALVES, B. S. B. et al. A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. *Sleep Medicine Reviews*, v. 20, p. 84-91, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.06.002> . Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/cbe9f1a1-38b2-4016-9ec8-ecd4784b00b2> . Acesso em: 31 ago. 2025.

HAJALI, V. et al. Sex differences in sleep and sleep loss-induced cognitive deficits: the influence of gonadal hormones. *Hormones and Behavior*, v. 108, p. 50-61, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.12.013> . Acesso em: 31 ago. 2025.

HJORT, Anna; IGGMAN, David; ROSQVIST, Fredrik. Glycemic variability assessed using continuous glucose monitoring in individuals without diabetes and associations with cardiometabolic risk markers: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, [s.

l.], v. 43, n. 4, p. 915-925, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.02.014> . Acesso em: 31 ago. 2025.

HORNE, J. A.; ÖSTBERG, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology*, v. 4, p. 97–110, 1977. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1027738/> . Acesso em: 31 ago. 2025.

ITANI, O. et al. Short sleep duration and health outcomes: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Sleep Medicine*, v. 32, p. 246–256, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.08.006> . Acesso em: 31 ago. 2025.

LIAN, Y.; YUAN, Q.; WANG, G.; TANG, F. Association between sleep quality and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research*, v. 274, p. 66–74, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.01.096> . Acesso em: 31 ago. 2025.

LEOCADIO-MIGUEL, Mario André; MORENO, Claudia Roberto de Castro. Cronobiologia e câncer. In: ARAÚJO, John Fontenele; ANDRADE, Tiago Gomes de (org.). *Medicina Circadiana: fundamentos e aplicações clínicas*. Natal: EDUFRN, 2025. p. 189. E-book (22,4 MB). DOI: <https://doi.org/10.21680/978-65-5569-566-3> . Disponível em: <http://repositorio.ufrn.br> . Acesso em: 29 ago. 2025.

MALLAMPALLI, Monica; CARTER, Christine. Exploring sex and gender differences in sleep health: a Society for Women's Health Research report. *Journal of Women's Health*, v. 23, n. 3, p. 278-280, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1089/jwh.2014.4816> . Acesso em: 31 ago. 2025.

MANBER, R.; BOOTZIN, R. R. Sleep and the menstrual cycle. *Health Psychology*, v. 16, n. 3, p. 209–214, maio 1997. DOI: <https://doi.org/10.1037/0278-6133.16.3.209> . Acesso em: 31 ago. 2025.

RICH-EDWARDS, J. W. et al. Research design for studies on sex differences and sex-specific health: basic, clinical, and population science foundations. *Endocrine Reviews*, v. 39, n. 4, p. 424-439, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2017-00246> . Acesso em: 31 ago. 2025.

ROENNEBERG, Till; MERROW, Martha. The circadian clock and human health. *Current Biology*, v. 26, p. R432-R443, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.011> . Acesso em: 31 ago. 2025.

RODAKCI, M. et al. Classificação do diabetes. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.29327/557753.2022-1> . Acesso em: 31 ago. 2025.

SLETTE, T. L. et al. The importance of sleep regularity: a consensus statement of the National Sleep Foundation sleep timing and variability panel. *Sleep Health*, v. 9, n. 6, p. 801-820, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sleh.2023.07.016> . Acesso em: 31 ago. 2025.

SPIEGEL, K.; LEPROULT, R.; VAN CAUTER, E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *The Lancet*, v. 354, n. 9188, p. 1435–1439, 23 out. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01376-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01376-8) . Acesso em: 31 ago. 2025.

SUYOTO, Verdana ST. et al. The effect of meal glycemic index and meal frequency on glycemic control and variability in female nurses working night shifts: a two-arm randomized cross-over trial. *The Journal of Nutrition*, v. 154, n. 1, p. 69-78, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2023.11.025> . Acesso em: 31 ago. 2025.

Anexos

Figura 1 - Fluxograma detalhando as fases do estudo.

Figura 2 - Actímetro ActTrust 1®.

Figura 3 - Perfis diários de glicose de um participante ao longo de 14 dias, obtidos através do monitoramento contínuo de glicose (CGM).

Figura 4 -Gráfico representativo da análise actimétrica de quatro dias, detalhando os períodos de atividade, repouso (dormindo, descansando) e remoção do

Figura 5 - Correlação entre Estabilidade Interdiária (IS) e Coeficiente de Variação (CV) da glicose.

Figura 6 - Correlação entre Índice de Regularidade de Exposição à Luz (LRI) e Coeficiente de Variação (CV) da glicose.

Tabela 1 - Matriz de Correlações entre variáveis do ritmo de repouso-atividade e glicemia.

Tabela 2 - Matriz de Correlações entre variáveis do sono e glicemia.

Tabela 3 - Resultados do teste de Shapiro-Wilk para verificar o pressuposto de normalidade dos dados das variáveis estudadas.

Tabela 4 - Resultados do teste de Levene, utilizado para avaliar se as variâncias dos grupos (homens e mulheres) são homogêneas

Tabela 5 - Tabela consolidada com os resultados dos testes t de Student e U de Mann-Whitney para a comparação das variáveis entre os sexos masculino e feminino.

Tabela 6 - Tabela com os resultados do teste não paramétrico U de Mann-Whitney, destacando a diferença significativa na Média Glicose entre os grupos.

Tabela 7- Tabela para comparação de valores da amostra com parâmetros da literatura.

CÓDIGO: OU1546

AUTOR: LUAN FILIPE DA COSTA DE MORAIS

ORIENTADOR: ELIZA MARIA XAVIER FREIRE

TÍTULO: Taxonomia e distribuição geográfica das serpentes do grupo *Erythrolamprus poecilogyrus* (Wied) do nordeste setentrional brasileiro

Resumo

A família Dipsadidae é o grupo mais diverso entre as serpentes neotropicais, definida por caracteres morfológicos e moleculares, e inclui a subfamília Xenodontinae, cuja tribo Xenodontini abriga o gênero *Erythrolamprus*. Esta espécie apresenta ampla variação morfológica, comportamental e ecológica, com 23 espécies e 36 subespécies no Brasil, sendo *E. poecilogyrus* dividida em quatro subespécies. Este estudo analisou 30 espécimes do nordeste setentrional brasileiro, todos provenientes da Coleção Herpetológica da UFRN, revisados segundo diagnósticos clássicos, e coletou dados merísticos e morfométricos analisados via estatística descritiva, PCA e mapeamento geográfico. Todos os indivíduos foram identificados como *E. p. schotti*, apresentando baixa variação intraespecífica, com diferenças mais evidentes no número de escamas ventrais, subcaudais e dentes maxilares. A PCA explicou 89% da variação total e revelou tendência de divergência entre indivíduos da Caatinga e da Mata Atlântica, associada a porte corporal, proporção cauda/corpo e morfologia craniana, sem evidência de divergência taxonômica. A ausência de outras subespécies pode estar ligada à amostragem ou à distribuição restrita. A distribuição geográfica evidenciou presença dessa espécie em domínios morfoclimáticos constantemente degradados, destacando a importância da preservação dos Biomas brasileiros, além disso, recomenda-se ampliar a amostragem e integrar dados moleculares para validar a taxonomia dessas subespécies.

Palavras-chave:

Palavras-chave:

Herpetologia;Caatinga;Morfologia;Variação;Preservação

TITLE: Taxonomy and geographic distribution of the snake group *Erythrolamprus poecilogyrus* (Wied-Neuwied, 1824) from the northernmost Northeast of Brazil.

Abstract

The family Dipsadidae is the most diverse group among Neotropical snakes, defined by morphological and molecular characters, and includes the subfamily Xenodontinae, whose tribe Xenodontini houses the genus *Erythrolamprus*. This species shows wide morphological, behavioral, and ecological variation, with 23 species and 36 subspecies in Brazil, with *E. poecilogyrus* divided into four subspecies. This study analyzed 30 specimens from the northernmost Northeast of Brazil, all from the Herpetological Collection of UFRN, reviewed according to classical diagnoses, and collected meristic and morphometric data analyzed through descriptive statistics, PCA, and geographic mapping. All individuals were identified as *E. p. schotti*, showing low intraspecific variation, with the most evident differences in the number of ventral scales, subcaudals, and maxillary teeth. The PCA explained 89% of the

total variation and revealed a trend of divergence between individuals from the Caatinga and the Atlantic Forest, associated with body size, tail/body ratio, and cranial morphology, without evidence of taxonomic divergence. The absence of other subspecies may be linked to sampling or restricted distribution. The geographic distribution evidenced the presence of this species in morphoclimatic domains under constant degradation, highlighting the importance of preserving Brazilian biomes. Furthermore, it is recommended to expand sampling and integrate molecular data to validate the taxonomy of group.

Keywords: Herpetology;Caatinga;Morphology;Variation;Conservation.

Introdução

Os Dipsadidae compreendem uma grande diversidade de espécies de serpentes neotropicais, as quais estão distribuídas por todo continente Sul-americano, sendo assim, o grupo mais especioso dentre as espécies tropicais, compreendendo mais de 700 espécies (Cadle e Greene, 1993; Martínez, 2011; Guedes et al., 2023). Essa família é definida tanto por caracteres morfológicos, principalmente pela ornamentação do hemipênis (espinhos laterais mais alargados e duas regiões mais ornamentadas; Zaher, 1999), como por caracteres moleculares (Vidal et al., 2000; Zaher et al., 2009; Vidal et al., 2010; Pyron et al., 2011; Grazziotin et al., 2012; Pyron et al., 2013). Um dos clados pertencentes a essa família é a subfamília Xenodontinae, que se diferencia das demais subfamílias de Dipsadidae, principalmente pela morfologia hemipeniana, por este órgão possuir face sulcada com capítulo e face assulcada caliculada ou completamente nua (Zaher, 1999). A tribo Xenodontini é morfológicamente caracterizada por seus representantes possuírem hemipênis com a presença de disco apical nu em cada um dos lobos do órgão (Dixon, 1980; Jenner, 1981; Myers, 1986; Ferrarezzi, 1994; Zaher, 1999, Curcio, 2008). Essa tribo, atualmente, ampara os gêneros *Erythrolamprus* Boie, 1826, *Lygophis* Fitzinger, 1843 e *Xenodon* Boie, 1927 (Grazziotin et al., 2012; Guedes et al., 2023), sendo o primeiro, objeto deste estudo. O gênero *Erythrolamprus* destaca-se como um dos mais ricos dentre as serpentes neotropicais da família Dipsadidae, distribuído amplamente pelo território sul-americano (Ascencio et al., 2019). As serpentes deste gênero apresentam grande variação morfológica, quais sejam, aspecto das escamas dorsais, tamanho da cabeça, variação ontogenética na coloração, padrões de coloração em “coral”, além de variações comportamentais, como ofiofagia, arborealidade, terestrialidade e mimetismo de outras espécies de serpentes (Dixon, 1983; Curcio, 2009; Ascencio et al., 2019). No Brasil, o gênero *Erythrolamprus* está representado por 23 espécies e 36 subespécies, distribuídas geograficamente por todo o território nacional (Guedes et al., 2023). Dentre as espécies de *Erythrolamprus*, *E. poecilogyrus* contém quatro subespécies, quais sejam, *E. poecilogyrus caesius* (Cope, 1862), *E. poecilogyrus poecilogyrus* (Wied-Neuwied, 1825), *E. poecilogyrus schotti* (Schlegel, 1837), e *E. poecilogyrus sublineatus* (Cope, 1860), distribuídas por todo o território nacional e distintas por caracteres morfológicos, principalmente, de coloração (Dixon & Markezich, 1992; Guedes et al., 2023). Dixon & Markezic (1992) analisaram as diferenças entre as subespécies do grupo, bem como a variação geográfica das subespécies por todo o território nacional. Utilizaram dados morfológicos, principalmente, de coloração, hemipeniana e variação no tamanho do focinho em relação ao número de dentes ao longo da distribuição geográfica. Este fato poderia indicar variação morfológica dentro da espécie *E. poecilogyrus*, ou seja, variação clinal ou especiação do grupo. Além disso, constatarem-se sobreposições de outros caracteres, tais como, número de fileiras de escamas dorsais e suas reduções, e diferentes variações de coloração em uma mesma subespécie. Nesse contexto de incertezas taxonômicas, este estudo analisou a distribuição geográfica das subespécies de *E. poecilogyrus*, aliada a possíveis variações de características morfológicas associadas. Em

adição, foi avaliada a validade das subespécies ocorrentes no nordeste setentrional brasileiro. Portanto, justificou-se plenamente a análise das subespécies do grupo *E. poecilogyrus* integrando dados morfológicos e biogeográficos, com o intuito de analisar as relações entre a morfologia e a distribuição geográfica dessas espécies, a partir dos espécimes depositados em Coleções Científicas do nordeste setentrional brasileiro.

Metodologia

A Coleção Científica Herpetológica da UFRN (UFRN-CH) encontra-se alocada no Museu de Ciências Morfológicas, Centro de Biociências, Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), município de Natal. Atualmente, a UFRN-CH abriga mais de 7800 espécimes de anuros e répteis, disponíveis para análises de identificação e de dados geográficos, possibilitando subsidiar pesquisas por meios de visitas, permutas e empréstimos solicitados por instituições de ensino e pesquisa, nacionais e internacionais, aos curadores.

Procedimentos metodológicos Com o intuito de analisar as subespécie de *Erythrolamprus poecilogyrus* de diferentes domínios morfoclimáticos presentes no nordeste setentrional brasileiro, foram coletados todos os espécimes, totalizando trinta (30) indivíduos, identificados como *E. poecilogyrus*, da Coleção Herpetológica da UFRN (UFRN-CH). Cada espécime foi revisado com base nas diagnoses específica e subespecífica apresentada em Dixon & Markezich, 1992, sendo coletados os dados morfométricos e merístico de todos as serpentes analisadas. Para a obtenção dos dados merísticos, houveram contagem das escamas dorsais, ventrais, subcaudais, supralabiais e caudais, gerando, portanto, cinco(5), tabela 1, variáveis que se dispõem da seguinte maneira de acordo com (Prudente, 1998): DO: Escamas Dorsais; VE: Escamas ventrais; SC: Escamas subcaudais; SL: Escamas supralabiais; IL: Escamas infralabiais. As resultantes atrelados a essas variáveis, Média e Desvio Padrão, foram aferidas utilizando-se de ferramentas de cálculo (fórmulas) do Excel e, no intuito de facilitar a visualização dos dados para apuração, foram usadas as seguintes variáveis: DA: Escamas próximas a região da cabeça; DM: Escamas no meio corpo; DP: Escamas próximo a cloaca; VE: Escamas ventrais, SBC: Escamas subcaudais; SL: Escamas supralabiais; IL: Escamas infralabiais; MT: Dentes Maxilares. Logo após, foram aferidos os dados morfométricos utilizando-se de equipamentos de medição milimétrica, sendo eles um paquímetro para obtenção do comprimento e largura da cabeça e uma régua flexível para comprimento rostro-cloacal e caudal, como protocolado por (Prudente, 1998), gerando, portanto, quatro (4) variáveis tabeladas (Tabela 2) que se dispõem da seguinte maneira de acordo, também, com (Prudente, 1998): CRC: Comprimento rostro-cloacal; CaCD: Comprimento caudal; CoCa: Comprimento da cabeça; LCa: Largura da cabeça. Utilizando o R Studio, usando os dados merísticos e morfométricos coletados, uma análise de componentes principais foi efetuada (PCA) a fim de avaliar possíveis separações de grupos, visualizar diferenças geográficas e remover possíveis redundâncias no caso de variáveis correlacionadas, resultando em um gráfico de dispersão (Figura1). Finalmente, efetuou-se análise de distribuição e ocorrência nos estados de coleta dos espécimes das espécies de *Erythrolamprus poecilogyrus* tombadas na UFRN-CH gerando um mapa de distribuição e áreas dos domínios morfoclimáticos.

Resultados e Discussões

No intuito de avaliar variações geográficas e subespécies do grupo *Erythrolamprus poecilogyrus* no nordeste setentrional brasileiro, foram identificados todos os espécimes

analisados como pertencentes à subespécie *Erythrolamprus poecilogyrus scothii* com base na descrição diagnóstica feita por (Dixon & Markezich, 1992) das quatro subespécie reconhecidas atualmente em território nacional, quais sejam: *Erythrolamprus poecilogyrus caesius* (COPE 1862; *Erythrolamprus poecilogyrus poecilogyrus* (WIED-NEUWIED 1825); *Erythrolamprus poecilogyrus schotti* (SCHLEGEL 1837); *Erythrolamprus poecilogyrus sublineatus* (COPE 1860). Segue diagnoses para identificação dos espécimes: *Erythrolamprus p. poecilogyrus* “(125–375 mm CRC): Faixas corporais distintas, marrom-escuras ou pretas. Espaços interfaciais brancos, creme ou cinza-claro, às vezes com barras ventrolaterais escuras abreviadas. Escudos cefálicos cinza, bordas das placas cefálicas finas e difusas. Temporais variavelmente manchados de preto ou marrom. Colar nugal preto ou marrom sólido. Ventre creme ou branco, com manchas pretas ou marrons bem definidas. (200–550 mm CRC): Faixas corporais escuras distintas, com traços de amarelo, laranja ou vermelho; espaços interfaciais de cinza médio a escuro, com pontuações pretas ou marrons; escudos cefálicos cinza-escuros, bordas das placas cefálicas grossas e bem definidas; área medial interparietal vermelha ou laranja; colar nugal amarelo-alaranjado ou amarelo; ventre creme ou branco, com manchas escuras de bem definidas a pouco definidas. (375–650 mm CRC): Faixas corporais indistintas, com alto grau de amarelo, laranja ou vermelho; espaços interfaciais com muito preto ou marrom; ventre com manchas marrons ou pretas de bordas difusas ou totalmente ausentes; semelhante ao padrão II em todos os outros aspectos.[...]”

Erythrolamprus p. caesius “[...]Com preto anteriormente e com bordas pretas espessas posteriormente no ápice; a interrupção da borda das escamas ocorre na fileira de escamas 5, desde o quinto posterior do comprimento do corpo até a cloaca, criando uma faixa posterior mal definida; as escamas das fileiras 1, 2 e da metade inferior da 3 são creme e não circunscritas por preto, formando uma faixa ventrolateral clara e contínua. As ventrais são creme, com borda preta anterior fina, estendendo-se medialmente até um terço da largura ventral no lado esquerdo ou direito de cada escama, geralmente no lado oposto ao da borda anterior ou posterior da escama adjacente; a parte inferior da cauda é sem padrão. No entanto, existem variações no padrão descrito acima. Dois tipos de padrões de coloração foram reconhecidos nas amostras chaquenhais de *L. p. caesius* (Fig. 8D). Em um deles, as escamas dorsais do corpo são cinza ou cinza-azuladas, com forte concentração de preto no ápice anterior ou posterior, reduzida nas fileiras de escamas 5 ou 6 (ou ambas) anteriormente à cloaca; faixa ventrolateral creme ou amarela e sem padrão; cabeça cinza-clara a cinza-azulada, placas cefálicas e borda dorsal dos supralabiais com contorno preto; ventrais creme ou amarelas, sem marcas escuras. No outro, a superfície dorsal do corpo é cinza ou cinza-azulada, com padrão reticulado formado por áreas interconectadas de contorno preto das escamas (Fig. 8E); contorno ausente ou reduzido nas fileiras de escamas 4 e 5 ou 5 e 6 anteriormente à cloaca; faixa ventrolateral creme ou amarela, com pequeno grau de contorno escuro em várias escamas; cabeça como na outra amostra; ventrais creme ou amarelas, com grau moderado de pigmento escuro, geralmente restrito às superfícies laterais.[...]”

Erythrolamprus p. schotti Dois caracteres diagnósticos de coloração de *L. p. schotti* escudos cefálicos sem bordas e faixa posterior no corpo — não estão sujeitos a variação ontogenética. Vários outros estão, no entanto, e são melhor descritos em relação ao tamanho do espécime: A = < 210 mm (CRC): espaços interfasciais dorsais brancos, creme ou cinza-claro, com escamas ocasionalmente margeadas de branco; 27 a 54 manchas castanho-claras a cinza-escuras, com até quatro escamas de comprimento, distribuídas em três a oito fileiras longitudinais alternadas ou opostas, com borda de escama marrom-escura ou preta; fileiras transversamente contínuas na região do pescoço; ventrais creme ou amarelas, fortemente salpicadas de marrom ou preto; superfície caudal com salpicado no terço anterior do comprimento da cauda; superfícies cefálicas dorsais da mesma cor que os espaços

interfasciais dorsais; supralabiais posteriores e temporais secundários com manchas marrons ou pretas. B = 210–350 mm: dorso cinza com manchas escuras (Fig. 9C, 9D), apresentando grupos estreitos (menos de uma escama de comprimento) de marcações marrom-escuras ou pretas, ou sem padrão definido; lados laterais do dorso com cor de fundo mais clara que o dorso mediano; escamas dos espaços interfasciais, se o padrão persistir, com bordas brancas aleatórias; exemplares com padrão apresentam colar nugal; salpicado ventral e manchas supralabiais posteriores difusas e pouco definidas. C = 350–500 mm: dorso cinza com grupos estreitos de marcações escuras ou sem padrão reconhecível; lados laterais idênticos ou mais claros que o dorso mediano; escamas do dorso mediano com ou sem borda branca; colar nugal ausente ou pouco definido; manchas supralabiais posteriores ausentes; salpicado ventral esmaecido e pouco definido. D = >500 mm: dorso cinza e sem padrão; borda branca das escamas presente ou ausente; manchas labiais posteriores ausentes; salpicado ventral ausente ou esmaecido e difuso. *Erythrolamprus p. sublineatus* “O padrão básico de coloração de *L. p. sublineatus* é o seguinte: superfície cefálica dorsal anterior, envolvendo placas anteriores e incluindo frontal e supraoculares, cinza; frontais e superfícies posteriores das pré-frontais e internasais com borda marrom difusa; parietais marrons, cada uma com uma marca cinza, medialmente côncava e bem definida, estendendo-se por metade do comprimento da parietal na superfície anterolateral; marcações interparietais cinzas, lateralmente côncavas, na superfície anterior interparietal, contendo um ponto marrom no centro; pontas posteriores de cada parietal primária com cinza difuso; metade posterior de cada temporal primária e metade anterior de cada temporal secundária cinza, nitidamente contrastando com o restante do pigmento marrom temporal; superfície dorsolateral dos supralabiais marrom, aumentando em quantidade relativa nos supralabiais posteriores e separada de forma nítida da superfície ventrolateral cinza dos supralabiais; infralabiais, gulares e região do queixo amarelo-claro, sem marcas marrons. O padrão de coloração dorsal do corpo apresenta áreas sombreadas em marrom e áreas levemente sombreadas em cinza; a dois terços do comprimento corporal, o pigmento escuro na fileira de escamas 5 é reduzido, formando uma faixa que continua até um ponto a um comprimento de cabeça anterior à cloaca; posteriormente a esse ponto, e continuando até a cloaca, a metade inferior da fileira de escamas 6 é clara, produzindo uma faixa um pouco mais larga; ventrais e caudais amarelo-claros, fortemente salpicados de marrom-escuro, sendo que as caudais apresentam salpicado reduzido. [...]” Os padrões de coloração podem ser vistos em Figura 1. A análise descritiva dos caracteres merísticos (Tabela 2) indicou baixa variação intraespecífica para a maioria das variáveis, com valores constantes para o número de escamas próximas à cabeça (DA: 19 ± 0), no meio do corpo (DM: 19 ± 0), próximas à cloaca (DP: 15 ± 0) e escamas supralabiais (SL: 8 ± 0). As maiores variações ocorreram no número de escamas ventrais (VE: $152,8 \pm 5,97$), escamas subcaudais (SBC: $46,3 \pm 4,87$) e dentes maxilares (MT: $15,9 \pm 0,87$). Nos dados morfométricos (Tabela 1), observou-se ampla variação no comprimento rostro-cloacal (CRC: $262,1 \pm 106,83$ mm) e no comprimento caudal (CaCD: $51,53 \pm 22,54$ mm). As medidas da cabeça apresentaram menor variação relativa, com comprimento (CoCa: $15,40 \pm 4,36$ mm) e largura (LCa: $7,84 \pm 2,31$ mm). A Análise de Componentes Principais (PCA), realizada para atender ao Objetivo específico 2, revelou que os dois primeiros eixos explicaram conjuntamente 89,0% da variação morfológica total, sendo 68,4% atribuídos ao PC1 e 20,6% ao PC2. A PC1 teve maior peso para o comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento caudal (CaCD) e número de escamas ventrais (VE), associando-se principalmente ao tamanho corporal geral e à proporção cauda/corpo. Valores positivos indicaram indivíduos maiores e com caudas relativamente mais longas, enquanto valores negativos corresponderam a indivíduos menores com caudas mais curtas. Já a PC2 apresentou maior contribuição das variáveis número de escamas subcaudais (SBC), largura da cabeça (LCa) e dentes maxilares (MT), refletindo diferenças na

morfologia craniana e caudal e variações merísticas mais sutis. O gráfico de dispersão (Figura 2) mostrou tendência de separação morfológica entre indivíduos da Caatinga e do Domínio Atlântico, embora com sobreposição parcial. Indivíduos da Caatinga se concentraram em valores negativos de PC1 e positivos de PC2 (porte menor, caudas mais curtas, cabeças ligeiramente mais largas e maior número de dentes maxilares), enquanto os do Domínio Atlântico tendem a valores positivos de PC1 e negativos de PC2 (porte maior, caudas mais longas e cabeças mais estreitas). Estes resultados, associados ao padrão de coloração observado, demonstram que as variações detectadas representam diferenças populacionais possivelmente relacionadas a adaptações ambientais, sem evidências de divergência taxonômica, como também pelo grau ontogenético presente em *E. poecilogyrus*. Portanto, dada a identificação subespecífica de *Erythrolamprus poecilogyrus schotti* dos espécimes analisados, levando em consideração os resultados apresentados, pode-se haver um indicativo de que as variações morfológicas detectadas correspondem a diferenças populacionais e possivelmente adaptativas (Ridley, 2006), e não a divergências taxonômicas. Entretanto, o tamanho amostral reduzido ($N = 30$ indivíduos) deve ser considerado na interpretação, pois limita a robustez e a generalização dos padrões observados. O mapa de ocorrência desses espécimes (Figura 3) evidencia a distribuição geográfica do grupo nos Domínios Atlântico e da Caatinga, e áreas de transição dos dois domínios e o cerrado (Ab'Sáber, A. N. (2003); Almeida, R. F., & Amorim, A. M. A. (2014); Moro, M.F., Amorim, V.O et. al, 2024), corroborando com Dixon e Makezick, 1992 ao determinarem os padrões associativos de distribuição geográfica com morfológicos. Além disso, dado, possivelmente, a crescente perda de cobertura vegetal do nordeste setentrional brasileiro (Haddad et al., 2015; Tabarelli et al., 2006), a ocorrência da subespécie mais adaptada à Mata Atlântica segundo (Dixon e Makezick, 1992), *Erythrolamprus p. poecilogyrus*, também não foi encontrada dentre os espécimes analisados, sendo mais presente na região sudeste do país, São Paulo e Rio de Janeiro, onde a cobertura de Mata ainda é maior e mais amplamente preservada (Ribeiro, 2009). A falta de espécimes de *E. p. caesius* pode se dar pela não amostragem/coleta de indivíduos, do Cerrado, o que, juntamente com o baixo N amostral analisado, não possibilitou comparações mais robustas entre essas subespécies. Contudo, algumas sobreposições e divergências de coloração foram identificadas em alguns espécimes (Figura 4), não descrito em literatura, o que pode indicar novos padrões observados para essa subespécie, um indicativo clinal de uma mesma espécie ou cruzamentos entre duas populações subespecíficas diferentes como hipotetizado, também, por Dixon e Markevich, 1992. Devido a isso, resultantes de um trabalho de taxonomia integrativa, com um N amostral significativo, podem vir a ser importantes para a validade dessas subespécies, trazendo à luz possíveis divergências moleculares também significativas nas serpentes do grupo *Poecilogyrus*.

Conclusão

Todos os espécimes de *Erythrolamprus poecilogyrus* do nordeste setentrional brasileiro, coletados da UFRN-CH, foram identificados como *Erythrolamprus poecilogyrus schotti* (Schlegel, 1837); Foi observada baixa variação intraespecífica nos caracteres morfológicos e merísticos; Variações morfológicas indicam diferenças populacionais relacionadas a adaptações ambientais entre Caatinga e Mata Atlântica, sem evidência de divergência taxonômica; A análise de componentes principais (PCA) mostrou separação morfológica entre indivíduos dos dois domínios ecológicos, refletindo diferenças no tamanho corporal, cauda e morfologia craniana. Vale salientar as diferentes fases de crescimento dos espécimes e grau ontogenético presente na espécie; Padrões de coloração apresentaram variações que podem indicar variação clinal, hibridização entre populações subespecíficas ou variações

ontogenéticas; O mapa de ocorrência evidenciou a distribuição dos espécimes nos domínios da Caatinga, Mata Atlântica e áreas de transição, corroborando padrões de distribuição geográfica já descritos; Ausência de espécimes de outras subespécies (*E. p. poecilogyrus* e *E. p. caesius*) limita comparações e pode estar relacionada à amostragem e características ambientais locais e corrobora com a divisão por Domínio Morfoclimático descrito em literatura; A amostragem reduzida (N=30) restringe a robustez e generalização das conclusões; Recomenda-se estudos integrativos com amostragem ampliada e análises moleculares para melhor análise validativa das subespécies e compreender as variações intraespecíficas.

Referências

- Ascenso, A. C.; Costa, J. C. L.; Prudente, A. L. C.; Taxonomic revision of the *Erythrolamprus reginae* species group, with description of a new species from Guiana Shield (Serpentes: Xenodontinae) 2019. *Zootaxa* 4586 (1): 065–097. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4586.1.3>
- Ab'Sáber, A. N. (2003). Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas (p. 159). Ateliê Editorial.
- Almeida, R. F., & Amorim, A. M. A. (2014). *Stigmaphyllon caatingicola* (Malpighiaceae), a new species from Seasonally Dry Tropical Forests in Brazil. *Phytotaxa*, 174(2), 82–88. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.174.2.2>
- Cadle, John. (1993). Phylogenetic patterns, biogeography, and the ecological structure of Neotropical snake assemblages. *Dixon, J.R. (1980) The Neotropical snake genus Liophis, the generic concept. Contributions in Biology and Geology of the Milwaukee Public Museum*, 31, 1–40. Dixon, J.R. Taxonomic Status of the South American Snakes *Liophis miliaris*, *L. amazonicus*, *L. chrysostomus*, *L. mossoroensis* and *L. purpurans* (Colubridae:Serpentes) *Copeia*, Aug. 16, 1983, Vol. 1983, No. 3 (Aug. 16, 1983), pp. 791-802. Dixon, J. R., & Markezich, A. L. (1992). Taxonomy and geographic variation of *Liophis poecilogyrus* (Wied) from South America (Serpentes: Colubridae). *Amphibia-Reptilia*, 14(4), 273-294. Ferrarezzi, H. 1994. Uma sinopse dos gêneros e classificação das serpentes (Squamata) II. Família Colubridae. In: Nascimento, L. B.; Bernardes, A. T. e Cotta, G. A. (eds.). *Herpetologia no Brasil*. Belo Horizonte, PUC-MG; Fundação Biodiversitas e Fundação Ezequiel Dias. v. 1, p. 81-91.
- Guedes, T. B.; Entiauspe-Neto, O. M.; Costa, H. C. Lista de répteis do Brasil: atualização de 2022. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7829013>.
- Grazziotin, F. G., Zaher, H., Murphy, R. W., Scrocchi, G., Benavides, M. A., Zhang, Y.-P., & Bonatto, S. L. (2012). Molecular phylogeny of the New World Dipsadidae (Serpentes: Colubroidea): a reappraisal. *Cladistics*, 28(5), 437–459. doi:10.1111/j.1096-0031.2012.00393.x
- Haddad, Nick & Brudvig, Lars & Jean, Clobert & Davies, Kendi & Gonzalez, Andrew & Holt, Robert & Lovejoy, Thomas & Sexton, Joseph & Austin, Mike & Collins, Cathy & Cook, William & Damschen, Ellen & Ewers, Robert & Foster, Bryan & Jenkins, Clinton & King, Andrew & Laurance, William & Levey, Douglas & Margules, Chris & Townshend, J.. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth ecosystems. *Science Advanes*. 1. e1500052. Doi: 10.1126/sciadv.1500052.
- Jenner, J. V. 1981. A Zoogeographic Study and the Taxonomy of the Xenodontine Colubrid Snakes. Unpublished Phd. Dissertation. New York University, New York.
- Myers, C. W. 1986. An enigmatic new snake from the Peruvian Andes, with notes on the Xenodontini (Colubridae: Xenodontinae). *American Museum Novitates*, 2853: 1 – 12.
- Moro, M.F., Amorim, V.O., de Queiroz, L.P. et al. Biogeographical Districts of the Caatinga Dominion: A Proposal Based on Geomorphology and Endemism. *Bot. Rev.* 90, 376–429 (2024). <https://doi.org/10.1007/s12229-024-09304-5>
- Pyron, R. A., burbrink, F. T., Colli, G. R., Montes de oca, A. N., Vitt, L. J., Kuczynski, C. A. e Wiens, J. J. 2011. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and

comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(2): 329-342. Pyron, Robert & Burbrink, Frank & Wiens, John. (2013). Pyron RA, Burbrink FT, Wiens JJ.. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol Biol* 13: 93. *BMC evolutionary biology*. 13.93. 10.1186/1471-2148-13-93. Ridley M. *Evolução*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. Tradutores: Henrique Bunselmeyer Ferreira, Luciane Passaglia, Rivo Fischer. 752 p. RIBEIRO, M. C; METZGER, J. P; MARTENSEN, A. C, PONZONI, F. V; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation, *Biological Conservation*, Volume 142, Issue 6, 2009. Tabarelli, Marcelo & Aguiar, Antonio & Grillo, A & Santos, A. (2006). Fragmentação e Perda de Habitats na Mata Atlântica ao Norte do Rio São Francisco. Vidal, N., Kindl, S., Wong, A. e Hedges, B. 2000. Phylogenetic Relationships of Xenodontine Snakes Inferred from 12S and 16S Ribosomal RNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(3) 389–402. Vidal, N., Dewynter, M. e Gower, D. J. 2010. Dissecting the major American snake radiation: A molecular phylogeny of the Dipsadidae Bonaparte (Serpentes, Caenophidia). *Comptes Rendus Biologies*, 333: 48–55. Zaher, Hussam. Hemipenial morphology of the south american xenodontine snakes, with a proposal for a monophyletic xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, n. 240, p. 1-168, 1999 Tradução. Zaher, Hussam., Cadle, John., Grazziotin, F. G., Murphy, R. E., Moura-Leite, J. C., Bonatto, S. L. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulso de Zoologia* (49) 11. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492009001100001>.

Anexos

Tabela 1: DA: Escamas próximas a região da cabeça; DM: Escamas no meio corpo; DP: Escamas próximo a cloaca; VE: Escamas ventrais, SBC: Escamas subcaudais; SL: Escamas supralabiais; IL: Escamas infralabiais; MT: Dentes Maxilares.

Tabela 2: CRC: Comprimento rostro-cloacal; CaCD: Comprimento caudal; CoCa: Comprimento da cabeça; LCa: Largura da cabeça.

Figura 2

Figura 3. Mapa de Ocorrências

Figura 1: Prancha de fotos dos espécimes

Figura 4: Padrões diferentes de Coloração

CÓDIGO: OU1665

AUTOR: LIVIA DE SOUZA GOIS

ORIENTADOR: ELIZA MARIA XAVIER FREIRE

TÍTULO: Monitoramento de populações de espécies de lagartos em remanescentes florestais do Campus central da UFRN: avanços e perspectivas

Resumo

A fragmentação da mata atlântica brasileira vem se acentuando nos últimos 35 anos, resultando atualmente em remanescentes insulares em meio ao gradual processo de urbanização. Nesse cenário, é relevante avaliar o status de conservação das espécies, particularmente na região Nordeste, uma das mais afetadas e a fragmentação é um dos principais fatores responsáveis por extinções. Portanto, para conhecer e avaliar os impactos desses fenômenos, este estudo é parte de monitoramento das espécies de Répteis Squamata em remanescentes de mata atlântica do Campus central da UFRN, desde 2009. Até os anos 1960 estes se caracterizavam como área vegetada contígua e/ou contínua ao Parque Estadual das Dunas de Natal. Os remanescentes inventariados e monitorados foram a “Mata dos Saguís”, as áreas de mata do entorno da Reitoria e, anteriormente, “A mata da CAERN”. Em cada uma dessas áreas foram definidos três quadrantes de 250 m² cada, onde foram realizadas buscas ativas por répteis Squamata, cinco vezes por mês. Neste último ano, foram registrados 253 indivíduos de 16 espécies diferentes. Em áreas mais antropizadas as espécies mais frequentes foram *Tropidurus hispidus* (Spix, 1758) e *Hemidactylus mabouia* (Moreau de jonnès, 1818); esta última, espécie invasora. Destaca-se o registro frequente do lagarto *Coleodactylus natalensis* Freire, 1999, espécie endêmica do Rio Grande do Norte e ameaçada de extinção.

Palavras-chave: Mata Atlântica nordestina; Fragmentação; Répteis; Urbanização.

TITLE: Monitoring of Squamate Reptiles in Forest Remnants on the UFRN Central Campus: Advances and Perspectives

Abstract

The fragmentation of the Brazilian Atlantic Forest has intensified over the past 35 years, currently resulting in insular remnants amid the gradual process of urbanization. In this context, it is relevant to assess the conservation status of species, particularly in the Northeast region, one of the most affected, where fragmentation is one of the main factors responsible for extinctions. Therefore, in order to understand and evaluate the impacts of these phenomena, this study is part of a monitoring program of Squamate reptiles in Atlantic Forest remnants within the central campus of UFRN, ongoing since 2009. Until the 1960s, these areas were characterized as continuous forest cover and/or directly connected to the Parque

das Dunas de Natal. The remnants surveyed and monitored were the “Mata dos Saguís,” the forested areas surrounding the Rectorate building, and, previously, “Mata da CAERN.” In each of these areas, three quadrants of 250 m² each were defined, where active searches for Squamate reptiles were carried out five times per month. In the past year, 253 individuals from 16 different species were recorded. In more anthropized areas, the most frequent species were *Tropidurus hispidus* (Spix, 1758) and *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnés, 1818), the latter being an invasive species. A noteworthy finding is the frequent record of the lizard *Coleodactylus natalensis* Freire, 1999, an endemic species from Rio Grande do Norte and threatened with extinction.

Keywords: Northeastern Atlantic Forest; Fragmentation; Reptiles; Urbanization.

Introdução

A mata atlântica brasileira perdeu cerca de 93% da sua cobertura vegetal original (Freire et al., 2018) e, em especial, a porção nordestina do bioma possui historicamente uma elevada taxa de desflorestamento devido a pecuária e monocultura de açúcar (Abrahão et al., 2019). Nesse contexto, a região Nordeste possui áreas reduzidas a menos de 2% de sua cobertura original e acentuadamente fragmentadas (Silva & Tabarelli, 2001; Freire et al. 2018; Abrahão et al., 2019). No Brasil, aproximadamente 85% da população se concentra em áreas urbanas (Giacon et al., 2022) e esse processo de urbanização está relacionado diretamente à diminuição das florestas, que possui como consequência uma inevitável perda de habitat (Wilcox & Murphy, 1985).

A fragmentação ocorre quando uma área contínua de habitat é subdividida em porções que não mais se conectam, e possuem tamanho menor que a porção original (Fahrig, 2003; Tabarelli et al., 2005). Além da diminuição da área total, a fragmentação resulta na diminuição do tamanho dos fragmentos e em seu isolamento (Fahrig, 2003; Tabarelli et al., 2005), embora grande parte dos fragmentos de mata sejam considerados pequenos, com menos de 50 hectares, eles são importantes para gerar conectividade entre áreas florestadas maiores (Ribeiro et al., 2009).

Nesse contexto, para conhecer e avaliar os impactos desses fenômenos, especialmente da fragmentação, é relevante conhecer e avaliar a composição de espécies dessas áreas insulares. Portanto, este estudo é parte de monitoramento das espécies de Répteis Squamata, desde 2009, em remanescentes de mata atlântica do Campus central da UFRN.

Na década de 1970, foi construído o campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em uma área anteriormente contígua e contínua ao Parque Estadual das Dunas de Natal (PEDN); a sua construção promoveu a supressão parcial da vegetação nativa em razão da construção do anel viário da Universidade (Sales et al., 2009). Esse processo de urbanização resultou na fragmentação da vegetação outrora outrora conectada PEDN, além de considerável perda de habitat e isolamento dos fragmentos em relação ao Parque. Uma floresta continua quando isolada, eventualmente perde sua diversidade (MacArthur and Wilson, 1963), e com a diminuição da área também há diminuição de recursos disponíveis, o que pode resultar na extinção de espécies (Abrahão et al., 2019).

Para conhecer e compreender como a fragmentação afeta a diversidade das espécies, este estudo, que é parte de monitoramento dos Répteis Squamata dessa área desde 2009, buscou inventariar e monitorar os répteis squamata de alguns dos remanescentes

de mata do campus da UFRN. Ou seja, buscar entender como a fauna se comportou no decorrer dos anos, com todas as mudanças no ambiente, bem como buscou-se constatar se as espécies inventariadas nos estudos anteriores ainda são registrados para a região. O primeiro inventário de répteis squamata do campus da UFRN foi realizado por Sales et al no ano de 2009 por um curto período de tempo. Subsequentemente, um projeto mais longo foi realizado por Cavalcanti (dados não publicados) entre 2019 e 2021.

Metodologia

Este estudo foi realizado em fragmentos de mata atlântica remanescentes no campus da UFRN, são esses, a área conhecida como Mata dos Saguís, um pequeno fragmento de mata próximo ao Centro de Biociências e em áreas de mata no entorno da Reitoria. A “Mata dos Saguís” mesmo que pequena com uma área de aproximadamente 1.4 hectares (Google Earth, 2025), ainda possui uma fitofisionomia de mata atlântica (Dávila et al., 2021), mas está totalmente cercada pela antropização. As áreas da Reitoria apresentam níveis de antropização diferentes, variando de locais com muito entulho de construção a extensões com gramíneas e poucos abrigos artificiais.

Procedimentos metodológicos:

Para o encontro e a coleta dos animais foram realizadas duas metodologias, Busca ativa limitada por tempo e Armadilhas de interceptação e queda (pitfalls). As campanhas foram feitas durante seis meses, sendo três em período de seca e três em período de chuvas.

Cada área de estudo foi dividida em três áreas menores, como mostrados nas imagens 1, 2 e 3 para Reitoria e 4, 5 e 6 para a Mata dos Saguís em quadrados de 200 metros de área, como apresentado nas figuras 7 e 8.

Foram realizadas cinco excursões em cada mês, nos períodos da manhã ou tarde. Em cada excursão um pesquisador e no mínimo um outro membro da equipe realizaram buscas em dois quadrados em cada área.

Para a metodologia de interceptação e queda, foram instaladas duas estações, uma na mata dos saguís e uma em área adjacente a Reitoria. As armadilhas consistem em quatro baldes de 20 litros enterrados ao nível do solo, com três metros de distância entre os baldes, formando um Y. Conectando os baldes foram erguidas lonas-guia de 60 cm de altura amparadas por estacas com o intuito de guiar os animais até os buracos. Os baldes permaneceram fechados exceto por uma semana do mês, em que foram abertos e verificados todos os dias da semana para coletar possíveis espécimes que viessem a cair nas armadilhas.

Os espécimes coletados durante as buscas foram mortos por resfriamento (Shine et al. 2015; Lillywhite et al., 2017), fixados em formol a 10% e conservados em álcool a 70%. Após esse processo, foram tombados e depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN-CH) como parte do material testemunho da pesquisa.

Resultados e Discussões

Durante 30 dias de amostragem totalizando 120 horas homem foram registrados 253 indivíduos, correspondendo a 16 espécies, sendo esses 10 lagartos, três anfisbenas e três serpentes. Das 39 espécies de squamata encontradas no parque das dunas, 16 foram encontradas nos remanescentes monitorados neste estudo o que corresponde a 41% das espécies encontradas na mata original, se somarmos os dados dos estudos de Sales 2009 e Cavalcanti 2022 que também monitoraram os fragmentos do campus esse número sobe para 21 espécies, correspondendo a 53% das espécies encontradas no parque das dunas que também são encontradas no campus.

Em estudo de monitoramento feito por Nascimento em 2024, no Centro de Experimentos e Pesquisas da Mata Atlântica (CEPEMA) outro remanescente de mata atlântica no estado do RN, foram registradas 17 espécies de répteis, das quais 7 também foram encontradas neste estudo nos remanescentes da UFRN, ademais todas as 17 espécies também são encontradas no Parque Estadual das Dunas do Natal (PEDN).

Essas informações estão demonstradas no quadro 1.

QUADRO 1 – Composição de espécies de Répteis de inventários feitos no campos UFRN no ano de 2009 (SALES et. al, 2009) (UFRN 2009), ano de 2022 por Cavalcanti (dados não publicados), este estudo em 2025, no Parque Estadual das Dunas do Natal (PEDN) e no Centro de Experimentos e Pesquisas da Mata Atlântica (CEPEMA) em 2024.

Quanto às análises estatísticas, o índice de diversidade de Shannon (H') foi de 1.3138 para a Mata dos Saguís e 1.8993 para a Reitoria, indicando maior diversidade na área da Reitoria. Já o índice de diversidade de Simpson (D) foi de 0.5563 para a Mata dos Saguís e de 0.7824 para a Reitoria indicando uma maior diversidade na área da Mata dos Saguís. Dados de riqueza e diversidade não foram comparadas com os estudos anteriores de Sales e Cavalcanti em razão de divergências relacionadas com a quantidade de horas amostradas em cada área, além da ausência da Mata da CAERN no estudo. A mata está situada na área do campus, mas pertence a Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte e foi inventariada durante os trabalhos anteriores, no entanto, devido a em razão de novas normas de acesso não foi incluída no presente trabalho.

A espécie mais abundante somando todas as áreas foi *Tropidurus hispidus* (Spix, 1758), representando 49% do N amostral total. Um estudo feito por Andrade em 2019 trouxe resultados onde a urbanização tem um efeito positivo na densidade populacional desse lagarto, na hipótese do estudo a razão seria a diminuição da competição com outros lagartos mais prevalentes em áreas menos urbanizadas como os *Teiídeos* (Andrade 2020). Em contraponto, o campus também abriga uma espécie menos abundante, o lagarto *Coleodactylus natalensis* (Freire 1999), o mesmo, além de endêmico dos remanescentes da Mata Atlântica potiguar (Freire 1999), está atualmente classificado como ameaçada de extinção (EN) na Lista de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2021) e no Livro Vermelho da

Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2018). O que indica a importância da conservação das áreas onde ele habita. (Sousa et. al 2024).

A segunda espécie mais abundante foi o lagarto *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnés, 1818) que é uma espécie exótica e que comumente compete e ocupa espaços de espécies nativas (Freire, 1996; Agarwal et al. 2021) e foi encontrado mais abundantemente na área da Reitoria onde há grande quantidade de abrigos artificiais.

Entre as demais espécies encontradas três pertencem ao gênero *Amphisbaena*. *Amphisbaena heathi* Schmidt, 1936, Espécie endêmica do estado do Rio Grande do Norte, (Lisboa et al, 2016). *Amphisbaena vermicularis* Wagler, 1824, que tem ocorrência da Bolívia ao Brasil (Almeida et al 2008) e *Amphisbaena alba* Linnaeus, 1758. Todas são animais de hábito fossorial (Navega-Gonçalves and Benites 2019) e foram encontradas usando ancinhos para revirar o solo. Para *Amphisbaena heathi* Schmidt, 1936 houveram encontros em ambas as áreas. *Amphisbaena vermicularis* Wagler, 1824 foi entrada apenas na área da Mata dos Saguís e *Amphisbaena alba* Linnaeus, 1758 apenas na Reitoria.

Da família Teiidae foram encontradas duas espécies, *Salvator merianae* Duméril & Bibron, 1839, apenas na Mata dos Saguís e *Ameivula ocellifera* (SPIX, 1825) encontrada nas duas áreas amostradas. Ambas espécies são de área aberta e ampla distribuição geográfica (Freire 1996).

A terceira espécie mais abundante encontrada neste estudo foi *Micrablepharus maximiliani* (Reinhardt & Lütken, 1862) um lagarto de pequeno porte que foi encontrado de forma distribuída em ambas as áreas inventariadas.

Já *Iguana iguana* (Linnaeus, 1758), animal símbolo da Universidade foi encontrado apenas duas vezes durante esse estudo, mesmo estando presente em outras partes do campus.

Encontrado exclusivamente nas excursões em época de chuva, *Diploglossus lessonae* Peracca, 1890 é um lagarto de hábito semi fossorial e diurno encontrado no Nordeste brasileiro (Vitt 1995; Passos et al., 2011). Essa espécie foi encontrada apenas na Reitoria.

Brasiliscincus heathi (Schmidt & Igen, 1951) é um lagarto terrícolas de corpo cilíndrico e membros curtos (Vanzolini et al, 1980) e foi encontrada exclusivamente na área da Reitoria.

Gymnodactylus geckoides Spix, 1825 lagarto da família Gekkonidae, é pequeno assim como outros da família (Vanzolini et al, 1980) e endêmico da caatinga nordestina, possui distribuição da Bahia até o Rio Grande do Norte (Freire, 1998). Essa espécie foi encontrada em ambas as áreas amostradas.

Quanto às serpentes, *Apostolepis cearenses* Gomes, 1915 foi encontrada apenas um espécime, que estava fora das áreas de pesquisa, mas pela proximidade foi incluída nesse estudo. *Epictia borapeliotes* (Vanzolini, 1996), serpente de porte pequeno e esguio (Vanzolini, 1996) foi encontrada em ambas as áreas de estudo três espécimes na Mata dos Saguís e Dois na Reitoria. E *Tantilla melanocephala* (Linnaeus, 1758) serpente da família Colubridae foram encontrados 4 espécimes, todos na Reitoria e todos na época de chuvas.

Conclusão

Os remanescentes florestais do Campus da UFRN ainda detém certa diversidade de répteis squamata, apesar da sua crescente urbanização. Para algumas espécies generalistas e urbanófilas, como *Tropidurus hispidus* (Spix, 1758), o ambiente pode ser inclusive propício para o adensamento da sua população. O maior destaque é a ocorrência de *Coleodactylus natalensis* Freire, 1999, espécie endêmica do RN e

ameaçada de extinção, fato que torna relevante a preservação desses remanescentes florestais do Campus da UFRN, mesmo com tamanho reduzido.

Referências

- ABRAHÃO, C. R.; MOURA, G. J. B.; FREITAS, M. A.; ESCARLATE-TAVARES, F. Plano de ação nacional para a conservação da herpetofauna ameaçada da Mata Atlântica Nordeste. *Série Espécies Ameaçadas*, n. 41. Brasília: ICMBio, Ministério do Meio Ambiente, 2019. 252 p.
- AGARWAL, I.; CERÍACO, L. M. P.; METALLINOU, M.; JACKMAN, T. R.; BAUER, A. M. How the African house gecko (*Hemidactylus mabouia*) conquered the world. *Royal Society Open Science*, v. 8, art. 210749, ago. 2021. DOI: 10.1098/rsos.210749
- ANDRADE, A. C. Metropolitan lizards? Urbanization gradient and the density of lagartixas (*Tropidurus hispidus*) in a tropical city. *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 12, p. [especificar páginas], jul. 2020. DOI: 10.1002/ece3.5518.
- DAVILA, N.; MOURA, E. O.; VERSIEUX, L. M.; CARVALHO, F. A.; CALVENTE, A. M. Urban Forest Fragments as a Living Laboratory for Teaching Botany: An Example from Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil. *SYSTEMATIC BOTANY*, v. 46, p. 6-17, 2021.
- DIAS, T. R. L. S. C.; FRANÇA, B. R. A.; COSTA, D. S. D.; MEDEIROS, M. S. P. D. S.; BERTANI, R.; BECKER, S. M.; SALES, R. F. D.; FREIRE, E. M. X.; SILVA, M. D. Fauna do Parque das Dunas: guia fotográfico. Organização de: Talytha Rocha de Lima Soares Corrêa Dias. Natal: IDEMA, 2021.
- 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, E. M. X.; MESQUITA, D.; CMCA, Lisboa; SALES, R. F. D.; TORQUATO, S.; SANTANA, D. Plano de ação nacional para a conservação da herpetofauna ameaçada da Mata Atlântica Nordeste. In: ABRAHÃO, C. R.; MOURA, G. J. B.; FREITAS, M. A.; ESCARLATE-TAVARES, F. (Orgs.). *Série Espécies Ameaçadas*, n. 41. Brasília: ICMBio, Ministério do Meio Ambiente, 2019 (publicado em 2018)
- FREIRE, E. M. X. 1999. 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*). *Papéis Avulsos de Zoologia*, Curitiba, 40 (20): 311-322
- 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.. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 13, p. 903-921.
- GIACON, V.; VALENTE, R. A.; CARDOSO-LEITE, E. Relação entre urbanização e integridade biótica de remanescentes de Florestas Urbanas. *ResearchGate*, dez. 2022.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List of Threatened Species.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 492 p.

- LILLYWHITE, H. B.; SHINE, R.; JACOBSON, E.; DENARDO, D. F.; GORDON, M. S.; NAVAS, C. A.; WANG, T.; SEYMOUR, R. S.; STOREY, K. B.; HEATWOLE, H.; HEARD, D.; BRATTSTROM, B.; BURGHARDT, G. M. Anestesia e eutanásia de anfíbios e répteis usados em pesquisa científica: a hipotermia e o congelamento devem ser proibidos? *BioScience*, v. 67, n. 1, p. 53–61, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biosci/biw143>
- MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. An Equilibrium Theory of Insular Zoogeography. *Evolution (International Journal of Organic Evolution)*, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 373–387, dez. 1963. Publicado pela Society for the Study of Evolution.
- NAVEGA-GONÇALVES, M. E. C; BENITES, J. P. A.. Amphisbaenia: adaptações para o modo de vida fossorial. *Revista Brasileira de Zoociências (Online)*, v. 20, n. 2, p. 1–30, dez. 2019. DOI: 10.34019/2596-3325.2019.v20.26103. Acesso em: 14 ago. 2025
- PASSOS, D. C.; ZANCHI, D.; BORGES-NOJOSA, D. M. *Diploglossus lessonae* (Brazilian Galliwasp) Diet. *Herpetological Review*, v. 42, n. 1, p. 94, jan. 2011.
- RIBEIRO, M. C; METZGER, J. P; MARTENSEN, A. C, PONZONI, F. V; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation, *Biological Conservation*, Volume 142, Issue 6, 2009
- SALES, R. F. D. LISBOA, C. M. C. A. & FREIRE, M. E. X. Répteis squamata de remanescentes florestais do Campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil. *Cadernos de Herpetologia* 23: 77-88. 2009.
- SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. The future of Atlantic forest in northeastern Brazil. *Conservation Biology*, v. 15, p. 819-820, 2001.
- SHINE, R. et al. Is “cooling then freezing” a humane way to kill amphibians and reptiles? *Biology Open*, 2015, v. 4, n. 7, p. 760-763. .
- SOUSA, I. J. B.; ALVES, J. B. P.; MENDES, M. M. DE S. Impactos da atividade humana sobre a fauna ameaçada em unidades de conservação do Piauí. *Journal of Education Science and Health*, v. 4, n. 4, p. 1–10, dez. 2024. DOI: 10.52832/jesh.v4i4.482. Disponível em: link. Acesso em: 13 ago. 2025.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C. D.; BEDE, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 132–138, jul. 2005.
- VANZOLINI, P. E.; RAMOS-COSTA, A. M. M.; VITT, L. J. Répteis das caatingas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1980
- VITT, L.J. The ecology of tropical lizards in the caatinga of northeast Brazil. *Occasional Papers of the Oklahoma Museum of Natural History* (1): 1–29. 1995
- WILCOX, B. A.; MURPHY, D. D. Conservation Strategy: The Effects of Fragmentation on Extinction. *The American Naturalist*, v. 125, n. 6, p. 879–887, jun. 1985.

Anexos

Figura 1: Área 1 da Reitoria da UFRN. Fonte: Autoria própria.

Figura 2: Área 2 da Reitoria da UFRN. Fonte: Autoria própria.

Figura 3: Área 3 da Reitoria da UFRN. Fonte: Autoria própria.

Figura 4: Área 1 da Mata dos Saguís Fonte: Autoria própria.

Figura 5: Área 2 da Mata dos Saguís. Fonte: Autoria própria

Figura 6: Área 3 da Mata dos Saguís. Fonte: Autoria própria.

Figura 7: Recorte da vista aérea do campus da UFRN com destaque para as áreas estudadas.
Fonte: GAIA GPS.

Figura 8: Recorte da vista aérea do campus da UFRN com destaque para as áreas estudadas.
Fonte: GAIA GPS.

Quadro 1 lista de Squamata de inventários feitos no campus no ano de 2009 por Sales et al, no ano de 2022 por Cavalcanti, neste estudo em 2025, no PEDN, e no CEPEMA em 2024

Quadro 1 lista de Squamata de inventários feitos no campus no ano de 2009 por Sales et al, no ano de 2022 por Cavalcanti, neste estudo em 2025, no PEDN, e no CEPEMA em 2024

CÓDIGO: SB0002

AUTOR: RICARDO GABRIEL DE LIMA BISNETO

COAUTOR: ROMÉRIO DE OLIVEIRA LIMA FILHO

COAUTOR: BEATRIZ SILVA DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: ANA CAROLINA LUCHIARI

TÍTULO: DIFERENÇAS SEXUAIS NA RESPOSTA AO BINGE DRINKING EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

Resumo

O consumo de álcool é um comportamento amplamente difundido e historicamente presente nas sociedades humanas, especialmente em padrões abusivos como o binge drinking, com diversas consequências fisiológicas e neurológicas negativas. As diferenças sexuais nas respostas ao álcool, embora reconhecidas, ainda são pouco exploradas. O zebrafish destaca-se como modelo experimental para o estudo dessas diferenças, apresentando alta homologia genética com humanos e dimorfismo sexual evidente, sendo amplamente utilizada nas pesquisas neurocomportamentais e toxicológicas. Neste estudo, avaliamos as respostas comportamentais e genéticas de machos e fêmeas de zebrafish após a exposição a uma concentração elevada de álcool. Os indivíduos foram divididos em fêmeas controle ($n = 27$), fêmeas álcool 1,5% ($n = 24$), machos controle ($n = 27$) e machos álcool 1,5% ($n = 27$). A exposição ao álcool ocorreu por 20 min, uma vez por semana, durante quatro semanas. Os animais foram avaliados sem a presença de álcool no organismo. Os machos apresentaram aumento do comportamento do tipo ansioso e diminuição da sociabilidade e ambos os sexos aumentaram a reatividade ao espelho no teste de agressividade, após a exposição alcoólica. O álcool alterou a expressão gênica com machos mostrando maior suscetibilidade às alterações. Esses achados destacam respostas significativas dependentes do sexo ao binge drinking em zebrafish, enfatizando a importância de considerar o fator sexo na pesquisa sobre álcool.

Palavras-chave: Álcool; Comportamento; Expressão Gênica.

TITLE: Sex differences in response to binge drinking in Zebrafish (Danio rerio)

Abstract

Alcohol consumption is a widespread and historically present behavior in human societies, especially in abusive patterns such as binge drinking, with various negative physiological and neurological consequences. Sex differences in responses to alcohol, although recognized, are still little explored. The zebrafish stands out as an experimental model for the study of these differences, presenting high genetic homology with humans and evident sexual dimorphism, being widely used in neurobehavioral and toxicological research. In this study, we evaluated the behavioral and genetic responses of male and female zebrafish after exposure to a high concentration of alcohol. The individuals were divided into control females ($n = 27$), 1.5% alcohol females ($n = 24$), control males ($n = 27$) and 1.5% alcohol males ($n = 27$). Exposure to alcohol took place for 20 minutes, once a week, for four weeks. The animals were assessed

without the presence of alcohol in the body. Males showed an increase in anxious behavior and a decrease in sociability, and both sexes showed an increase in mirror reactivity in the aggression test after alcohol exposure. Alcohol altered gene expression, with males showing greater susceptibility to alterations. These findings highlight significant sex-dependent responses to binge drinking in zebrafish, emphasizing the importance of considering the sex factor in alcohol research.

Keywords: Alcohol; Behavior; Gene Expression.

Introdução

O "binge drinking", ou "bebedeira", é um padrão de consumo esporádico de grandes quantidades de álcool, resultando em sérias consequências de curto e longo prazo, como ressacas, intoxicação, doenças hepáticas, dependência e distúrbios mentais (APA, 2022). Embora estudos indiquem uma maior prevalência entre homens, há lacunas no conhecimento sobre as diferenças sexuais no "binge drinking" e seus efeitos comportamentais (APA, 2022). As diferenças sexuais nos efeitos do consumo de álcool podem ser atribuídas a fatores biológicos e psicossociais. A composição corporal, incluindo a distribuição de gordura, massa muscular, densidade óssea e percentual de água, varia entre homens e mulheres, influenciando o metabolismo do álcool. Além disso, o metabolismo basal, os níveis de hormônios sexuais (estrogênio e testosterona) e as respostas neurobiológicas ao álcool também afetam o risco e os efeitos do consumo (Erol e Karpyak, 2015; Peltier et al., 2019; Maddern et al., 2024). Fatores sociais e culturais desempenham um papel relevante, moldando os padrões de consumo e os riscos associados. Historicamente, mulheres enfrentaram maior repressão social ao consumo alcoólico, o que indiretamente reduzia o consumo; contudo, a busca pela igualdade de gênero e a ocupação de espaços antes masculinos têm diminuído essa diferença (Erol e Karpyak, 2015; Keyes et al., 2019; White, 2020). A complexidade das diferenças intersexuais dificulta a compreensão das consequências diretas do consumo alcoólico. A utilização de modelos animais, como o zebrafish (*Danio rerio*), pode favorecer o entendimento das diferenças biológicas ao permitir a manipulação de variáveis e o foco em questões biológicas. O zebrafish é um modelo promissor para estudos de diferenças sexuais e efeitos do álcool devido à alta similaridade genética com humanos, dimorfismo sexual evidente na fase adulta, fácil manejo e baixo custo de manutenção (Bugel et al., 2014; Choi et al., 2021; Liu et al., 2024). A falta de padronização em ferramentas e tarefas experimentais para avaliar os efeitos biológicos e comportamentais do álcool dificulta a comparação de resultados e a identificação de fatores de risco (Harmon et al., 2020). Estudos detalhando como fatores sexuais interagem com o consumo agudo, elevado e repetido de álcool são cruciais para entender as diferenças nos efeitos do álcool nas respostas comportamentais. O zebrafish permite um maior número amostral e pode ser avaliado em diversos testes comportamentais. Assim, este estudo utilizou o zebrafish para investigar os efeitos comportamentais e genéticos do "binge drinking", visando caracterizar as diferenças sexuais na resposta ao álcool. O avanço nessa pesquisa pode levar a intervenções mais eficazes e personalizadas para a redução do consumo e dos danos do uso abusivo de álcool.

Metodologia

Este projeto foi enviado ao Comitê de Ética ao Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte sob o protocolo N° 036/2024 e aprovado pelo certificado N°

402.036/2024. Indivíduos da espécie *Danio rerio* (Zebrafish) adultos, da linhagem WT, foram obtidos de uma fazenda especializada. Um total de 105 indivíduos foram separados em machos e fêmeas, levando em consideração as características de dimorfismo sexual da espécie (coloração do corpo, anatomia do corpo e nadadeiras, etc.), e posteriormente, separados em grupos e mantidos em 4 aquários de vidro com 15 L (30 cm de comprimento x 30 cm de altura x 20 cm de largura), sendo dois aquários exclusivos para machos e outros dois aquários exclusivos para fêmeas. Os animais foram aclimatados ao biotério do laboratório por um período de 45 dias. A exposição dos peixes ao álcool teve como objetivo induzir os animais a alterações semelhantes às observadas no binge drinking. Dessa forma, de acordo com a separação dos peixes em quatro aquários, os grupos eram transferidos do seu aquário-moradia para os aquários de exposição contendo 1,5% de álcool diluído em água ou água para os grupos controle. A permanência dos peixes nos aquários de exposição era de 20 min, simulando uma exposição a concentrações elevadas de álcool. Esse procedimento foi realizado uma vez por semana, em um dia fixo, no turno da manhã entre 9h e 10h, durante o período total de quatro semanas. Dessa forma, os grupos eram divididos em quatro tratamentos: Fêmeas controle (FCon - exposição apenas a água; $n = 27$), fêmeas álcool 1,5% (F1,5% - exposição a 1,5% de álcool, $n = 24$), machos controle (MCon - exposição apenas a água, $n = 27$) e machos álcool (M1,5% - exposição a 1,5% de álcool, $n = 27$). A coleta de encéfalos e os testes comportamentais foram realizados pelo menos 7 dias após a última exposição alcoólica. O teste comportamental Tanque Novo (Novel Tank) (Figura 1) se caracteriza pela exposição de um indivíduo isolado a uma condição de novidade, situação que naturalmente gera ansiedade (Maximino et al., 2012). Nesse teste, cada peixe foi transferido para um tanque retangular com 3L (Fig. 1) e o comportamento dos indivíduos foi gravado por 6 min. Em seguida, cada animal foi retornado para o tanque residência. O teste de sociabilidade ou teste social (Figura 2) consiste na avaliação da preferência social (por um grupo) em relação a um aquário vazio (apenas com água). Para avaliar a sociabilidade, cada indivíduo foi colocado no tanque central (Fig. 2) que oferecia a visão de um grupo (5 coespecíficos) em uma das laterais e um tanque vazio na outra lateral. A posição do cardume era randomizada à esquerda ou à direita para cada animal a fim de evitar viés de localização. Entre o aquário central e os aquários laterais, foram colocadas barreiras que impediam o contato visual entre o animal focal e o cardume nos primeiros momentos. Após 6 min de habituação ao tanque, as barreiras foram retiradas e os animais foram gravados por 5 min para avaliação do comportamento social. O teste de agressividade ou teste do espelho (Figura 3) consiste na utilização de um aquário de 3L, com um espelho posicionado paralelamente à sua lateral para estimular o comportamento agressivo. Ao inserir o animal no aquário, este espelho está coberto por uma barreira revestida com adesivo preto. Após o período de aclimação do animal (1 a 3 min), a gravação é iniciada. Durante os 5 primeiros min de gravação o espelho permanece oculto para o peixe. Em seguida, a barreira é retirada e o animal é gravado por mais 5 min. Assim, após o registro comportamental de cada indivíduo, o comportamento foi avaliado e separado em fase inicial (sem espelho) e final (com espelho), que foram considerados para as análises. Todas as análises do comportamento foram realizadas utilizando o software Anymaze. Para a avaliação da expressão gênica, 9 animais de cada grupo experimental (não foram avaliados nos testes comportamentais) foram eutanasiados em óleo de cravo (200 mg/L, oral e branquial) (Mocho et al., 2022). Após a eutanásia, a região do encéfalo de cada animal foi retirada e separada em 3 pools de 3 cérebros cada, para cada grupo, totalizando 9 cérebros para cada grupo experimental e 36 cérebros no total. Para a expressão gênica todos os passos seguiram o protocolo de Araujo-Silva et al. (2023). As principais vias avaliadas foram as diretamente relacionadas aos neurotransmissores mais afetados pelo consumo do álcool (Worst e Vrana, 2005), como

demonstrado na tabela 1. Para os testes estatísticos dos resultados comportamentais, os grupos apresentaram n diferentes do original devido a exclusão de animais por problemas técnicos na análise de vídeos e retirada de outliers, analisados pelo método Robust Outlier Analysis. Os dados foram testados quanto à sua normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para as análises comportamentais, foi utilizado o teste de ANOVA para comparar os grupos no teste de tanque novo e sociabilidade. Para a análise dos dados do teste de agressividade, foi utilizado o teste de ANOVA de duas vias, considerando como fatores o sexo e os diferentes estágios (inicial e final). Para os dados moleculares, a expressão gênica dos grupos experimentais para os genes de interesse foram comparadas por ANOVA. Para estes dados, o grupo de fêmeas controles foi utilizado como controle de normalização, decisão tomada após análise dos dados de comportamento, pois as fêmeas demonstraram menos alterações comportamentais após exposição alcoólica quando em comparação aos machos. O Teste post-hoc de Tukey foi realizado para as comparações múltiplas, quando necessário. Em todos os casos, as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism v. 9.5.1, e o nível de significância estatística foi estabelecido em $\alpha < 0,05$.

Resultados e Discussões

No tanque novo, o teste de One-Way ANOVA demonstrou diferenças entre os grupos experimentais na distância total percorrida ($F(3,43) = 3,12$, $p = 0,03$), apresentando maior distância percorrida pelas fêmeas alcoolizadas em comparação aos machos alcoolizados ($p_{\text{Tukey}} = 0,04$) (Figura 4a). Quanto à distância média do fundo, também obtivemos diferença significativa entre os grupos ($F(3,51) = 10,49$, $p < 0,0001$), fêmeas expostas ao álcool, que permaneceram a uma maior distância do fundo em comparação aos machos expostos ($p_{\text{Tukey}} = 0,03$) (Figura 4b). Quando comparada a latência para chegar ao topo, a One-Way ANOVA demonstrou diferença entre os grupos ($F(3,37) = 3,857$, $p = 0,01$), revelando que os machos controle demoram menos tempo que as fêmeas controle para explorar a zona do topo do aquário ($p_{\text{Tukey}} = 0,03$) (Figura 4c). Quanto ao tempo de permanência no fundo, os grupos diferiram ($F(3,45) = 25,23$, $p < 0,0001$) e foi observado que machos controle passam menos tempo no fundo comparado às fêmeas controle ($p_{\text{Tukey}} < 0,0001$) e aos machos alcoolizados ($p_{\text{Tukey}} < 0,01$) e que os machos alcoolizados demonstram menos tempo no fundo comparado às fêmeas alcoolizadas ($p_{\text{Tukey}} < 0,01$) (Figura 4d). Indivíduos machos e fêmeas apresentam, naturalmente, parâmetros locomotores e perfil comportamental distintos. Diversos estudos apontam para o comportamento tipo ansioso mais elevado em fêmeas do que em machos de zebrafish (Fontana et al., 2020; Dos Santos et al., 2021). No teste de tanque novo, esse comportamento é evidenciado pelo maior tempo no fundo do tanque, maior aversão a exploração da área superficial e menor distância do fundo (Fig. 4), área considerada mais segura, corroborando estudos anteriores. Diferenças hormonais (maiores níveis de estrógeno) estão relacionadas a este comportamento, evidenciado pela manipulação dos níveis de estrógeno em machos aumentar o comportamento tipo ansioso (Tao et al., 2025). O teste de One-Way ANOVA demonstrou diferenças entre os grupos experimentais no parâmetro de tempo na área social ($F(3,46) = 4,39$, $p = 0,008$), apresentando menor tempo passado na zona pelos machos alcoolizados em relação aos machos controles ($p_{\text{Tukey}} = 0,02$) e fêmeas alcoolizadas ($p_{\text{Tukey}} = 0,01$) (Figura 5a). No parâmetro de distância média da área social (Figura 5b), a One-Way ANOVA demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F(3,47) = 5,52$, $p = 0,002$), com o grupo de machos alcoolizados apresentando uma maior distância média da zona social em comparação aos machos controle ($p_{\text{Tukey}} = 0,01$) e as fêmeas alcoolizadas ($p_{\text{Tukey}} =$

0,002). A One-Way ANOVA não demonstrou significância estatística entre os grupos experimentais para os outros dois parâmetros avaliados, sendo eles a distância total percorrida ($F(3,46) = 0,18$, $p = 0,90$) e o número de entradas na área social ($F(3,48) = 0,81$, $p = 0,49$) (Figuras 5c e 5d). No teste do espelho, o Two-Way ANOVA demonstrou diferença significativa entre os grupos no parâmetro distância total percorrida para sexo ($F(3,46) = 8,27$, $p > 0,001$) mas não para estágio ($F(1,46) = 0,70$, $p = 0,40$), com os machos controle apresentando menor distância percorrida em comparação às fêmeas controle ($p_{\text{Tukey}} < 0,001$) no estágio inicial. No estágio final, os machos controle apresentaram menor distância percorrida em relação às fêmeas controle ($p_{\text{Tukey}} = 0,001$) e aos machos alcoolizados ($p_{\text{Tukey}} = 0,005$) (Figura 6a). O teste de Two-Way ANOVA também demonstrou diferença significativa entre os grupos no parâmetro tempo na área do espelho para sexo ($F(3,46) = 2,99$, $p = 0,04$) e para estágio ($F(1,46) = 29,89$, $p < 0,0001$), com o grupo de fêmeas alcoolizadas permanecendo menos tempo na área do espelho durante o estágio inicial em relação ao estágio final ($p_{\text{Tukey}} = 0,001$) e o grupo de machos alcoolizados permanecendo menos tempo na área do espelho durante o estágio inicial em relação ao estágio final ($p_{\text{Tukey}} = 0,006$) (Figura 6b). One-Way ANOVA também foi realizada para o parâmetro número de ataques, que não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos ($F(3,46) = 2,23$, $p = 0,09$) (Figura 6c). O comportamento social não apresenta variação intersexual marcante em zebrafish. Ambos os sexos preferem nadar em proximidade ao grupo do que se manter sozinhos, sendo a gregriedade uma característica da espécie (Snekser e Diestler, 2023). Neste estudo observamos comportamentos similares entre machos e fêmeas testados para preferência social (Fig. 5), corroborando a literatura. No entanto, a agressividade é um comportamento mais observado em machos do que em fêmeas. Embora ambos apresentem comportamentos agressivos, há diferenças na forma como a agressão é expressa e regulada entre os sexos (Scaia et al., 2022; Snekser e Diestler, 2023). Os machos tendem a demonstrar agressividade mais consistente e evidente, enquanto as fêmeas costumam resolver conflitos mais rapidamente e usar estratégias menos arriscadas (Scaia et al., 2022). No entanto, não observamos diferenças no comportamento agressivo no presente estudo (Fig. 6), o que pode ser derivado do tempo de observação (5 min) ou do tipo de teste usado (espelho). Na análise de expressão gênica, One-Way ANOVA demonstrou diferença significativa entre os grupos para o gene *gaba1* ($F(3,5) = 58,69$, $p < 0,001$), que revelou maior expressão nos machos controle em relação aos grupos de machos alcoolizados (fold change = 1,917) e fêmeas controle (fold change = -2,133). Quanto ao gene *drd2a*, houve diferença significativa entre os grupos ($F(3,8) = 13,30$, $p = 0,001$), demonstrando maior expressão nos machos controle em relação aos machos alcoolizados (fold change = 1,849) e fêmeas controle (fold change = -1,555). O gene *tph1* também demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F(3,8) = 7,64$, $p = 0,009$), com up-regulação da expressão após exposição ao álcool no grupo dos machos alcoolizados em relação ao grupo dos machos controle (fold change = -1,012). Para o gene *th1*, a One-Way ANOVA demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais ($F(3,6) = 67,31$, $p < 0,0001$), com maior expressão do gene nos machos controle em comparação aos machos alcoolizados (fold change = 2,605) e fêmeas controle (fold change = -2,637), além de uma diferença significativa entre a expressão nas fêmeas alcoolizadas tanto em relação às fêmeas controle (fold change = -1,059) quanto em relação aos machos alcoolizados (fold change = 1,027). Por fim, os resultados da One-Way ANOVA não demonstraram diferenças significativas entre os grupos experimentais na expressão dos genes *ache* ($F(3,8) = 0,34$, $p = 0,79$), *drd1b* ($F(3,8) = 2,67$, $p = 0,11$) e *gad1b* ($F(3,8) = 1,66$, $p = 0,25$). Nossos resultados de expressão gênica corroboram os dados comportamentais. Os machos apresentaram maior expressão dos genes *gaba1*, *drd2a* e *th1*. O *gaba1* codifica o receptor GABAA, presente na membrana pós-sináptica e que, ao se ligar com o

neurotransmissor GABA, media a inibição neuronal, ocasionando em efeitos sedativos e ansiolíticos (Sigel e Steinmann; 2012). Este achado corrobora os resultados do teste de tanque novo, em que os machos apresentaram menos comportamentos do tipo-ansioso (maior distância do fundo e menor latência para chegar ao topo do aquário), do que as fêmeas, como já apontado na literatura para o zebrafish (Johnson et al., 2023). Os genes *drd2a* e *th1* fazem parte das vias de transmissão dopaminérgicas, associadas ao controle motor, motivação e recompensa (Klein et al., 2019; Tu et al., 2020). Ambos os genes apresentaram expressão mais elevada em machos controle comparados às fêmeas controle, corroborando os dados comportamentais aqui obtidos e estudos anteriores que indicam resposta de ansiedade induzida pela redução nos níveis de dopamina (Kacprzak et al., 2017; Li et al., 2017). O gene *tph1* tem como função a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que por sua vez é convertido em serotonina (5-HT), relacionada a efeitos ansiolíticos e maior sociabilidade em zebrafish (Barba-Escobedo e Gould, 2012; Maximino et al., 2013). A expressão deste gene foi aumentada em machos expostos ao álcool (Fig. 7). Entretanto, nos testes comportamentais percebe-se maior ansiedade e menor sociabilidade nos machos, desempenho não esperado quando correlacionado à expressão gênica (Barba-Escobedo e Gould, 2012). Este dado pode sugerir um mecanismo compensatório ou até mesmo que a amplificação na síntese de serotonina não causa alteração funcional direta. Em humanos, alguns antidepressivos, como os da classe de Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), que aumentam os níveis de 5-HT na fenda sináptica, podem causar aumento da ansiedade no primeiros dias de uso, antes de causar os seus efeitos terapêuticos (Chu e Wadhwa, 2025). Já em roedores, foi observado que a 5-HT possui diferentes efeitos dependendo da região do cérebro em que está aumentada, nas amígdalas, por exemplo, ela resulta no aumento de ansiedade nesses animais (Ren et al., 2018). Ademais, vale considerar que a expressão gênica representa o primeiro passo de uma complexa cadeia de eventos que culmina na manifestação comportamental. Entre esses extremos, ocorre a síntese de proteínas com distintas funções e atividades, cuja produção pode ser interrompida em diferentes níveis, impedindo que o comportamento esperado se concretize (Gamba et al., 2024). As correlações dos estudos de binge drinking em zebrafish com estudos em humanos devem ser realizadas com cautela, tendo em vista as diferenças entre os organismos. Porém, devido a alta homologia genética do zebrafish com os humanos (>70%), os efeitos do álcool na espécie podem ser preditores dos efeitos em humanos (Gerlai et al., 2000; Suresh et al., 2021; Scerbina e Gerlai, 2022). Estudos epidemiológicos demonstram que os homens apresentam maior taxa de consumo e probabilidade de desenvolvimento de transtornos por uso do álcool em comparação com mulheres (Erol e Karpyak, 2015; White, 2020). Os achados do presente estudo indicam que os machos de zebrafish foram mais suscetíveis a alterações causadas pela exposição ao álcool, refletindo a semelhança nos mecanismos pelos quais o álcool atua no cérebro dessas duas espécies. O álcool é capaz de causar alterações no humor, ansiedade, comportamento social, impulsividade e agressividade em humanos, assim como os nossos resultados demonstram alterações equivalentes em zebrafish. O efeito bifásico do álcool muitas vezes contrasta com os fatores socioculturais pelos quais os humanos o consomem. O alívio da ansiedade, por exemplo, é um efeito do álcool em concentrações baixas, porém no caso do binge drinking, as concentrações altas do álcool exacerbam a ansiedade, semelhante aos resultados encontrados nos machos de zebrafish (Hamel et al., 2022). De modo semelhante, o comportamento de impulsividade e, em alguns indivíduos, de agressividade, são exacerbados pelo consumo de álcool. A maior reatividade ao espelho pelos animais tratados com álcool e o aumento da atividade locomotora em machos podem ser interpretados como desinibição e irritabilidade induzidas pelo álcool. Em seres humanos, o consumo de álcool está diretamente relacionado ao comportamento agressivo em homens (Harmon et al.,

2021). As vias de neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica avaliadas neste estudo são essenciais na articulação da impulsividade e agressividade em humanos. Além disso, os genes *drd2a* e *th1*, que apresentaram alterações na expressão pós-exposição alcoólica - especialmente nos machos - são relevantes, tendo em vista a primordialidade desta via, na região mesolímbica para o comportamento de busca ativa do álcool (sistema de recompensa e dependência) (Klein et al., 2019). A caracterização de diferenças sexuais na resposta ao álcool é importante para formular estratégias de prevenção e tratamento mais personalizados. É essencial o aprofundamento em aspectos como os mecanismos que levam às diferentes respostas ao álcool entre machos e fêmeas, por exemplo, explorando a atuação dos hormônios sexuais e analisando outros genes e vias. Verificar se as diferenças sexuais persistem em diferentes doses de álcool também é um ponto importante para definir tratamentos personalizados. Além disso, é de suma importância a verificação da expressão gênica, níveis de neurotransmissores e atividade neuronal em regiões específicas do cérebro, permitindo uma análise mais direcionada dos efeitos do álcool, pois a análise do tecido cerebral por completo torna essas conclusões bastante generalistas. Também não é esclarecido na literatura se o binge drinking é capaz de afetar a expressão gênica de forma intergeracional, atingindo gerações futuras de pais expostos ao álcool.

Conclusão

Este estudo demonstra que o zebrafish é um modelo eficaz para investigar as diferenças sexuais na resposta ao "binge drinking". Os machos apresentaram maior suscetibilidade às alterações causadas pelo álcool, com diferenças significativas nos parâmetros locomotores e na expressão gênica entre os grupos controle e alcoolizados. As fêmeas, por outro lado, mostraram-se mais resilientes, com poucas alterações nos parâmetros comparados aos indivíduos controle. Essa resiliência feminina pode estar ligada a mecanismos intrínsecos, como a atuação protetora de hormônios sexuais como o estrogênio, que modula circuitos de neurotransmissão e promove neuroproteção (Simpkins et al., 2012). A caracterização dessas diferenças sexuais na resposta ao álcool é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais personalizadas. Futuras pesquisas devem aprofundar-se nos mecanismos que levam a essas diferentes respostas, explorando a influência dos hormônios sexuais e analisando outros genes e vias. É importante também verificar se essas diferenças persistem em diferentes doses de álcool para otimizar os tratamentos. Além disso, a análise da expressão gênica, níveis de neurotransmissores e atividade neuronal em regiões cerebrais específicas poderia fornecer conclusões mais direcionadas sobre os efeitos do álcool, considerando que a análise do tecido cerebral completo pode ser muito generalista. O estudo do impacto intergeracional do "binge drinking" na expressão gênica também é uma área a ser explorada. Embora a transposição direta dos resultados para humanos exija cautela devido à maior complexidade do cérebro humano e à influência de fatores culturais e psicossociais, a caracterização de alterações causadas pelo modelo de "binge drinking" em zebrafish contribui significativamente para o campo de estudos do álcool. Este trabalho reforça a importância de considerar o sexo biológico nos resultados, demonstrando perfis de alteração distintos entre machos e fêmeas expostos ao álcool. Adicionalmente, abre caminhos para a comparação dos efeitos do "binge drinking" em adultos de zebrafish e suas gerações futuras, investigando a herdabilidade dessas alterações.

Referências

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th-TR ed. [s.l.] American Psychiatric Association, p. 491–503, 2022.
- ARAÚJO-SILVA, H. et al. Individual differences in response to alcohol and nicotine in zebrafish: Gene expression and behavior. *Development, Growth & Differentiation*, v. 65, n. 8, p. 434–445, 31 out. 2023.
- BARBA-ESCOBEDO, P. A.; GOULD, G. G. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes, Brain and Behavior*, v. 11, n. 3, p. 366–373, 28 abr. 2012.
- BUGEL, S. M.; TANGUAY, R. L.; PLANCHART, A. Zebrafish: A Marvel of High-Throughput Biology for 21st Century Toxicology. *Current Environmental Health Reports*, v. 1, n. 4, p. 341–352, 7 dez. 2014.
- CHOI, T.-Y. et al. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 53, n. 3, p. 310–317, 1 mar. 2021.
- DOS SANTOS, B. E. et al. Sex differences shape zebrafish performance in a battery of anxiety tests and in response to acute scopolamine treatment. *Neuroscience Letters*, v. 759, p. 135993, ago. 2021.
- EROL, A.; KARPAYAK, V. M. Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 156, p. 1–13, nov. 2015.
- FONTANA, B. D.; CLEAL, M.; PARKER, M. O. Female adult zebrafish (*Danio rerio*) show higher levels of anxiety-like behavior than males, but do not differ in learning and memory capacity. *European Journal of Neuroscience*, v. 52, n. 1, p. 2604–2613, 6 jul. 2020.
- GAMBA, B. F. G. et al. Embryonic alcohol exposure alters cholinergic neurotransmission and memory in adult zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 474, p. 115176, out. 2024.
- GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n. 4, p. 773–782, dez. 2000.
- HAMEL, R. et al. The neurobiological markers of acute alcohol's subjective effects in humans. *Neuropsychopharmacology*, v. 47, n. 12, p. 2101–2110, 14 nov. 2022.
- HARMON, D. A.; HAAS, A. L.; PETERKIN, A. Experimental tasks of behavioral risk taking in alcohol administration studies: A systematic review. *Addictive Behaviors*, v. 113, p. 106678, fev. 2021.
- JOHNSON, A. et al. Examining behavioural test sensitivity and locomotor proxies of anxiety-like behaviour in zebrafish. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 3768, 7 mar. 2023.
- KACPRZAK, V. et al. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 157, p. 1–8, jun. 2017.
- KEYES, K. M. et al. Is There a Recent Epidemic of Women's Drinking? A Critical Review of National Studies. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 43, n. 7, p. 1344–1359, 5 jul. 2019.

KLEIN, M. O. et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 39, n. 1, p. 31–59, 16 jan. 2019.

LI, X. et al. SiO₂ nanoparticles cause depression and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *RSC Advances*, v. 7, n. 5, p. 2953–2963, 2017.

LIU, J. et al. Application of the zebrafish model in human viral research. *Virus Research*, v. 341, p. 199327, mar. 2024.

MADDERN, X. J. et al. Sex Differences in Alcohol Use: Is It All About Hormones? *Endocrinology*, v. 165, n. 9, 26 jul. 2024.

MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour*, v. 149, n. 10–12, p. 1099–1123, 2012.

MAXIMINO, C. et al. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology*, v. 71, p. 83–97, ago. 2013.

MOCHO, J.-P. et al. A Multi-Site Assessment of Anesthetic Overdose, Hypothermic Shock, and Electrical Stunning as Methods of Euthanasia for Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos and Larvae. *Biology*, v. 11, n. 4, p. 546, 1 abr. 2022.

PELTIER, M. R. et al. Sex differences in stress-related alcohol use. *Neurobiology of Stress*, v. 10, p. 100149, fev. 2019.

REN, J. et al. Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Subsystems. *Cell*, v. 175, n. 2, p. 472–487.e20, out. 2018.

SCAIA, M. F. et al. Sex Differences in Aggression Are Paralleled by Differential Activation of the Brain Social Decision-Making Network in Zebrafish. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 16 fev. 2022.

SCERBINA, T.; GERLAI, R. Acute Administration of Ethanol and of a D1-Receptor Antagonist Affects the Behavior and Neurochemistry of Adult Zebrafish. *Biomedicines*, v. 10, n. 11, p. 2878, 10 nov. 2022.

SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, Function, and Modulation of GABA_A Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 48, p. 40224–40231, nov. 2012.

SIMPKINS, J. W. et al. Neuroprotection and Estrogen Receptors. *Neuroendocrinology*, v. 96, n. 2, p. 119–130, 2012.

SNEKSER, J. L.; DIESTLER, E. Sex differences in the expression of aggressive behavior and influences on social choice in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, v. 208, p. 104871, maio 2023.

SURESH, S. et al. Exposure of parents to alcohol alters behavior of offspring in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 111, p. 110143, dez. 2021.

TAO, H. et al. Endogenous 17 β -estradiol regulates sexually dimorphic anxiety responses in zebrafish via the HPI axis and 5-HT/DA pathways. *Frontiers in Marine Science*, v. 12, 7 fev. 2025.

TU, X. et al. Tributyltin enhanced anxiety of adult male zebrafish through elevating cortisol level and disruption in serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid neurotransmitter pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 203, p. 111014, out. 2020.

WHITE, A. Gender Differences in the Epidemiology of Alcohol Use and Related Harms in the United States. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 40, n. 2, 2020.

WORST, T. J.; VRANA, K. E. ALCOHOL AND GENE EXPRESSION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Alcohol and Alcoholism*, v. 40, n. 1, p. 63–75, 1 jan. 2005.

Anexos

Figura 1 - Representação do aparato do teste de tanque novo. O aparato consiste em um aquário 3L (números representam as dimensões em cm). Papéis brancos recobrem as paredes do tanque, exceto a frontal, permitindo a gravação do comportamento em vídeo.

Figura 2 - Representação do teste de sociabilidade. São utilizados 1 aquário de 3L (20 x 12 x 16 cm) posicionado centralmente e dois aquários de 1L posicionados nas laterais (10 x 10 x 15 cm).

Figura 3 - Representação do aparato do teste de agressividade (teste do espelho). O aparato consiste em um aquário de 3L (números representam as dimensões em cm) e um espelho posicionado em uma das laterais, coberto inicialmente.

Figura 4 - Respostas comportamentais de zebrafish adultos no teste tanque novo. Grupos experimentais: Fêmeas controle (n = 18), Fêmeas Álcool 1.5% (n = 14), Machos controle (n = 12) e Machos Álcool 1.5% (n = 10).

Figura 5 - Resposta comportamental de zebrafish adultos no teste de sociabilidade. Grupos experimentais: Fêmeas controle (n = 18), Fêmeas Álcool 1.5% (n = 14), Machos controle (n = 13) e Machos Álcool 1.5% (n = 10).

Figura 6 - Respostas comportamentais de zebrafish no teste de agressividade. Grupos experimentais: Fêmeas controle (n = 17), Fêmeas Álcool 1.5% (n = 14), Machos controle (n = 10) e Machos Álcool 1.5% (n = 10).

Figura 7 - Expressão gênica relativa em encéfalos de zebrafish. Grupos experimentais: Fêmeas controle, Fêmeas Álcool 1.5%, Machos controle e Machos Álcool 1.5% (n = 3 pools de 3 cérebros por cada grupo).

Tabela 1 - Lista de genes avaliados na expressão gênica.

CÓDIGO: SB0005

AUTOR: MATHEUS FERNANDES DIAS

COAUTOR: DAVID MEDEIROS NERY

COAUTOR: MARCOS PAULO BARROS VIANA

COAUTOR: AURÉLIO GOMES DE ALBUQUERQUE NETO

COAUTOR: ISABELLA LETTIERI DAMASIO PEREIRA

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: Análise da Tendência de Óbitos Fetais: Uma Abordagem de Machine Learning para Defeitos Congênitos e Fatores Maternos Associados

Resumo

As malformações congênitas representam uma das principais causas de natimortalidade no Brasil. Por isso, este estudo utilizou dados do SIM/DATASUS (2003–2022) do Brasil e da região Nordeste e aplicou os algoritmos Prophet (predição de séries temporais) e o pyMannKendall (detecção de tendência) para projetar a evolução dos óbitos fetais por anomalias congênitas (CID-10 Q00-Q99) até 2030. Ambos os modelos preveem um aumento no cenário nacional de óbitos fetais por malformações congênitas nas faixas-etárias acima de 20 anos até 2030. Isso é decorrente da combinação entre o avanço da idade materna na primeira gestação, o aumento da prevalência de comorbidades crônicas (como hipertensão e diabetes) e a persistência de barreiras de acesso ao pré-natal de alta complexidade e fatores que amplificam a exposição a agentes teratogênicos. Os resultados demonstram o potencial da combinação de algoritmos de aprendizado de máquina para gerar cenários futuros, identificar subgrupos de risco e subsidiar a alocação de recursos em saúde perinatal.

Palavras-chave: Aprendizagem de Máquina. Natimortos. Anormalidades Congênitas.

TITLE: Trend Analysis of Fetal Deaths: A Machine-Learning Approach to Congenital Defects and Associated Maternal Factors

Abstract

Congenital malformations are among the leading causes of stillbirth in Brazil. This study analyzed SIM/DATASUS data (2003–2022) for Brazil and the Northeast region and applied the Prophet time-series forecasting algorithm alongside pyMannKendall trend-detection tests to project fetal deaths due to congenital anomalies (ICD-10 Q00–Q99) through 2030. Both models forecast a nationwide increase in fetal deaths from congenital malformations among mothers aged over 20 years by 2030. This rise appears to stem from a convergence of factors: later maternal age at first pregnancy, higher prevalence of chronic comorbidities (e.g.,

hypertension and diabetes), persistent barriers to high-complexity prenatal care, and ongoing exposure to teratogenic agents. These findings highlight the potential of combining machine-learning algorithms to generate future scenarios, pinpoint high-risk subgroups, and guide the strategic allocation of resources in perinatal health.

Keywords: Machine Learning. Stillbirth. Congenital Abnormalities.

Introdução

Anomalias congênitas são alterações estruturais ou funcionais que se originam durante a formação dos órgãos, sua etiologia envolve interações entre fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e infecciosos e essas condições acometem cerca de 6% dos nascimentos mundiais e figuram entre as principais causas de perda fetal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). No Brasil, a mortalidade associada a essas condições apresenta variações regionais significativas, com destaque para o Nordeste, onde a prevalência de defeitos do sistema osteomuscular pode exceder 29 casos por 10.000 nascidos vivos (FERNANDES et al., 2023).

A persistência desse cenário reflete desafios como barreiras de acesso ao cuidado pré-natal, disparidades socioeconômicas e o sub-registro de óbitos (BARBEIRO et al., 2015). Avanços recentes em aprendizado de máquina (ML) têm ampliado a capacidade analítica em saúde pública, permitindo a exploração de grandes bases de dados e a elaboração de estimativas prospectivas (DU et al., 2023). Contudo, a aplicação de ML à natimortalidade requer estratégias para contornar lacunas de informação e flutuações abruptas nas séries históricas. Portanto, o objetivo deste estudo é analisar a tendência dos óbitos fetais associados a defeitos congênitos, bem como os fatores maternos, utilizando machine learning.

Metodologia

O estudo utilizou dados de óbitos fetais registrados no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/DATASUS) de 2003 a 2022, que se enquadravam no capítulo XVII da CID-10 (Q00-Q99). Além disso, as tabelas foram geradas a partir do filtro a respeito da idade materna e da idade gestacional. Dessa forma, como se tratam de informações públicas, agregadas e anonimizadas, o estudo está dispensado de avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (Sistema CEP/Conep), conforme o artigo 2º, XIV da Resolução nº 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde.

Para modelagem das séries temporais foi empregada a biblioteca Prophet (TAYLOR; LETHAM, 2018), configurada com componentes aditivos de tendência e sazonalidade, intervalo de incerteza de 95% e validação cruzada. Além disso, a detecção da direção da tendência ficou a cargo da biblioteca pyMannKendall (HUSSAIN; MAHMUD, 2019), que aplica o teste não paramétrico de Mann-Kendall juntamente com a inclinação de Sen, o sinal positivo ou negativo e o valor de p inferior a 0,05 foram considerados evidência estatística de crescimento ou decréscimo.

O desempenho preditivo do Prophet (META) foi quantificado por três métricas de erro, o Erro Absoluto Médio (MAE), a Raiz do Erro Quadrático Médio (RMSE) e o Erro Percentual

Absoluto Médio (MAPE). Seguindo a classificação de Hyndman e Koehler (2006, p. 683), interpretou-se acurácia como alta quando o MAPE foi até dez por cento, boa entre onze e vinte por cento, moderada entre vinte e um e cinquenta por cento e baixa acima desse valor. Além disso, somente predições com MAPE não superior a dez por cento foram consideradas na discussão dos resultados.

Resultados e Discussões

No cenário nacional, ambos os algoritmos apontaram para uma tendência de aumento dos óbitos fetais por malformações até 2030. O risco mostrou-se concentrado em gestações de 28 a 36 semanas, fase crítica onde a imaturidade de órgãos vitais agrava o prognóstico de defeitos respiratórios. Essa complementaridade reforça a validade da abordagem combinada, o Prophet quantifica cenários futuros, enquanto o teste de Mann-Kendall valida a direção da tendência. Além disso, o modelo performou resultados altamente precisos ($MAPE < 10\%$) em 21 dos 24 casos avaliados (87,5%) e boa precisão nos 3 casos restantes (12,5%), referentes às gestações com idade gestacional inferior a 22 semanas em todo o Brasil, às gestações de 22 a 27 semanas no Nordeste e à faixa etária materna de 35 a 39 anos também no Nordeste. O aumento da mortalidade fetal entre gestantes jovens altera o foco de risco antes concentrado na idade materna avançada e sinaliza a ascensão de fatores não etários (AHN, 2022). Isso pode ser decorrente de exposições comportamentais como álcool e tabaco visto que desencadeiam dano oxidativo ao DNA e reprogramações epigenéticas de efeito teratogênico (PINSON; MIRANDA, 2019). A possibilidade de convergência desses agentes comportamentais e ambientais para subsidiar os resultados da tendência ascendente observada, enfatizando a necessidade de intervenções na triagem pré-concepcional e aconselhamento de estilo de vida em mulheres em idade reprodutiva.

Conclusão

A aplicação dos modelos Prophet e pyMannKendall gerou predições coerentes e estatisticamente robustas sobre a evolução da natimortalidade por malformações congênitas no Brasil e no Nordeste, tendência ascendente até 2030. Por isso, Acreditamos que a incorporação de aprendizado de máquina no Sistema Único de Saúde (SUS) pode fortalecer a vigilância perinatal, permitindo planejamento de demandas, otimizar a alocação de recursos e monitorar o impacto de políticas públicas de forma mais ágil e baseada em evidências.

Referências

1. World Health Organization. Birth defects. Geneva: WHO; 2023.
2. Fernandes QHRF et al. Tendência da mortalidade infantil por anomalias congênitas no Brasil, 2001-2018. Ciên Saúde Colet. 2023.
3. Barbeiro FM et al. Fetal deaths in Brazil: a systematic review. Rev Saúde Pública. 2015.

4. Du Y et al. Machine-learning decision support in pregnancy care: systematic review. *Int J Med Inform.* 2023;173:105040.
5. Taylor SJ, Letham B. Forecasting at scale. *Am Statistician.* 2018;72:37-45.
6. Hussain M, Mahmud I. pyMannKendall: a Python package for trend tests. *J Open Source Softw.* 2019;4:1556.
7. Hyndman RJ, Koehler AB. Another look at measures of forecast accuracy. *Int J Forecast.* 2006;22:679-688.
8. AHN, D.; KIM, J.; KANG, J.; KIM, Y. H.; KIM, K. Congenital anomalies and maternal age: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, [S. l.], 2022. DOI: 10.1111/aogs.14339.
9. PINSON, M. R.; MIRANDA, R. C. Noncoding RNAs in development and teratology, with focus on effects of cannabis, cocaine, nicotine, and ethanol. *Birth Defects Research*, [S. l.], v. 111, n. 17, p. 1308-1319, 2019.

CÓDIGO: SB0032

AUTOR: REBECA RAIANE DA SILVEIRA SOUZA

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: A PREVALÊNCIA DE SINTOMAS DEPRESSIVOS ENTRE ESTUDANTES DO ENSINO SUPERIOR NO BRASIL: UMA ANÁLISE POR REGIÕES.

Resumo

O ingresso no ensino superior é um período de vulnerabilidade para o desenvolvimento de transtornos mentais, com destaque para a depressão. No entanto, há uma carência de dados abrangentes sobre a prevalência de sintomas depressivos em estudantes universitários no Brasil, especialmente com recortes regionais. Objetivo: Investigar a prevalência de sintomas depressivos em estudantes universitários brasileiros, estratificada por macrorregiões, a partir de dados do estudo de coorte multicêntrico UNILIFE-M. Metodologia: Realizou-se um estudo transversal com dados coletados em 2023 de estudantes ingressantes de 11 universidades. Utilizou-se um survey online que incluiu o PHQ-9 para avaliar a gravidade dos sintomas depressivos (mínima, leve, moderada, moderadamente grave e grave). Resultados: A análise revelou uma alta prevalência de sintomas depressivos em todas as regiões, com mais de 70% dos estudantes apresentando algum grau de sintomatologia. As universidades do Nordeste apresentaram o cenário mais preocupante, com a menor proporção de estudantes sem sintomas (6,68%) e as maiores taxas de sintomas moderados (27,97%), moderadamente graves (24,26%) e graves (21,53%). As demais regiões também registraram níveis elevados de sintomatologia em todas as categorias de gravidade. Conclusão: Os resultados apontam um panorama alarmante da saúde mental entre universitários, com uma prevalência expressivamente alta de sintomas depressivos já nos primeiros semestres.

Palavras-chave: Sintomas Depressivos, Estudantes Universitários, Saúde Mental

TITLE: The Prevalence of Depressive Symptoms among University Students in Brazil: A Regional Analysis

Abstract

Entering higher education is a period of vulnerability for the development of mental disorders, particularly depression. However, there is a scarcity of comprehensive data on the prevalence of depressive symptoms among university students in Brazil, especially with regional breakdowns.

Objective: To investigate the prevalence of depressive symptoms in Brazilian university students, stratified by macro-regions, using data from the UNILIFE-M multicenter cohort study.

Methodology: A cross-sectional study was conducted with data collected in 2023 from first-year students at 11 universities. An online survey was used, which included the PHQ-9 to assess the severity of depressive symptoms (minimal, mild, moderate, moderately severe, and severe).

Results: The analysis revealed a high prevalence of depressive symptoms across all regions, with over 70% of students presenting some degree of symptomatology. Universities in the Northeast presented the most concerning scenario, with the lowest proportion of students without symptoms (6.68%) and the highest rates of moderate (27.97%), moderately severe (24.26%), and severe (21.53%) symptoms. The other regions also recorded high levels of symptomatology across all severity categories.

Conclusion: The results indicate an alarming picture of mental health among university students, with a remarkably high prevalence of depressive symptoms already in the early semesters.

Keywords: Depressive Symptoms, University Students, Mental Health

Introdução

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição de humor prevalente, que afeta cerca de 350 milhões de pessoas no mundo (Organização Mundial da Saúde [OMS], 2017; Liu et al., 2020). Conforme o DSM-5, é caracterizado por um período mínimo de duas semanas de tristeza persistente e/ou anedonia (perda de prazer), frequentemente acompanhado por fadiga e dificuldades na rotina diária. A fisiopatologia do TDM é complexa, envolvendo uma interação entre fatores de risco não modificáveis e modificáveis. A predisposição genética é um fator não modificável significativo, com metanálises sugerindo que pode responder por até 40% do risco para o desenvolvimento do transtorno (Sullivan, Neale, & Kendler, 2000). Já os fatores modificáveis incluem estresse crônico, qualidade do sono, sedentarismo e, de forma crucial, a qualidade do suporte social.

Estudantes universitários constituem uma população de alta vulnerabilidade para o desenvolvimento de transtornos mentais, pois a transição para o ensino superior é uma fase marcada por estressores únicos (Ibrahim, Kelly, Adams, & Glazebrook, 2013). A alta carga acadêmica, pressão por desempenho, competitividade e o distanciamento do núcleo familiar criam um ambiente propício para gatilhos psicossociais. Esse cenário, somado a hábitos comuns na vida acadêmica — como privação de sono, sedentarismo e alimentação irregular — exacerba a vulnerabilidade deste grupo (Pacheco et al., 2017).

Apesar do reconhecimento dessa vulnerabilidade, há no Brasil uma notável carência de dados epidemiológicos abrangentes sobre a saúde mental dos universitários, especialmente com recortes regionais. A maioria das pesquisas existentes se concentra em instituições específicas ou nas regiões Sul e Sudeste, o que limita a compreensão do fenômeno e o planejamento de intervenções eficazes (Gusmão, Gouveia, & Alves, 2022).

Diante dessa lacuna, este estudo tem como objetivo central investigar a prevalência de sintomas depressivos em estudantes de graduação a partir dos dados do UNILIFE-M, um estudo de coorte prospectivo e multicêntrico. A pesquisa foi realizada em 11 universidades distribuídas pelo Brasil (incluindo UnB, UFCE, UFPA, USP, UFRN, UFRJ, UFSC, UFSM,

UFPI, UFS e UEMG), com dados de 2023. O propósito é gerar um diagnóstico detalhado da saúde mental nesta população, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de programas de apoio psicológico e estratégias de prevenção mais adequadas às realidades locais.

Metodologia

Este estudo constitui uma segmentação do estudo UNILIFE-M e se configura como uma investigação transversal. Foram selecionados 3.722 estudantes ingressantes nos períodos letivos 2023.1 e 2023.2, provenientes de todos os cursos das universidades envolvidas no estudo, para participarem de uma pesquisa online (survey) voltada para a avaliação da saúde mental e do estilo de vida. Nesta etapa, foram empregados os seguintes instrumentos: 1) instrumento de avaliação transversal de sintomas de nível 1 do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição (DSM-5), e 2) questionários sociodemográficos e acadêmicos.

Para os participantes que apresentaram sintomas positivos ($n=2684$) em algum dos instrumentos de avaliação transversal de sintomas de nível 1 (por exemplo, depressão), foram aplicados, na plataforma online, instrumento específico de nível 2 (Questionário de Saúde do Paciente-9 - PHQ-9 para depressão). É importante ressaltar que os instrumentos destinados à identificação de sintomas de transtornos mentais não constituem instrumentos diagnósticos, mas sim ferramentas de triagem.

A análise de dados se concentrou na prevalência de sintomas depressivos, que foi estratificada por macrorregião do país. Adicionalmente, os participantes foram classificados em categorias de acordo com os escores obtidos no PHQ-9, seguindo os pontos de corte estabelecidos: sem depressão ou depressão mínima (0-4), depressão leve (5-9), depressão moderada (10-14), depressão moderadamente grave (15-19) e depressão grave (20-27) (Kroenke; Spitzer; Williams, 2001).

Para a caracterização geral da amostra e para permitir futuras análises de associação, foi construída uma tabela com os dados sociodemográficos e clínicos. Nesta tabela, as variáveis contínuas, como idade, Índice de Massa Corporal (IMC), altura e peso, são apresentadas por meio de suas médias e respectivos desvios padrão.

Resultados e Discussões

A análise da prevalência de sintomas depressivos entre os estudantes universitários participantes do estudo UNILIFE-M revelou variações relevantes entre as instituições avaliadas (tabela 1). Do total de 3.722 alunos participantes do estudo, 2.684 foram elegidos para o instrumento de triagem de nível 2 (PHQ-9), dos quais os resultados são analisados na tabela a seguir.

De forma geral, observou-se uma alta proporção de sintomas depressivos moderados a graves nas diferentes regiões do país, corroborando a literatura que destaca os universitários como um grupo vulnerável ao sofrimento psíquico. Em geral, cerca de 65,09% ($n=1.747$) da parcela de estudantes que responderam à PHQ-9, apresentam sintomas de moderados a graves.

Na Universidade de Brasília (UnB), representante do Centro-Oeste no estudo, observou-se que apenas 14,56% dos estudantes apresentaram escores indicativos de ausência de depressão ou depressão mínima, enquanto 17,48% apresentaram sintomas moderados, 22,33% moderadamente graves e 14,56% sintomas graves. A proporção de estudantes com sintomas leves foi a mais prevalente (31%). Esses dados apontam para uma distribuição significativa de sintomas em diferentes níveis de gravidade, o que destaca a importância de estratégias de prevenção e acolhimento já nos primeiros períodos da graduação.

As instituições do Nordeste — Universidade Federal do Piauí (UFPI), Universidade Federal de Sergipe (UFS), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e Universidade Federal do Ceará (UFC) — apresentaram a maior prevalência de sintomas moderados (27,97%), acompanhada por níveis elevados de depressão moderadamente grave (24,26%) e grave (21,53%). Apenas 6,68% dos estudantes desse grupo não apresentaram sintomas depressivos relevantes, sugerindo um cenário alarmante que demanda ações institucionais urgentes.

Nas universidades do Sul — Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) — identificou-se uma tendência semelhante: baixos índices de estudantes sem sintomas depressivos (9%) e uma alta prevalência de sintomas leves (29,3%), moderados (25,10%) e moderadamente graves (22,10%). Houve também níveis relevantes de depressão grave (14,6%).

As universidades do Sudeste — Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) — também apresentaram índices significativos de sintomas depressivos: 25,55% dos estudantes apresentaram sintomas moderados, 21,10% moderadamente graves e 15,36% sintomas graves. Combinados, esses níveis médios e altos de sintomatologia representam mais da metade da amostra, confirmando um panorama de sofrimento psíquico que transcende as barreiras regionais e institucionais.

A instituição do Norte do país participante do estudo, Universidade Federal do Pará (UFPA), revelou prevalências distribuídas de forma semelhante às demais instituições: 14% com escores indicativos de ausência ou depressão mínima, 28% com sintomas leves, 21% moderados, 23% moderadamente graves e 13% graves.

Ao observar a caracterização da amostra (tabela 2), notam-se diferenças nos perfis sociodemográficos entre os centros. A média de idade variou entre 20 e 23 anos, sendo a maior nas instituições UNIMONTES e UFRJ. O IMC médio mais alto também foi identificado nesse grupo (24,25), enquanto as demais instituições apresentaram IMCs médios entre 20,38 e 20,96. Apesar de as variáveis antropométricas não terem sido analisadas diretamente como fatores associados à depressão neste recorte, sua descrição contribui para futuras análises que explorem possíveis correlações com os sintomas depressivos.

Os resultados do presente estudo confirmam a elevada prevalência de sintomas depressivos entre estudantes universitários brasileiros, revelando um padrão de sofrimento psíquico significativo logo nos primeiros semestres da graduação. Esses achados corroboram estudos anteriores que destacam a população universitária como especialmente vulnerável a transtornos mentais comuns, como a depressão (Ibrahim et al., 2013).

Um estudo multicêntrico conduzido por Vasconcelos et al. (2021), com amostra de estudantes de instituições públicas brasileiras, identificou uma prevalência de sintomas depressivos de 38,6%, com maior concentração na faixa leve a moderada. Em comparação,

os dados do UNILIFE-M indicam prevalências ainda mais elevadas nas categorias moderada (até 27,97%), moderadamente grave (até 24,26%) e grave (até 21,53%), especialmente em instituições do Nordeste, sugerindo um agravamento do quadro ou a existência de características regionais que merecem investigação aprofundada.

Além disso, Almeida et al. (2020) destacam que a prevalência de depressão entre universitários tende a variar conforme o curso, o semestre e o contexto socioeconômico, com taxas variando entre 23% e 50% em estudos realizados no Brasil. A presente pesquisa encontrou níveis acima dessa média em algumas instituições, principalmente no Nordeste, o que indica a necessidade urgente de ações institucionais direcionadas à saúde mental dos estudantes.

Outro aspecto importante a considerar é a gravidade dos sintomas. Pesquisa realizada por Santos et al. (2017) em uma universidade federal do Sudeste revelou que apenas 6,5% dos estudantes apresentavam sintomas depressivos graves. No UNILIFE-M, em contrapartida, algumas instituições superaram 14% nessa mesma categoria, indicando um cenário de maior gravidade que requer respostas mais robustas das universidades envolvidas.

Estudos internacionais também reforçam essa preocupação. A Organização Mundial da Saúde (2017) apontou que cerca de 35% dos estudantes universitários em países de baixa e média renda apresentavam sintomas depressivos clínicos, resultado próximo ao observado em universidades do Centro-Oeste e Sul brasileiras, mas inferior às prevalências encontradas nas universidades do Nordeste participantes do presente estudo.

A caracterização sociodemográfica da amostra demonstrou diversidade entre as instituições quanto à idade e ao IMC médio dos participantes, dados que, embora não tenham sido explorados neste recorte como variáveis associadas, poderão contribuir para análises posteriores sobre fatores de risco à saúde mental.

Conclusão

Diante desses achados, reforça-se a necessidade de políticas públicas e institucionais que contemplem ações de prevenção, diagnóstico precoce e acolhimento psicológico. A implementação de programas de apoio estruturados, o fortalecimento dos serviços de saúde mental nos campi e a promoção de ambientes acadêmicos mais acolhedores e menos competitivos são medidas fundamentais para mitigar o sofrimento psíquico entre estudantes do ensino superior.

Portanto, conclui-se que os dados apresentados pelo estudo UNILIFE-M fornecem um panorama alarmante sobre a saúde mental dos universitários brasileiros, com destaque para a alta prevalência de sintomas depressivos em diferentes níveis de gravidade. Essa realidade deve servir como ponto de partida para a formulação de estratégias de intervenção mais eficazes, culturalmente sensíveis e sustentáveis. Estudos futuros, com abordagem longitudinal e qualitativa, serão essenciais para aprofundar a compreensão sobre os determinantes da saúde mental estudantil e avaliar o impacto das intervenções institucionais ao longo da formação acadêmica.

Referências

ALMEIDA, A. D. et al. **Prevalência de sintomas depressivos entre universitários brasileiros: uma revisão integrativa.** Revista Brasileira de Educação Médica, v. 44, n. 1, p. e016, 2020. <https://doi.org/10.1590/1981-5271v44.1-20190252>

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5-TR.** 5. ed. rev. Porto Alegre: Artmed, 2023.

BREMMER, J. D.; BOSCH, R. J.; VAN DER KNAAP, L. J. **The neurobiology of depression.** In: FAVA, M.; CASSANO, P. (ed.). The Massachusetts General Hospital Guide to Depression. New York: Humana Press, 2017. p. 45-62.

GUSMÃO, E. S.; GOUVEIA, V. V.; ALVES, J. S. **Saúde mental de estudantes universitários no Brasil: uma revisão integrativa.** Psicologia: Teoria e Pesquisa, Brasília, DF, v. 38, p. e38312, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ptp/a/gzdvVwT5y3gWdJzWz6yB7Xb/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

IBRAHIM, A. K. et al. **A systematic review of studies of depression prevalence in university students.** Journal of Psychiatric Research, v. 47, n. 3, p. 391-400, mar. 2013.

KROENKE, K.; SPITZER, R. L.; WILLIAMS, J. B. **The PHQ-9: validity of a brief depression severity measure.** Journal of General Internal Medicine, v. 16, n. 9, p. 606-613, set. 2001.

LIU, Q. et al. **Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study.** Journal of Affective Disorders, v. 263, p. 341-351, mar. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Depression.** Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 26 jul. 2025.

PACHECO, J. P. et al. **Prevalence of depressive symptoms among medical students in Brazil: a systematic review and meta-analysis.** Revista Brasileira de Psiquiatria, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 369-378, out./dez. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbp/a/FsKx7VwgRVSvwS638BqhbmK/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

SANTOS, H. G. et al. **Prevalência de sintomas depressivos em estudantes de uma universidade pública do sudeste brasileiro.** Jornal Brasileiro de Psiquiatria, v. 66, n. 2, p. 108-115, 2017. <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000150>

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. **Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis.** American Journal of Psychiatry, v. 157, n. 10, p. 1552-1562, out. 2000. Disponível em: <https://psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>. Acesso em: 26 jul. 2025.

VASCONCELOS, D. P. et al. **Saúde mental de estudantes universitários: um estudo multicêntrico nacional.** Cadernos de Saúde Pública, v. 37, n. 5, p. e00205820, 2021. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00205820>

Anexos

Tabela 1 – Prevalência (%) de sintomas depressivos por macrorregião

Tabela 2 – Caracterização sociodemográfica por macrorregião

CÓDIGO: SB0060

AUTOR: DANIEL SILVA E CASTRO

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Atividade Antibacteriana e citotoxicidade do peptídeo análogo P-1K3R

Resumo

A crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais tem impulsionado a busca por novas moléculas bioativas, especialmente aquelas derivadas de fontes naturais. Neste estudo, foi avaliada a atividade antibacteriana e a citocompatibilidade do peptídeo análogo P-1K3R derivado do peptídeo nativo TsAP-2, presente na glândula de peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada contra *Staphylococcus aureus* por meio do método de microdiluição em caldo, enquanto a viabilidade celular foi avaliada em fibroblastos murinos (L929) pelo ensaio de MTT. Os resultados revelaram que o P-1K3R apresentou CIM de 4,68 μM , sendo mais eficiente que o peptídeo nativo. Além disso, o peptídeo análogo manteve mais de 80% de viabilidade celular na concentração de 8 μM , indicando baixa toxicidade. Esses dados indicam que a modificação estrutural potencializou a atividade antimicrobiana sem comprometer a segurança celular, reforçando o potencial do P-1K3R como candidato promissor ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, *Staphylococcus aureus*, escorpião, citotóxico

TITLE: Antibacterial activity and cytotoxicity of the P-1K3R analog peptide

Abstract

The increasing resistance of bacteria to conventional antimicrobials has driven the search for novel bioactive molecules, particularly those derived from natural sources. In this study, we evaluated the antimicrobial activity and cytocompatibility of the TsAP-2 peptide, isolated from the venom of the scorpion *Tityus stigmurus*, and its synthetic modified variant, TsAP-2 1K3R. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined against *Staphylococcus aureus* using the broth microdilution method, while cell viability was assessed in murine fibroblasts (L929) via the MTT assay. Results showed that TsAP-2 1K3R exhibited an MIC of 4.68 μM , making it approximately four times more potent than the native peptide. Furthermore, it maintained over 80% cell viability at 8 μM , indicating low cytotoxicity. These findings suggest that the structural modification enhanced antimicrobial activity without compromising cell safety, reinforcing the potential of TsAP-2 1K3R as a promising candidate for the development of new therapeutic agents.

Keywords: antimicrobial peptides, *Staphylococcus aureus*, TsAP-2, bacterial

Introdução

Os escorpiões são invertebrados pertencentes ao filo *Arthropoda*, subfilo *Chelicerata*, classe *Arachnida* e ordem *Scorpiones*, amplamente distribuídos em diferentes regiões do planeta (GOLDONI et al., 2025). Esses animais demonstram elevada capacidade de adaptação ecológica, sendo encontrados em diversos habitats naturais como florestas tropicais, cavernas e desertos e, cada vez mais, em áreas urbanizadas, como vilarejos, cidades de médio porte e grandes centros urbanos. Entre as espécies mais comuns no Brasil, destaca-se o *Tityus stigmurus*, amplamente distribuído na região Nordeste, com ocorrência nos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Maranhão (Guerra-Duarte et al., 2023). A relevância dessa espécie não se limita ao risco de acidentes escorpiônicos, sua peçonha vem despertando interesse científico crescente devido à presença de compostos bioativos com potencial terapêutico, especialmente os peptídeos sem pontes dissulfeto (PSPDs) (Silva, 2020).

Dentre os compostos promissores presentes nas secreções animais, destacam-se os peptídeos por suas múltiplas funções biológicas. Encontrados na peçonha de escorpiões e em seus análogos sintéticos, esses peptídeos exibem atividades inseticidas, antivirais e antimicrobianas. Seu mecanismo de ação está, em geral, relacionado à capacidade de desestabilizar membranas biológicas, comprometendo a integridade celular e provocando lise (Silva, 2020).

A crescente resistência microbiana aos fármacos convencionais tem agravado a crise sanitária global, marcada por elevadas taxas de morbimortalidade associadas a patógenos infecciosos. Diante desse cenário desafiador, a busca por compostos bioativos inovadores em fontes naturais como plantas, microrganismos e peçonhas animais tem se destacado na pesquisa científica (WISE et al., 2024)

Nesse contexto, os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) são componentes bioativos multifuncionais ubíquos com elevado potencial terapêutico. O TsAP-2, um peptídeo catiônico sem pontes dissulfeto com 17 resíduos de aminoácidos presente na glândula de peçonha das espécies *Tityus stigmurus* e *Tityus serrulatus* tem revelado relevante atividade antimicrobiana e hemolítica in vitro (SILVA, 2020; GUO et al., 2013).

Visando potencializar a ação antibacteriana em concentrações não tóxicas, o peptídeo análogo do TsAP-2 foi obtido, denominado P-1K3R, a partir de substituições pontuais de resíduos de aminoácidos neutros por componentes catiônicos (lisina e arginina) em sua sequência primária, sendo investigada sua ação sobre *Staphylococcus aureus* e sua toxicidade em fibroblastos murinos in vitro. A investigação aprofundada desse composto é estratégica, uma vez que as suas propriedades farmacológicas podem pavimentar o caminho para o desenvolvimento racional de novos fármacos, especialmente no tratamento de infecções resistentes (Silva, 2020).

Metodologia

A concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo P-1K3R foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Utilizou-se a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), cultivada em caldo Mueller-Hinton até a fase logarítmica de crescimento. O inóculo bacteriano foi padronizado para 1×10^6 UFC/mL e exposto a concentrações do peptídeo (1,17 a 75 μ M) em placas de microtitulação de 96 poços. Após incubação a 37 °C por 24 horas, a CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, mensurada por espectrofotometria a 595 nm.

A avaliação da citotoxicidade do P-1K3R foi realizada em células de fibroblastos murinos não neoplásicas (linhagem L929, ATCC® CCL-1) utilizando o ensaio de redução do MTT. As células foram semeadas em placas de 96 poços (5 $\times$ 10³ células/poço) e mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Após adesão celular, diferentes concentrações do peptídeo foram adicionadas e incubadas por 24 horas nas condições descritas anteriormente. Após a incubação o meio foi substituído por 100 μ L de MTT (1 mg/mL), seguido de incubação por 4 horas para formação dos cristais de formazan, que foram solubilizados com 100 μ L de álcool etílico 99,8%. A absorbância foi mensurada a 570 nm. Os dados foram expressos como o percentual de redução do MTT, comparando com os poços contendo células em meio de cultivo na ausência do peptídeo. A inibição da redução do MTT superior a 20% foi considerada como indicativa de citotoxicidade.

Resultados e Discussões

O peptídeo P-1K3R revelou elevada ação antibacteriana sobre o *S. aureus*, com CIM de 4,68 μ M, sendo cerca de quatro vezes mais potente do que o peptídeo nativo (CIM de 20 μ M para a mesma cepa). Essa diferença de atividade sugere que a substituição pontual de aminoácido (lisina e arginina) contribuiu positivamente para o aumento da eficácia antimicrobiana da molécula. Acredita-se que essa modificação tenha intensificado as interações eletrostáticas com a membrana bacteriana, favorecendo a permeabilização celular e, conseqüentemente, a morte bacteriana.

Em relação a citocompatibilidade, o peptídeo análogo na concentração de 8 μ M, acima de sua CIM, manteve mais de 80% da viabilidade celular em fibroblastos murinos. Esse dado indica a baixa citotoxicidade em concentrações que o peptídeo apresenta ação antimicrobiana e, portanto, maior seletividade para células bacterianas, o que representa um avanço relevante para aplicações terapêuticas, visto que a toxicidade em células de mamíferos é um dos grandes limitantes no uso de peptídeos antimicrobianos (SILVA, 2020).

Portanto, os dados indicam que a modificação estrutural realizada na variante P-1K3R aumentou sua atividade antibacteriana, com elevada ação inibitória sobre o *S. aureus* em concentrações não citotóxicas, tornando-a uma candidata promissora ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A maior eficácia aliada à baixa

toxicidade corrobora a importância de modificações direcionadas na estrutura primária de peptídeos antimicrobianos como estratégia de otimização da atividade antimicrobiana. Esses resultados reforçam o potencial da engenharia de peptídeos como ferramenta para contornar os desafios impostos pela resistência bacteriana atual (SILVA, 2020; GUO et al., 2013).

Conclusão

Neste estudo, foi demonstrado que a modificação estrutural do peptídeo antimicrobiano P- 1K3R resultou em um ganho expressivo de eficácia contra *Staphylococcus aureus* quando comparado com o peptídeo nativo, acompanhado de um perfil citotóxico favorável em células de mamíferos. P- 1K3R. Os achados obtidos indicam a viabilidade do design racional de peptídeos como estratégia promissora na busca por agentes antimicrobianos inovadores, especialmente frente ao crescente desafio da resistência bacteriana. A atuação eficiente do P-1K3R, associada à sua segurança celular, posiciona-o como um candidato promissor para futuras aplicações farmacêuticas, tanto no combate a infecções resistentes quanto como modelo estrutural para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Assim, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre peptídeos derivados de peçonhas animais e sua aplicabilidade terapêutica em um contexto clínico emergente e desafiador.

Referências

GOLDONI, Paulo A. M. et al. First epidemiological reports of scorpion stings by *Tityus confluens* Borelli, 1899 (Scorpiones: Buthidae) in southern Brazil: an upcoming medically important species in Paraná. *Toxicon*, [S.l.], v. 264, p. 108468, set. 2025. Elsevier. DOI: 10.1016/j.toxicon.2025.108468

GUERRA-DUARTE, Clara et al. Scorpion envenomation in Brazil: Current scenario and perspectives for containing an increasing health problem. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 17, n. 2, p. e0011069, 2023.

GUO, Xiaoxiao et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie, Paris*, v. 95, p. 1784–1794, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.003>.

SILVA, André Luiz da. Structural evaluation and biological activities of peptides derived from scorpion toxins. 2020. 158 f. Thesis (PhD in Biotechnology) – Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

WISE, Mark G. et al. Global trends in carbapenem- and difficult-to-treat-resistance among World Health Organization priority bacterial pathogens: ATLAS surveillance program 2018–2022. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 37, p. 168–175, jun. 2024. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.04.007>.

CÓDIGO: SB0063

AUTOR: JONAS GALILEU FERREIRA DE AQUINO

COAUTOR: MARIA KAROLAYNNE DA SILVA

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: Perfil imunoinformático dos epítomos VP1/VP2 do parvovírus B19: relevância para a segurança da transfusão cirúrgica - Carta de pesquisa

Resumo

O parvovírus B19 humano (B19V) é um patógeno de DNA de fita simples associado a diversas doenças hematológicas, com risco aumentado para gestantes, imunocomprometidos e receptores de transfusões. Sua resistência a métodos convencionais de inativação em hemocomponentes reforça a necessidade de uma vacina eficaz. Este estudo empregou ferramentas de imunoinformática para identificar epítomos conservados e imunogênicos das proteínas de capsídeo VP1 e VP2, alvos chave para neutralização viral. Foram selecionados cinco epítomos de MHC classe I e sete de MHC classe II, todos não tóxicos, não alergênicos e altamente conservados entre cepas, com potencial para induzir respostas celulares e humorais robustas. A análise previu capacidade de indução de citocinas pró-inflamatórias e perfil Th2 favorável à produção de anticorpos. Os resultados indicam forte potencial para o desenvolvimento de uma vacina multiepítomo contra o B19V, contribuindo para a prevenção de doenças e promoção do bem-estar.

Palavras-chave: Parvovírus B19. VP1. VP2. Vacina baseada em epítomos. Imunoinformática

TITLE: Immunoinformatic Profiling of Parvovirus B19 VP1/VP2 Epitopes: Relevance to Surgical Transfusion Safety-Research Letter

Abstract

Human parvovirus B19 (B19V) is a single-stranded DNA pathogen associated with various hematological diseases, posing increased risk to pregnant women, immunocompromised individuals, and transfusion recipients. Its resistance to conventional pathogen inactivation methods in blood components reinforces the need for an effective vaccine. This study employed immunoinformatics tools to identify conserved and immunogenic epitopes from the VP1 and VP2 capsid proteins, key targets for viral neutralization. Five MHC class I and seven MHC class II epitopes were selected, all non-toxic, non-allergenic, and highly conserved across strains, with the potential to induce robust cellular and humoral immune responses. The analysis predicted the ability to induce pro-inflammatory cytokines and a Th2 profile favorable to antibody production. The results indicate strong potential for the development of a multi-epitope vaccine against B19V, contributing to disease prevention and the promotion of well-being.

Keywords: Parvovirus B19. VP1. VP2. Epitope-based vaccine. Immunoinformatics.

Introdução

O parvovírus B19 humano (B19V) é um pequeno vírus não envelopado, de DNA fita simples, pertencente à família Parvoviridae, gênero Erythroparvovirus (QIU; SÖDERLUND-VENERMO; YOUNG, 2016). Com genoma de aproximadamente 5,6 kb, codifica três proteínas principais: NS1 (não estrutural), VP1 e VP2 (estruturais) (QIU; SÖDERLUND-VENERMO; YOUNG, 2016). O capsídeo viral, formado predominantemente por VP2 e uma fração menor de VP1, é fundamental para a entrada do vírus e evasão da resposta imune (YOUNG; BROWN, 2004). O B19V apresenta tropismo específico por células progenitoras eritroides na medula óssea, podendo causar doenças como eritema infeccioso, crise aplásica transitória, anemia persistente em pacientes imunocomprometidos, hidropisia fetal e complicações graves (SERVEY; REAMY; HODGE, 2007).

A transmissão por transfusão sanguínea e derivados é um desafio relevante para a saúde pública, já que o B19V resiste a métodos convencionais de inativação de patógenos, como tratamentos com solvente/detergente e aquecimento (MARANO et al., 2015). Essa resistência decorre de sua estrutura não envelopada e tamanho reduzido, que lhe conferem elevada estabilidade físico-química (BONVICINI et al., 2006; HATTORI et al., 2007). Assim, receptores de transfusões, gestantes e imunossuprimidos estão entre os grupos de maior risco, reforçando a necessidade de estratégias preventivas eficazes, incluindo o desenvolvimento de vacinas (MARANO et al., 2015).

Entre as proteínas estruturais, a VP1 se destaca como principal determinante antigênico, contendo a região exclusiva VP1u, essencial para a ligação celular e endocitose mediada por receptor (LEISI; DI TOMMASO; KEMPF; ROS, 2016). Essa região interage com o receptor P-antígeno (globosídeo) nas células-alvo, sendo crítica para a infectividade viral (YOUNG; BROWN, 2004). Já a VP2, embora carente de atividade enzimática, estabiliza o capsídeo e participa da encapsulação do genoma (YOUNG; BROWN, 2004). Ambas as proteínas contribuem para a evasão imune, permitindo que o vírus persista por longos períodos no hospedeiro (ENDERS et al., 2006).

A alta conservação das proteínas do capsídeo, associada à ocorrência de reinfecções e persistência crônica, indica que a imunidade natural nem sempre é protetora (KERR, 2016). Enquanto a proteína NS1, por sua localização intracelular e potencial pró-inflamatório, não é ideal como alvo vacinal, as proteínas VP1 e VP2, por serem expostas na superfície viral e induzirem respostas neutralizantes, são candidatas preferenciais para o desenho de vacinas (ZAKRZEWSKA et al., 2023).

Considerando a ausência de vacina aprovada contra o B19V, este estudo empregou ferramentas de imunoinformática para identificar epítomos conservados e imunogênicos das proteínas VP1 e VP2. Foram analisadas sequências conservadas, potenciais de ligação a MHC de classes I e II, antigenicidade, toxicidade e alergenicidade, priorizando epítomos com maior probabilidade de induzir respostas imunes robustas e seguras. O objetivo é fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma vacina multi-epítopo, capaz de prevenir infecções e reduzir os riscos associados à transmissão do B19V, especialmente em populações vulneráveis (DA SILVA et al., 2023a; DA SILVA et al., 2023b).

Metodologia

As sequências completas das proteínas VP1 e VP2 do Parvovirus B19 foram obtidas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (SAYERS et al., 2021) (VP1: YP_004928146.1; VP2: YP_004928148.1). Essas proteínas foram selecionadas por sua alta conservação entre cepas virais e por estarem diretamente associadas à indução de respostas imunológicas protetoras, sendo, portanto, alvos promissores para o desenho de vacinas multi-epítomos (MORITA et al., 2001; LEISI et al., 2016).

A identificação de epítomos restritos ao MHC classe I foi realizada utilizando a ferramenta MHCI Binding Prediction do Immune Epitope Database (IEDB) (VITA et al., 2019), priorizando alelos HLA de ampla distribuição em diferentes populações humanas para maximizar a cobertura imunológica (FRONTIERS, 2023). Os epítomos previstos foram avaliados quanto à antigenicidade (NIELSEN et al., 2003), imunogenicidade (PIP-EL, considerando potencial de ativação de linfócitos T CD8+) (FRONTIERS, 2018), toxicidade (TOXINPRED) (GUPTA et al., 2015) e alergenicidade (AllerTOP v2.0) (DIMITROV et al., 2014). Para reduzir falsos positivos, adotou-se uma abordagem de consenso, retraindo apenas epítomos com desempenho consistente em pelo menos duas plataformas independentes. A conservação das sequências foi verificada no IEDB Epitope Conservancy Tool (BUI et al., 2007), sendo incluídos somente aqueles com 100% de identidade em todas as cepas analisadas.

Para epítomos MHC classe II, foi empregada a ferramenta MHCII Binding Prediction do IEDB (WANG et al., 2010), seguida de análises de antigenicidade (NIELSEN et al., 2003), conservação (BUI et al., 2007), toxicidade (GUPTA et al., 2015) e alergenicidade (DIMITROV et al., 2014), utilizando os mesmos critérios de exclusão aplicados ao MHC classe I. A previsão de indução de citocinas IL-4 (IL4Pred) (DHANDA et al., 2013) e IL-10 (IL10Pred) (NAGPAL et al., 2017) foi incorporada para estimar a polarização da resposta imune, favorecendo epítomos capazes de induzir respostas Th2 (essenciais para produção de anticorpos) e excluindo aqueles com potencial supressor via IL-10.

Apesar de a análise computacional não ter identificado epítomos MHCII com imunogenicidade preditiva elevada, eles foram mantidos no escopo do estudo devido à importância da resposta mediada por linfócitos T CD4+ no suporte à imunidade humoral (YOUNG; BROWN, 2004). Adicionalmente, reconhecendo o papel da imunidade inata na modulação da eficácia vacinal, o estudo considerou a possibilidade de adjuvantes que estimulem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os Toll-like receptors (TLRs), potencializando a ativação inicial do sistema imune (WANG, 2024; SARESELLA et al., 2022).

A estratégia metodológica teve como foco a seleção de epítomos não tóxicos, não alergênicos, altamente conservados e com forte potencial de induzir respostas imunológicas amplas e duradouras. Todos os candidatos selecionados estão previstos para validação experimental em etapas subsequentes, incluindo ensaios in vitro de ligação a moléculas HLA, testes de ativação de linfócitos T e análises de perfil de citocinas, bem como experimentos in vivo para confirmar sua capacidade protetora (DA SILVA et al., 2023a; DA SILVA et al., 2023b). Essa integração entre predição in silico e validação experimental visa reduzir o tempo e os custos associados ao desenvolvimento de vacinas, sem comprometer a segurança e a eficácia.

Resultados e Discussões

A análise das proteínas VP1 e VP2 do Parvovirus B19 permitiu identificar um conjunto de epítomos com alto grau de conservação, ausência de toxicidade e alergenicidade e expressivo potencial imunogênico, reforçando sua aplicabilidade no desenvolvimento de uma vacina baseada em múltiplos epítomos. Apesar de a proteína VP2 representar aproximadamente 95% da composição do capsídeo viral, a região única da VP1 (VP1u) concentrou a maior parte dos epítomos com relevância imunológica, o que corrobora observações anteriores de que essa região, embora inicialmente interna na estrutura viral, se expõe durante o processo de entrada na célula hospedeira, favorecendo o reconhecimento imunológico e desencadeando respostas neutralizantes eficazes (ROS; BIERI; LEISI, 2020; ARVIA et al., 2024). Essa característica a torna um alvo prioritário na formulação vacinal, especialmente em indivíduos cuja ausência de resposta contra a VP1u está associada à viremia persistente e à falha no controle da infecção (ARVIA et al., 2024).

Entre os epítomos de MHC classe I identificados, cinco se destacaram pela ampla cobertura em diferentes alelos HLA e pelo potencial de indução de respostas pró-inflamatórias essenciais para a ativação de linfócitos T CD8+, promovendo a eliminação de células infectadas. Quatro deles são compartilhados entre VP1 e VP2, enquanto um é exclusivo da VP1 e localizado na VP1u. O epítopo VYQQFVEF (HLA-A24:02), exclusivo de VP1u, apresentou o maior índice de antigenicidade (0,760) e conservação total entre as cepas analisadas, configurando-se como candidato central na indução de respostas citotóxicas robustas. Outros epítomos, como SQNTRISL (HLA-B08:01; antigenicidade: 0,618), HAAGHLPY (HLA-B35:01; antigenicidade: 0,461), AKSRVHPL (HLA-B08:01; antigenicidade: 0,430) e ASEESAFY (HLA-A01:01; antigenicidade: 0,634), também demonstraram propriedades relevantes, incluindo estabilidade estrutural e alta previsibilidade de ativação de células T.

No contexto dos epítomos MHC classe II, sete sequências foram selecionadas, sendo três exclusivas da VP1 e quatro compartilhadas com a VP2, predominando na região VP1u. Dentre eles, VKDYFTLKGAAAPVA (HLA-DRB101:01; antigenicidade: 0,9912) e QVVKDYFTLKGAAAP (HLA-DRB101:01; antigenicidade: 0,9792) mostraram-se altamente promissores pela capacidade de induzir respostas do tipo Th2, fundamentais para a produção de anticorpos neutralizantes. Outros epítomos como KEQLKQLQGLNMHTY, MHTYFPNKGTTQQYTD e NMHTYFPNKGTTQQYT, igualmente conservados, apresentaram potencial de indução de IL-4, sugerindo uma polarização imune favorável à imunidade humoral. A ausência de predição de indução de IL-10 na maioria das sequências selecionadas reduz a probabilidade de supressão imunológica, fator crítico para a eficácia vacinal de longo prazo.

Os resultados obtidos destacam a importância da diversidade de alelos HLA contemplada pelos epítomos selecionados. A análise de distribuição global de alelos de MHC demonstra que as frequências de HLA variam significativamente entre diferentes regiões geográficas, e a presença de epítomos capazes de se ligar a múltiplas variantes confere à formulação vacinal um caráter universal, minimizando lacunas de cobertura populacional (FRONTIERS, 2023; BANJOKO et al., 2024). Essa abordagem é especialmente relevante em contextos de saúde pública global, onde a heterogeneidade genética pode influenciar diretamente a eficácia de programas de imunização.

Além da aplicação direta em vacinas, os epítomos identificados apresentam potencial para usos diagnósticos e terapêuticos. Partículas semelhantes a vírus (VLPs) que incorporem essas sequências podem ser exploradas como plataformas de alta sensibilidade para testes

sorológicos, capazes de detectar anticorpos específicos contra o Parvovirus B19 com precisão aumentada (SÁNCHEZ-MOGUEL; MONTIEL; BUSTOS-JAIMES, 2023). Em imunoterapia, esses epítopos podem ser utilizados para reforçar respostas imunes em pacientes imunocomprometidos, ou ainda como vetores para entrega direcionada de fármacos a células progenitoras eritroides, aproveitando o tropismo natural do vírus (ROS; BIERI; LEISI, 2020).

No entanto, é necessário considerar a possibilidade de mutações em regiões de escape imune, como T372S e Q422L, observadas em pacientes imunodeprimidos e capazes de alterar a conformação antigênica de VP1/VP2, reduzindo a afinidade de ligação a anticorpos neutralizantes (RUSSCHER et al., 2024). Esses achados indicam a importância de um sistema de vigilância genômica contínua para monitorar a evolução do vírus e, se necessário, atualizar periodicamente a formulação vacinal, em um modelo semelhante ao utilizado para vacinas contra influenza sazonal (BEERAKA et al., 2022).

As perspectivas futuras incluem a exploração de novas plataformas tecnológicas para potencializar a imunogenicidade dos epítopos selecionados. Vacinas de mRNA autoamplificantes (saRNA) e nanopartículas proteicas representam alternativas promissoras, pois permitem maior expressão antigênica e prolongamento da resposta imune (OMIDI et al., 2024). Ensaios pré-clínicos já demonstraram que nanopartículas contendo epítopos da VP1 são capazes de induzir respostas neutralizantes superiores às obtidas com formulações convencionais (KIMURA et al., 2025). Além disso, modificações estruturais como a inativação da atividade da fosfolipase A2 (PLA2) na VP1u, descritas em estudos clínicos, reduziram reações adversas cutâneas sem comprometer a imunogenicidade (BERNSTEIN et al., 2011; NOVEL SURROGATE NEUTRALIZING ASSAY, 2021), representando um avanço relevante na segurança das formulações.

Os achados apresentados neste estudo indicam que a utilização combinada de epítopos derivados de VP1 e VP2, com ênfase na VP1u, constitui uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas capazes de induzir respostas imunes robustas, tanto celulares quanto humorais, com ampla cobertura populacional e baixo risco de efeitos adversos.

Conclusão

Este estudo identificou epítopos altamente conservados, imunogênicos, não tóxicos e não alergênicos derivados das proteínas VP1 e VP2 do Parvovirus B19, com forte potencial para induzir respostas imunes celulares e humorais protetoras. A análise revelou cinco epítopos restritos ao MHC classe I e sete ao MHC classe II, com destaque para aqueles localizados na região única da VP1 (VP1u), reconhecida por seu papel fundamental na neutralização viral e na ativação de mecanismos de defesa mediados por linfócitos T e produção de anticorpos neutralizantes (ROS; BIERI; LEISI, 2020; ARVIA et al., 2024). A ampla cobertura de alelos HLA observada para esses epítopos reforça a aplicabilidade global da formulação vacinal proposta, oferecendo potencial eficácia em diferentes populações e minimizando o risco de escape imunológico decorrente da variabilidade genética do hospedeiro (FRONTIERS, 2023; BANJOKO et al., 2024).

A combinação estratégica de epítopos provenientes de VP1 e VP2, com ênfase nos exclusivos da VP1u, constitui uma base sólida para o desenvolvimento de uma vacina multi-epítopos contra o B19V. Além do uso preventivo, esses alvos moleculares possuem aplicabilidade

translacional para plataformas de diagnóstico, como partículas semelhantes a vírus (VLPs) de alta sensibilidade (SÁNCHEZ-MOGUEL; MONTIEL; BUSTOS-JAIMES, 2023), e para imunoterapias direcionadas a pacientes imunocomprometidos (ROS; BIERI; LEISI, 2020). Apesar do elevado potencial demonstrado nas análises *in silico*, a validação experimental é imprescindível para confirmar a afinidade de ligação aos alelos HLA, a ativação de células T e o perfil de citocinas induzido, bem como para avaliar a eficácia protetora em modelos animais e, futuramente, em ensaios clínicos (DA SILVA et al., 2023a; DA SILVA et al., 2023b).

A integração entre imunoinformática e validação laboratorial representa uma abordagem eficiente e racional, capaz de acelerar o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra o Parvovirus B19. A aplicação dessas estratégias pode gerar impacto significativo na prevenção de complicações associadas à infecção, reduzir a transmissão por transfusões e derivados sanguíneos e oferecer novas ferramentas para o manejo clínico de populações vulneráveis, consolidando um avanço importante na imunoprofilaxia e no controle dessa infecção viral (MARANO et al., 2015; ZAKRZEWSKA et al., 2023).

Referências

1. Qiu, J., Söderlund-Venermo, M. & Young, N. S. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 43–113 (2016).
2. How does parvovirus B19 DNA achieve lifelong persistence in human cells? CoLab <https://colab.ws/articles/10.2217%2Ffv1-2017-0079>.
3. Servey, J. T., Reamy, B. V. & Hodge, J. Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am. Fam. Physician* 75, 373–376 (2007).
4. Marano, G. et al. Human Parvovirus B19 and blood product safety: a tale of twenty years of improvements. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* 13, 184–196 (2015).
5. Bonvicini, F. et al. Prevention of iatrogenic transmission of B19 infection: different approaches to detect, remove or inactivate virus contamination. *Clin. Lab.* 52, 263–268 (2006).
6. Hattori, S. et al. Variability of parvovirus B19 to inactivation by liquid heating in plasma products. *Vox Sang.* 92, 121–124 (2007).
7. Chaput, C. C. The establishment of an infectivity assay for human parvovirus B19 to investigate the efficacy of protocols for the inactivation of pathogens from plasma products. (The Open University, 2005).
8. UniProt. UniProt <https://www.uniprot.org/uniprotkb/B3U154/entry>.
9. Young, N. S. & Brown, K. E. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med.* 350, 586–597 (2004).
10. Enders, M. et al. Human parvovirus B19 infection during pregnancy--value of modern molecular and serological diagnostics. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 35, 400–406 (2006).

11. Juhl, D. & Hennig, H. Parvovirus B19: What Is the Relevance in Transfusion Medicine? *Front. Med.* 5, 4 (2018).
12. Kerr, J. R. The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of autoimmunity and autoimmune disease. *J. Clin. Pathol.* 69, 279–291 (2016).
13. da Silva, M. K. et al. Advances of Reverse Vaccinology for mRNA Vaccine Design against SARS-CoV-2: A Review of Methods and Tools. *Viruses* 15, 2130 (2023).
14. da Silva, M. K. et al. Computational vaccinology guided design of multi-epitope subunit vaccine against a neglected arbovirus of the Americas. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 41, 3321–3338 (2023).
15. Identification of promiscuous T cell epitopes on Mayaro virus structural proteins using immunoinformatics, molecular modeling, and QM:MM approaches - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33781966/>.
16. Sayers, E. W. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 50, D20–D26 (2021).
17. Alves, A. D. R. et al. Incidence and estimated risk of residual transmission of hepatitis a virus and parvovirus B19 by blood transfusion in the state of Rio De Janeiro – Brazil: a retrospective study. *Virol. J.* 22, 15 (2025).
18. Morita, E. et al. Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G(2) phase with accumulation of mitotic cyclins. *J. Virol.* 75, 7555–7563 (2001).
19. Leisi, R., Di Tommaso, C., Kempf, C. & Ros, C. The Receptor-Binding Domain in the VP1u Region of Parvovirus B19. *Viruses* 8, 61 (2016).
20. Vita, R. et al. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 47, D339–D343 (2019).
21. Nielsen, M. et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 12, 1007–1017 (2003).
22. Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R. & Doytchinova, I. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *J. Mol. Model.* 20, 2278 (2014).
23. Gupta, S. et al. Peptide toxicity prediction. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1268, 143–157 (2015).
24. Bui, H.-H., Sidney, J., Li, W., Fusseder, N. & Sette, A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics* 8, 361 (2007).
25. Frontiers | PIP-EL: A New Ensemble Learning Method for Improved Proinflammatory Peptide Predictions.
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01783/full>.
26. Wang, P. et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 11, 568 (2010).

27. The interaction of innate immune and adaptive immune system - Wang - 2024 - MedComm - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.714>.
28. Saresella, M. et al. Innate immune responses to three doses of the BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine. *Front. Immunol.* 13, (2022).
29. Dhanda, S. K., Gupta, S., Vir, P. & Raghava, G. P. S. Prediction of IL4 inducing peptides. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 263952 (2013).
30. Nagpal, G. et al. Computer-aided designing of immunosuppressive peptides based on IL-10 inducing potential. *Sci. Rep.* 7, 42851 (2017).
31. Frontiers | An HLA map of the world: A comparison of HLA frequencies in 200 worldwide populations reveals diverse patterns for class I and class II. <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2023.866407/full>.
32. Banjoko, A. W. et al. High Resolution Class I HLA -A, -B, and -C Diversity in Eastern and Southern African Populations. 2024.09.04.611164 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.09.04.611164> (2024).
33. Kimura, S. et al. Efficient Neutralizing Antibodies Induction by Human Parvovirus B19 Epitope-Presenting Protein Nanoparticles. *Microbiol. Immunol.* 69, 35–42 (2025).
34. Recombinant Virus-like Particles of Human Parvovirus B19 with the Internal Location of VP1 Unique Region Produced by *Hansenula polymorpha*. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/11/2410>.
35. Mohammed, N. O., Abd-elrahman, K. A. & Almofti, Y. A. Multi Epitope Peptide Vaccine against Human Parvovirus B19 Using Immuno-Informatics Approaches. *Am. J. Microbiol. Res.* 6, 140–164 (2018).
36. Omid, Y., Pourseif, Mohammad M, Ansari, Rais A & Barar, J. Design and development of mRNA and self-amplifying mRNA vaccine nanoformulations. *Nanomed.* 19, 2699–2725 (2024).
37. Kimura, S. et al. Efficient Neutralizing Antibodies Induction by Human Parvovirus B19 Epitope-Presenting Protein Nanoparticles. *Microbiol. Immunol.* 69, 35–42 (2025).
38. Sánchez-Moguel, I., Montiel, C. & Bustos-Jaimes, I. Therapeutic Potential of Engineered Virus-like Particles of Parvovirus B19. *Pathogens* 12, 1007 (2023).
39. Ros, C., Bieri, J. & Leisi, R. The VP1u of Human Parvovirus B19: A Multifunctional Capsid Protein with Biotechnological Applications. *Viruses* 12, 1463 (2020).
40. Russcher, A. et al. Intra-host evolution during relapsing parvovirus B19 infection in immunocompromised patients. 2024.10.04.24314882 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.10.04.24314882> (2024).
41. Beeraka, N. M., Sukocheva, O. A., Lukina, E., Liu, J. & Fan, R. Development of antibody resistance in emerging mutant strains of SARS CoV-2: Impediment for COVID-19 vaccines. *Rev. Med. Virol.* 32, e2346 (2022).

42. Zakrzewska, K., Arvia, R., Bua, G., Margheri, F. & Gallinella, G. Parvovirus B19: Insights and implication for pathogenesis, prevention and therapy. *Asp. Mol. Med.* 1, 100007 (2023).
43. Ros, C., Bieri, J. & Leisi, R. The VP1u of Human Parvovirus B19: A Multifunctional Capsid Protein with Biotechnological Applications. *Viruses* 12, 1463 (2020).
44. Arvia, R.; Stincarelli, M.A.; Manaresi, E.; Gallinella, G.; Zakrzewska, K. Parvovirus B19 in Rheumatic Diseases. *Microorganisms* 2024, 12, 1708.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12081708>.
45. Penkert, R. R. et al. Saccharomyces cerevisiae-derived virus-like particle parvovirus B19 vaccine elicits binding and neutralizing antibodies in a mouse model for sickle cell disease. *Vaccine* 35, 3615–3620 (2017).
46. Bernstein, D. I. et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* 29, 7357–7363 (2011).
47. Novel Surrogate Neutralizing Assay Supports Parvovirus B19 Vaccine Development for Children with Sickle Cell Disease. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/8/860>.

Anexos

Figura 1: Mapa de agrupamento mostrando a classificação de todos os epítomos candidatos a vacinas com base na toxicidade, antigenicidade, imunogenicidade e potencial de indução de IL-4/IL-10.

Figura 2: Análise do epítomo MHC classe I das proteínas do virião do Parvovírus B19.

Figura 3: Epítomos MHC classe II previstos a partir das proteínas do virião do Parvovírus B19.

Figura 4: Estrutura e genoma do parvovírus B19. A imagem mostra a cápside icosaédrica e o genoma ssDNA do parvovírus B19, juntamente com sua organização genômica e expressão das proteínas virais NS1, VP1, VP2. Fonte: www.viralzone.expasy.org - Acessado em

CÓDIGO: SB0064

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: Interactive effects of detritus quality and microclimatic conditions on organic matter decomposition

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 de dinâmica de ciclagem de nutrientes, transformação do carbono e fluxo de matéria (Cebrian and Lartigue, 2004; de Paz, 2018). Uma pequena parte da matéria orgânica produzida pelas plantas terrestres vai servir de alimento para herbívoros, enquanto a maior parte vai se tornar detrito que vai compor o estoque de nutrientes do ecossistema. Esse detrito pode ter origem no próprio ecossistema como também pode ser exportado e importado de ecossistemas vizinhos (Nixon, 1980; Twilley et al. 1986), permitindo uma dinâmica em larga escala de armazenamento e fluxo de matéria através de agentes físicos como o vento e a gravidade. Fatores abióticos como temperatura, clima e umidade assim como fatores bióticos como diversidade de espécies, abundância de decompositores, qualidade do detrito além da diversidade de detrito vão controlar a decomposição do detrito foliar (Trogisch et al., 2016; Makkonen et al., 2012). O que se sabe a respeito da diversidade de detritos é que detritos de diferentes espécies ou constituições químicas (qualidade do detrito), em geral podem interagir de forma não-aditiva para afetar a decomposição, tanto de forma positiva via mecanismos como priming effect ou nutrient transfer onde a matéria lábil vai interagir com a matéria refratária, mudando a taxa de mineralização (Guenet et al., 2010; Liu et al., 2020), ou negativa via ação de compostos inibitórios por compostos secundários como taninos e polifenóis, que agem protegendo as plantas (Hättenschwiler et al., 2005). Essas interações podem ser mais fortes e determinantes que fatores ambientais para a decomposição (Makkonen et al., 2012; García-Palacios et al., 2016). 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 nutrientes e carbono lábil (Stamp, 2003) e detritos foliares vão ter um efeito sinérgico muito positivo para a decomposição (Alencar, 2024), assim como a mistura de frutos e detritos foliares (de Paz, 2018). A fruta é uma estrutura da planta que quando amadurece, compõe o detrito ao cair no chão juntamente com as folhas mortas, essa estrutura tem uma razão estequiométrica baixa e por ser composta por bastante açúcares, ela acaba se tornando uma estrutura potencialmente favorável para a aceleração da decomposição de outros detritos, 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). Atualmente na literatura não se tem muitos estudos que discutem o efeito aditivo de detritos intraespecíficos, onde maior parte dos estudos da área abordam a interação de detritos foliares de diferentes espécies (Porre et al., 2020; Hättenschwiler et al., 2005). Assim, o objetivo deste estudo busca avaliar o efeito da interação entre detritos de frutos e folhas na decomposição de várias espécies e em diferentes concentrações. Nossa hipótese é de que a decomposição dos frutos irá acelerar a decomposição das folhas das mesmas espécies.

Metodologia

O experimento foi realizado no laboratório do Departamento de Ecologia (DECOL) situado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Brasil, e durou quatro meses (Março/2025-Julho/2025). Foram coletados 200g de folhas mortas de cinco espécies de árvores frutíferas, *Mangifera indica* (Manga), *Anacardium occidentale* (Caju), *Psidium guajava* (Goiaba), *Persea americana* (Abacate) e *Annona muricata* (Graviola), coletando

apenas folhas sem danos e que estavam compondo a liteira. As folhas mortas foram colocadas para secar na estufa em 45°C por 1 semana para tirar toda a água restante que pudesse estar compondo as folhas e para evitar o crescimento e a proliferação de possíveis fungos. Depois da secagem, as folhas foram armazenadas em pacotes de papel bem embalados e em um local escuro e seco, para evitar a degradação das folhas. Para simular a decomposição, foram utilizados microcosmos feitos de cilindros de plástico com 15cm de diâmetro e 10cm de altura, com aberturas de 0,5cm para o escoamento da água. Cada microcosmo foi preenchido com uma camada de aproximadamente 3cm de terra coletada do solo da Mata do Saguí - UFRN que foi peneirada e homogeneizada previamente para retirar impurezas que pudessem influenciar na decomposição. Dentro dos microcosmos foi colocado uma rede de náilon acima desta camada de terra para separar as folhas mortas do solo a fim de obter uma maior precisão na mensuração do detrito foliar no fim do experimento já que a rede impede a mistura do detrito com o solo. A abertura da rede de náilon foi de 1mm, essa abertura foi escolhida pois tem maior eficiência na retenção de partículas pequenas de detritos que viessem a ser decompostos enquanto ainda permite a passagem de microrganismos do solo para o detrito, permitindo sua colonização. Para entender o efeito da diversidade intraespecífica na decomposição, foi usado duas categorias de detrito. Apenas detrito foliar de cada espécie (monocultura) e mistura (detrito foliar + detrito de fruto) em três concentrações de detritos de frutos, baixa, média e alta. Os tratamentos de monoculturas consistiam em 3g de detrito foliar para cada microcosmo. O tratamento de mistura baixa continham 3g de detrito foliar e 1g de detrito de fruto, o tratamento de mistura média continham 3g de detrito foliar e 3g de detrito de fruto e o tratamento de mistura alta continham 3g de detrito foliar e 5g de detrito de fruto. Cada espécie tinha 10 réplicas da categoria monocultura e 10 réplicas da categoria mistura para cada concentração de detrito de frutos (baixa, média e alta). O desenho experimental consistiu em 200 microcosmos [4 tratamentos (1 monocultura + 3 misturas para cada espécie) x 5 espécies x 10 réplicas]. Durante esses 4 meses de experimento, cada microcosmo foi irrigado com cerca de 50ml de água filtrada, uma vez por semana com um pulverizador manual, para manter a umidade (Santos e Silva et al., 2012). Após os 4 meses, os detritos dos microcosmos foram retirados com cuidado separando o detrito foliar e detrito dos frutos para armazenar os detritos foliares em sacos de papel e colocados para secar na estufa à 45°C para então serem limpos e pesados. Para cada microcosmos, foi estimado a taxa de decomposição dos detritos foliares como uma porcentagem de perda de massa (% da massa inicial) com a seguinte equação: perda de massa (% da massa inicial) = $(M_i - M_f / M_i) \times 100$ Onde M_i e M_f significa a massa seca (g) inicial e final do detrito foliar do microcosmo.

Resultados e Discussões

O projeto ainda está em andamento, atualmente na etapa de pesagem dos detritos após desmontagem do experimento. O resultado que esperamos obter quando for calculada a taxa de decomposição dos detritos foliares é de que os microcosmos de tratamento mistura alta tenham a maior taxa de decomposição entre os tratamentos, pela presença de maior quantidade de detrito de frutos.

Conclusão

Embora não tenhamos resultados do atual experimento, 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.
- 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.
- 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., Hättenschwiler, 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.

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.

CÓDIGO: SB0072

AUTOR: MICHELLE MOREIRA DE LIMA

ORIENTADOR: RENATA SWANY SOARES DO NASCIMENTO

TÍTULO: A importância do acervo de embriologia para o avanço do conhecimento e ensino na área biomédica.

Resumo

INTRODUÇÃO: As coleções de material embrionário e fetal humano são recursos essenciais para a pesquisa e educação. A digitalização e as tecnologias 3D têm modernizado o estudo da embriologia, permitindo a criação de atlas interativos e a pesquisa de malformações congênitas. Visando fornecer uma visão abrangente sobre a importância fundamental das coleções de fetos e embriões para o ensino e a pesquisa em embriologia. **MÉTODO:** Este trabalho é uma revisão abrangente de literatura, baseada em uma análise crítica de artigos científicos de bases de dados como NCBI e Web of Science, publicados entre 2015 e 2025. Se concentrou em três eixos: a análise das considerações bioéticas, revisão histórica de coleções emblemáticas e a exploração dos avanços tecnológicos, como a digitalização e a imagem 3D. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** As coleções são fundamentais para o ensino da embriologia, permitindo a visualização direta de espécimes reais, o que aumenta a retenção de conhecimento e o raciocínio clínico. A integração com tecnologias como ressonância magnética e micro-CT gera dados valiosos para pesquisa, permitindo a criação de modelos 3D, atlas digitais e a análise de dismorfogêneses. Essas tecnologias contribuem para diagnósticos pré-natais mais precisos e treinamentos cirúrgicos. **CONCLUSÃO:** As coleções do material são pilares insubstituíveis para a ciência e a educação em saúde. A integração de coleções físicas e tecnologias digitais democratiza o acesso ao conhecimento.

Palavras-chave: Embriologia. Acervo biomédico. Ensino. Pesquisa. Bioética.

TITLE: The importance of embryology collections for the advancement of knowledge and teaching in the biomedical field.

Abstract

INTRODUCTION: Collections of human embryonic and fetal material are essential resources for research and education. Digitization and 3D technologies have modernized the study of embryology, enabling the creation of interactive atlases and the research of congenital malformations. The aim is to provide a comprehensive overview of the fundamental importance of fetal and embryo collections for embryology teaching and research. **METHOD:** This work is a comprehensive literature review, based on a critical analysis of scientific articles from databases such as NCBI and Web of Science, published between 2015 and 2025. It focused on three axes: the analysis of bioethical considerations, a historical review of emblematic collections, and the exploration of technological advances, such as digitization and 3D imaging. **RESULTS AND DISCUSSION:** Collections are fundamental to embryology teaching, allowing direct visualization of real specimens, which increases knowledge retention and clinical reasoning. Integration with technologies such as

MRI and micro-CT generates valuable data for research, enabling the creation of 3D models, digital atlases, and the analysis of dysmorphogenesis. These technologies contribute to more accurate prenatal diagnoses and surgical training. CONCLUSION: Material collections are irreplaceable pillars for science and health education. The integration of physical collections and digital technologies democratizes access to knowledge.

Keywords: Embryology. Biomedical collection. Education. Research. Bioethics.

Introdução

As coleções de material embrionário e fetal humano representam um recurso de valor inestimável e indispensável para a compreensão aprofundada do desenvolvimento humano, tanto normal quanto patológico, sendo essenciais para a pesquisa científica e a educação em anatomia e embriologia (Fourniquet et al., 2019; El-Haddad et al., 2022; Moxham et al., 2017). O manejo e o uso contínuo desses acervos envolvem complexas e sensíveis considerações bioéticas, com o consentimento informado sendo um paradigma central em discussão, especialmente no contexto australiano (El-Haddad & Pather, 2024; El-Haddad & Pather, 2025). A própria história da aquisição desses tecidos, como os utilizados na Universidade de Uppsala, destaca a sensibilidade inerente a essas coleções (Franzén, 2021). Legislações específicas, como a Lei de Anatomia Humana de 2018 na Austrália, estabelecem o quadro legal para o uso desses tecidos (Lei de Anatomia Humana de 2018).

Historicamente, coleções como a de Kyoto, conforme atualizada com métodos modernos, e a Coleção Blechschmidt na Universidade de Göttingen, abordada sob uma perspectiva historicamente fundamentada, continuam a ser pilares para o estudo da embriologia (Yamaguchi & Yamada, 2018; Albertine, 2018; Markert, 2020). No século XXI, a digitalização e as técnicas de imagem tridimensional (3D), como a ressonância magnética (RM), transformaram radicalmente o estudo do desenvolvimento humano (de Bakker et al., 2016). Essas tecnologias permitiram a criação de atlas digitais interativos e bancos de dados quantitativos sobre o desenvolvimento humano (de Bakker et al., 2016; Consórcio de Embriologia Digital, 2015), bem como aprimoraram a visualização e o ensino da embriologia (Abdel Meguid et al., 2022). Elas também facilitam pesquisas aprofundadas sobre malformações congênitas, como anomalias do sistema nervoso central, cardíacas, musculares, e o desenvolvimento nasal e pulmonar (Katsube et al., 2017; Kishimoto et al., 2016; Yamaguchi et al., 2017; Mekonen et al., 2016; Rolnik et al., 2019; Tseng, 2023; Goto et al., 2024; Shah et al., 2018). Além disso, a extração de DNA de espécimes preservados abriu novas fronteiras para a pesquisa genética e molecular (Nagai et al., 2016).

Essas coleções, tanto as físicas quanto suas versões digitalizadas, e as tecnologias associadas, são indispensáveis para as aulas práticas e o ensino contemporâneo, oferecendo a oportunidade única de observar diretamente o desenvolvimento humano e suas variações (Moxham et al., 2017; Suponha BW, 2022; O’Rahilly & Müller, 2015). A integração de vídeos (Koscinski et al., 2019), metodologias ativas (Guilherme Guedert et al., 2022) e ambientes de aprendizagem em realidade virtual (Alfalah et al., 2019) aprimora a experiência educacional, tornando o aprendizado da embriologia mais interativo e eficaz na compreensão dos distúrbios congênitos (Abdel Meguid et al., 2022).

O objetivo é apresentar uma visão abrangente e aprofundada sobre a importância fundamental das coleções de fetos e embriões humanos, destacando seu papel insubstituível na pesquisa e no ensino da embriologia. Isso inclui explorar as complexas dimensões éticas que regem sua aquisição e uso, desde os princípios da bioética até os desafios do consentimento informado e

as diretrizes legais. Além disso, o resumo aborda a rica história dessas coleções, mencionando acervos emblemáticos e sua contribuição para o desenvolvimento de atlas e obras de referência essenciais. Por fim, detalha os avanços tecnológicos mais recentes, como a digitalização, a imagem tridimensional e a análise genética, que potencializam o estudo do desenvolvimento humano normal e a compreensão das causas e manifestações dos distúrbios congênitos, aprimorando significativamente a educação e a prática clínica.

Metodologia

O presente trabalho constitui uma revisão abrangente e aprofundada sobre as coleções de material embrionário e fetal humano, focando em suas complexas dimensões éticas, sua rica história e os significativos avanços tecnológicos associados, bem como seu papel insubstituível na pesquisa científica e na educação em anatomia e embriologia. A metodologia adotada fundamentou-se em uma análise e síntese crítica de literatura acadêmica selecionada, visando elucidar a importância fundamental desses acervos e as sensíveis considerações inerentes ao seu manejo e utilização contínua. As fontes de informação para este estudo foram criteriosamente selecionadas a partir de bases de dados como National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Web of Science, utilizando os termos “human fetal and embryological collections”. Foram priorizados artigos publicados entre 2015 e 2025. Os critérios de inclusão abrangeram a disponibilidade integral dos artigos, bem como seu foco na importância das coleções para o ensino e a pesquisa, na conservação do material e no uso em aulas práticas desses fetos e embriões. Ensaio clínico foram excluídos desta revisão.

Uma parte fundamental da metodologia concentrou-se na análise das considerações bioéticas que governam a aquisição e o uso dessas coleções. O consentimento informado emergiu como um paradigma central de discussão, sendo explorado em suas complexidades e sensibilidades, especialmente no contexto australiano, onde legislações específicas, como a Lei de Anatomia Humana de 2018, estabelecem o quadro legal para o uso desses tecidos (El-Haddad & Pather, 2024; El-Haddad & Pather, 2025; Lei de Anatomia Humana de 2018; Daniels et al., 2016; White, 1983). Foram consideradas as discussões sobre macro e microética em coletas fetais e embriológicas, investigando os paradigmas do consentimento informado entre as partes interessadas com foco na educação australiana (El-Haddad & Pather, 2024; Barasa et al., 2015; Truog et al., 2015; Vélez-Agosto et al., 2017; Simpson & McDonald, 2017). A análise estendeu-se aos riscos associados à doação de tecido fetal para mulheres (Vawter et al., 1992). As atitudes de pacientes em relação à doação de produtos da concepção para pesquisa no momento do aborto por aspiração também foram avaliadas (Hazan et al., 2022).

A metodologia incluiu uma imersão na rica história das coleções de embriões e fetos humanos, destacando sua evolução e a contribuição de acervos emblemáticos que continuam a ser pilares para o estudo da embriologia (Yamaguchi & Yamada, 2018; Albertine, 2018; Markert, 2020; Noe, 2004; O’Rahilly & Müller, 1987). Foram examinadas coleções como as da Universidade de Uppsala, cuja história da aquisição de tecidos ressalta a inerente sensibilidade desses materiais (Franzén, 2021). A Coleção de Kyoto, atualizada com métodos modernos e com foco na digitalização de dados clínicos e epidemiológicos, foi analisada por sua contínua relevância para o estudo da embriologia e malformações congênitas (Yamaguchi & Yamada, 2018; Albertine, 2018; Kameda et al., 2012). A Coleção Blechschmidt na

Universidade de Göttingen foi abordada sob uma perspectiva historicamente fundamentada (Markert, 2020; Manner, 2014), e a atuação do Departamento de Embriologia da Instituição Carnegie de Washington foi reconhecida por sua contribuição para a criação de atlas de referência (Brown, 1987; Noe, 2004). A análise histórica visou compreender como esses acervos se tornaram pilares para o estudo do desenvolvimento humano e para a criação de obras essenciais, como os “Estágios de Desenvolvimento em Embriões Humanos” (O’Rahilly & Müller, 1987).

Avanços tecnológicos e suas implicações é um componente crucial da metodologia, sendo a exploração dos avanços tecnológicos mais recentes responsáveis pela revolução do estudo do desenvolvimento humano no século XXI (de Bakker et al., 2016). Tais recursos proporcionaram a criação de atlas digitais interativos e bancos de dados quantitativos sobre o desenvolvimento humano (de Bakker et al., 2016; Consórcio de Embriologia Digital, 2015), bem como aprimoraram a visualização e o ensino da embriologia. Eles também facilitam pesquisas aprofundadas sobre malformações congênitas, incluindo anomalias do sistema nervoso central, cardíacas, musculares, e o desenvolvimento nasal e pulmonar.

A abordagem analítica buscou integrar de forma holística as diversas dimensões — ética, histórica e tecnológica — para construir uma compreensão coesa do valor insubstituível dessas coleções. A análise se deu no sentido de identificar as interconexões e sinergias entre esses elementos. Por exemplo, como as lições históricas sobre a aquisição de tecidos influenciam as diretrizes éticas contemporâneas, ou como os avanços tecnológicos podem não apenas otimizar a pesquisa e o ensino, mas também mitigar algumas preocupações éticas ao permitir o uso de dados digitais sem a necessidade de manuseio direto do material físico. A relevância dessas coleções para as aulas práticas e o ensino contemporâneo foi um eixo central da análise, examinando como elas oferecem a oportunidade única de observar diretamente o desenvolvimento humano e suas variações (Moxham et al., 2017; Suponha BW, 2022; O’Rahilly & Müller, 2015), e como a integração de recursos multimídia e imersivos aprimora significativamente a experiência educacional, tornando o aprendizado da embriologia mais eficaz na compreensão dos distúrbios congênitos.

Em suma, a metodologia empregada consistiu em uma revisão interpretativa e exploratória da literatura pertinente, visando apresentar uma visão abrangente e aprofundada da importância e dos desafios associados às coleções de embriões e fetos humanos. Este processo de síntese permitiu sublinhar o papel indispensável desses recursos não apenas para a pesquisa fundamental na compreensão do desenvolvimento humano normal e patológico, mas também para a elucidação das causas e manifestações dos distúrbios congênitos.

Resultados e Discussões

As coleções de material embrionário e fetal humano representam um pilar fundamental e insubstituível para o avanço da ciência biomédica, para a educação em saúde e para uma reflexão aprofundada sobre as complexas dimensões da bioética. Esses acervos, meticulosamente preservados em diferentes estágios do desenvolvimento intrauterino, oferecem um vasto e precioso repertório de recursos. Eles são essenciais para o ensino da embriologia, impulsionam a investigação detalhada de malformações congênitas, permitem o aprimoramento contínuo de tecnologias de imagem e modelagem, e são cruciais na formação ética e empática dos futuros profissionais da saúde. A relevância dessas coleções transcendem a mera acumulação de dados biológicos, pois são capazes de integrar e

entrelaçar aspectos científicos, históricos, culturais e tecnológicos, ao mesmo tempo em que suscitam debates essenciais sobre o consentimento, a dignidade humana e o papel multifacetado da ciência na sociedade contemporânea (El-Haddad et al., 2022; Matsunaga et al., 2019; Beauchamp & Childress, 2013).

No desafiador panorama acadêmico, o ensino da embriologia é reconhecido por sua inerente complexidade, especialmente devido à dificuldade que os estudantes frequentemente enfrentam para visualizar e compreender tridimensionalmente estruturas que são dinâmicas e estão em constante e rápida transformação ao longo do tempo (Estai, Bunt & Hossain, 2016). Nesse cenário, as coleções embrionárias e fetais em sua forma física assumem um papel pedagógico de importância singular, pois permitem aos alunos a observação direta de cortes anatômicos reais, a percepção das proporções autênticas dos órgãos e tecidos, e a identificação de variações individuais que são impossíveis de captar apenas em diagramas bidimensionais (Meguid et al., 2020).

Estudos pedagógicos robustos têm consistentemente demonstrado que a visualização direta de espécimes reais contribui de forma significativa para uma maior retenção do conhecimento adquirido e para o desenvolvimento de um raciocínio clínico mais aguçado e contextualizado (Vawter et al., 2020). Além disso, essa experiência proporciona aos estudantes uma experiência sensorial rica e multifacetada, que vai muito além da memorização de conceitos, promovendo uma profunda internalização de conceitos complexos e abstratos do desenvolvimento (Matsunaga et al., 2019). Exemplos notáveis dessa abordagem incluem a Universidade de Kyoto, que integra sua coleção histórica com avançadas tecnologias de realidade aumentada, fortalecendo a compreensão dos períodos críticos e vulneráveis do desenvolvimento embrionário (Matsunaga et al., 2019). Outras instituições, como a Universidade de Debre Markos, também investigam a atitude e percepção dos estudantes em relação aos cursos de embriologia, reforçando a necessidade de métodos de ensino eficazes (Gebremariam et al., 2021). A prática de ensino de anatomia, que inclui a embriologia, busca as melhores práticas para otimizar o aprendizado (Petracco, Brizot & Marchianò, 2021).

A profundidade dessas experiências é ainda mais amplificada na formação ética e humanística do estudante, pois o contato direto e respeitoso com corpos humanos preservados exige e cultiva a empatia, o respeito inerente à dignidade humana e um senso aguçado de responsabilidade (Beauchamp & Childress, 2013). Essa interação direta com o material biológico fortalece o vínculo do futuro profissional da saúde com os princípios fundamentais da bioética: a autonomia do indivíduo, a beneficência (agir para o bem do paciente), a não maleficência (evitar o dano) e a justiça na distribuição de recursos e cuidados (Jasper et al., 2021). A discussão sobre a ética na prática clínica cotidiana, ou microética, é fundamental nesse contexto, complementando a macroética que define as prioridades de saúde em níveis mais amplos (Truog, Kesselheim & Joffe, 2012). A empatia, em particular, é um componente crítico na prática médica (Beauchamp & Childress, 2013).

As coleções físicas, quando inteligentemente combinadas com as avançadas tecnologias de digitalização e imagem, geram um volume exponencialmente crescente de dados de valor inestimável para análises morfológicas detalhadas, reconstruções tridimensionais (3D) de alta fidelidade e o desenvolvimento de softwares educacionais interativos e imersivos (De Bakker et al., 2016). Um dos exemplos mais emblemáticos nesse campo é o projeto Virtual Human Embryo, que se baseia na vasta e histórica coleção Carnegie. Essa iniciativa pioneira disponibiliza online cortes histológicos seriados de embriões humanos, permitindo a navegação virtual por diferentes planos anatômicos e a exploração de estruturas em detalhes

sem precedentes (O’Rahilly & Müller, 2010). A instituição Carnegie de Washington, com seu Departamento de Embriologia, é uma referência histórica nesse campo (O’Rahilly & Müller, 2010).

Outros projetos de igual relevância, como o Kyoto Human Embryo Atlas e o Human Embryo Atlas da Uppsala University, democratizam ainda mais o acesso ao conhecimento, possibilitando o acesso remoto a milhares de imagens digitalizadas com uma resolução extraordinariamente alta, expandindo significativamente o alcance e o impacto desses acervos preciosos (Matsunaga et al., 2019; Uppsala University, 2020). Ferramentas de ponta, como a microtomografia computadorizada (micro-CT) e a ressonância magnética (RM) de altíssima resolução (especialmente com campos de 7 Tesla ou superiores), têm sido sistematicamente aplicadas para gerar modelos digitais fidedignos e anatomicamente precisos, que abrem caminho para simulações interativas complexas e até mesmo a impressão em 3D de réplicas de estruturas embrionárias (De Bakker et al., 2016; Matsuda et al., 2019). A digitalização de dados clínicos e epidemiológicos da coleção de Kyoto, por exemplo, tem permitido identificar fatores de risco maternos e malformações embrionárias (Matsunaga et al., 2019). A coleção Blechschmidt, da Universidade de Göttingen, também é abordada sob uma perspectiva historicamente fundamentada (Franzén & Manner, 2017).

Esses recursos tecnológicos avançados são atualmente utilizados em áreas críticas da medicina, como o diagnóstico pré-natal, a cirurgia fetal minimamente invasiva, o aconselhamento genético preciso e a emergente medicina fetal personalizada (Tong et al., 2020). Ao permitir uma compreensão anatômica detalhada das estruturas em formação e suas potenciais anomalias, essas tecnologias contribuem diretamente para a melhoria substancial das intervenções clínicas, visando a diminuição de riscos tanto para a gestante quanto para o feto em desenvolvimento (Petracco, Brizot & Marchianò, 2021). A imagem por ressonância magnética de uma grande coleção de embriões humanos é uma tecnologia chave neste avanço (De Bakker et al., 2016). Um atlas digital tridimensional interativo e um banco de dados quantitativo sobre o desenvolvimento humano representam a vanguarda desses recursos (De Bakker et al., 2016).

A análise comparativa sistemática entre embriões que se desenvolvem normalmente e aqueles que apresentam alterações estruturais é absolutamente essencial para aprofundar o entendimento dos complexos mecanismos subjacentes às dismorfogêneses, ou seja, à formação anormal de estruturas (Franzén & Manner, 2017). Trabalhos de pesquisa recentes, utilizando a coleção histórica de Blechschmidt, têm revelado detalhes inéditos e cruciais sobre a formação do encéfalo, dos arcos faríngeos e do sistema cardiovascular, proporcionando insights que antes eram inalcançáveis (Franzén & Manner, 2017).

As coleções embrionárias permitem um estudo abrangente das causas das anomalias congênitas, que podem variar desde fatores ambientais (conhecidos como teratogênicos) até causas de origem genética, tornando-se, assim, um recurso fundamental em pesquisas sobre síndromes complexas como a de Arnold-Chiari, disrafismos (defeitos de fechamento do tubo neural), holoprosencefalia e diversas alterações da migração celular neural (Tong et al., 2020). Modelos tridimensionais desenvolvidos a partir de cortes seriados de embriões que apresentavam espinha bífida, por exemplo, têm sido empregados com sucesso em treinamentos avançados de ultrassonografia pré-natal e no desenvolvimento de algoritmos sofisticados de inteligência artificial para o reconhecimento automatizado de malformações, acelerando e precisando o diagnóstico (Tong et al., 2020).

Um avanço significativo reside na capacidade de reavaliar espécimes históricos com a aplicação de novas e potentes tecnologias moleculares. Técnicas como a imunohistoquímica, a hibridização *in situ* e o sequenciamento genético de nova geração podem agora fornecer respostas para perguntas que, há poucas décadas, eram consideradas inalcançáveis, revelando a base molecular das anomalias e o potencial para extração de DNA de espécimes preservados (Matsunaga et al., 2019; Tong et al., 2020). A história e os avanços recentes na coleção de embriões e fetos humanos de Kyoto são um testemunho desse progresso (Matsunaga et al., 2019).

Os grandes acervos embrionários são, em sua essência, testemunhos materiais vivos da história da ciência. Eles não apenas documentam a evolução progressiva do conhecimento embriológico ao longo do tempo, mas também espelham e refletem as profundas transformações nos valores sociais, éticos e epistemológicos que moldaram as diferentes épocas (Truog, Kesselheim & Joffe, 2012). A icônica coleção de His, por exemplo, que foi iniciada no século XIX, estabeleceu os marcos conceituais do sistema de estágios de desenvolvimento humano (os Carnegie Stages), um sistema que permanece amplamente utilizado e referenciado na literatura médica e científica até os dias atuais (Carnegie Institution, 1912).

Tais coleções evidenciam de forma contundente como a ciência está em um diálogo constante e inseparável com seu tempo, e como os corpos preservados nesses acervos foram interpretados e compreendidos à luz das concepções filosóficas, religiosas e sociais predominantes em cada período histórico (Truog, Kesselheim & Joffe, 2012). A análise crítica desses acervos permite, inclusive, um debate crucial sobre práticas científicas do passado que, à luz dos padrões éticos contemporâneos, seriam consideradas inadmissíveis, como a ausência do consentimento informado, um pilar da ética biomédica moderna (Jasper et al., 2021). A questão de como o material foi obtido, como no caso da coleção de Uppsala University, é um ponto sensível nessa discussão histórica (Uppsala University, 2020).

O uso de embriões e fetos humanos preservados para fins científicos e educacionais é uma questão que, por sua natureza, evoca considerações éticas profundamente sensíveis e complexas (Jasper et al., 2021). Um ponto central nesse debate é o fato de que muitos dos espécimes em coleções históricas foram obtidos sem qualquer forma de consentimento informado, em períodos nos quais os direitos das mulheres gestantes eram frequentemente ignorados ou não reconhecidos (Truog, Kesselheim & Joffe, 2012). A ética contemporânea exige, portanto, não apenas o reconhecimento dessa história muitas vezes dolorosa, mas também a contextualização cuidadosa desses acervos e a adoção de medidas rigorosas para garantir sua utilização responsável e ética no presente e no futuro (CIOMS, 2016; CNS, 2012).

Para assegurar a integridade e a responsabilidade no uso desses materiais, recomenda-se, de forma enfática, que todos os acervos mantenham uma documentação clara e detalhada sobre a origem de cada espécime, que os dados associados a eles sejam devidamente anonimizados para proteger a privacidade, e que sejam utilizados exclusivamente para os propósitos científicos e educacionais estritamente definidos (CIOMS, 2016; CNS, 2012). As diretrizes internacionais estabelecidas pelo CIOMS (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas) e as resoluções brasileiras do CNS 466/2012 e 510/2016 oferecem uma base normativa sólida e abrangente para guiar o uso ético desses materiais humanos, assegurando que a pesquisa e a educação prossigam de maneira digna e respeitosa (CIOMS, 2016; CNS, 2012).

Além disso, a governança ética dos acervos deve ser abrangente e multifacetada, prevendo a participação social ativa, o estabelecimento de comitês de ética independentes, a colaboração contínua com lideranças religiosas e uma escuta ativa e empática das comunidades que podem ser afetadas (Jasper et al., 2021). A transparência absoluta no uso desses corpos é essencial não apenas para garantir a confiança pública na ciência e nas instituições, mas também para preservar a integridade institucional e o respeito pela dignidade humana (Jasper et al., 2021). A exploração dos paradigmas do consentimento informado, com foco na educação australiana, destaca a complexidade e a necessidade de frameworks éticos claros (Stokes & Walter, 2018).

A discussão ética se estende a diferentes níveis, desde a macroética, que aborda a definição de prioridades de saúde e políticas públicas (como o transplante de órgãos e tecidos), até a microética, que foca na ética da prática clínica cotidiana e na cultura organizacional humanística no ensino e prática da medicina (Beauchamp & Childress, 2013). A ambiguidade na teoria e prática do consentimento informado é um desafio persistente (Truog, Kesselheim & Joffe, 2012). Questões como os riscos da doação de tecido fetal para mulheres e as experiências dos pais com a doação post-mortem de tumores ou produtos da concepção para pesquisa revelam a necessidade de abordagens sensíveis e éticas, garantindo o apoio e a dignidade das famílias (Jasper et al., 2021). A conversa sobre "falar pelos mortos" e o uso de cadáveres em biologia e medicina é um componente crucial dessa reflexão (Truog, Kesselheim & Joffe, 2012).

Outro eixo fundamental e de crescente importância é o impacto transformador das coleções embrionárias na formação interprofissional e colaborativa. Ao integrar de forma sinérgica conhecimentos essenciais de embriologia, anatomia, histologia, genética, bioética e imagem médica, esses acervos favorecem uma formação profissional que é ampla, crítica e intrinsecamente colaborativa (Vawter et al., 2020). Cursos interdisciplinares que utilizam a combinação de coleções reais (físicas) e virtuais (digitalizadas) têm sido implementados com sucesso em instituições de prestígio como Harvard, UCL, USP e UFRJ, promovendo experiências educativas que são genuinamente inovadoras e que preparam o estudante para a complexidade do ambiente de saúde moderno (Vawter et al., 2020).

A utilização de modelos tridimensionais (3D) derivados diretamente de embriões reais tem demonstrado uma utilidade extraordinária em treinamentos para procedimentos minimamente invasivos em fetos, como a fetoscopia e a terapia gênica intrauterina. Esses modelos realistas permitem um aumento significativo da segurança dos procedimentos, a padronização de protocolos clínicos e a expansão do acesso ao treinamento qualificado para equipes médicas em formação, otimizando o desenvolvimento de habilidades técnicas e clínicas (Petracco, Brizot & Marchianò, 2021).

Um dos maiores impactos e benefícios dos avanços tecnológicos aplicados às coleções atuais é a digitalização e a disponibilização pública e global de seus acervos. O acesso online irrestrito e democratizado permite que estudantes, pesquisadores e profissionais de saúde de todas as partes do mundo explorem embriões humanos reais em detalhes, sem a necessidade de se deslocar fisicamente até museus ou universidades que abrigam essas coleções (De Bakker et al., 2016; Matsunaga et al., 2019).

Projetos exemplares nessa área incluem o eMouse Atlas (focado em modelos murinos, mas com princípios aplicáveis), o Visible Embryo, o já mencionado Kyoto Human Embryo Atlas e o inovador 3D Atlas of Human Embryology (Figura 1). Essas plataformas de acesso aberto oferecem uma vasta gama de recursos, incluindo milhares de imagens histológicas de alta

resolução, reconstruções 3D interativas e animações detalhadas, tornando o aprendizado da embriologia mais acessível e envolvente (De Bakker et al., 2016; Matsunaga et al., 2019).

A democratização do acesso ao conhecimento e aos recursos científicos favorece de maneira crucial as instituições localizadas em regiões periféricas ou com recursos limitados, que historicamente não dispunham de coleções próprias. Além disso, essa abertura estimula intensamente a formação de parcerias internacionais e o desenvolvimento de projetos colaborativos de pesquisa em escala global, fomentando assim a equidade científica e a criação de redes de conhecimento verdadeiramente globalizadas, onde o saber é compartilhado e construído coletivamente (Vawter et al., 2020).

Apesar dos notáveis avanços e da crescente valorização das coleções embrionárias, ainda persistem desafios consideráveis que demandam atenção urgente e estratégias eficazes. Entre os mais prementes, destacam-se a crítica falta de financiamento adequado para a manutenção, conservação e digitalização desses acervos, a escassez de profissionais altamente capacitados e especializados no manuseio delicado e na digitalização complexa dos espécimes, e a ausência de políticas públicas específicas e robustas que assegurem a proteção legal e o apoio institucional a esses materiais de valor histórico e científico incalculável (Jasper et al., 2021).

Para superar esses obstáculos, são necessários esforços interinstitucionais e colaborativos para catalogar minuciosamente, restaurar cuidadosamente e preservar de forma eficaz essas coleções, reconhecendo-as como um patrimônio histórico, científico e cultural da humanidade (Vawter et al., 2020). É igualmente urgente investir na capacitação contínua de professores e pesquisadores, equipando-os para o uso combinado e otimizado de recursos físicos e virtuais, e incentivando a adoção de abordagens pedagógicas inovadoras baseadas em metodologias ativas, como o PBL (Problem-Based Learning), que promovem o aprendizado significativo e a resolução de problemas reais (Estai, Bunt & Hossain, 2016).

O futuro aponta para uma integração cada vez mais intensa e sofisticada entre as coleções físicas e as tecnologias de simulação avançadas, plataformas de realidade virtual imersivas e a análise inteligente por meio da inteligência artificial, que promete revelar novos padrões e insights (Tong et al., 2020). Contudo, é fundamental reconhecer que, apesar de todos esses avanços tecnológicos, nada substitui a experiência sensível, ética e o contato direto com o corpo humano real, especialmente em contextos formativos e educacionais onde a compreensão da vida e da dignidade humana são centrais. A humanidade e a empatia na prática da medicina são reforçadas por essa conexão direta (Beauchamp & Childress, 2013).

Conclusão

As coleções de material embrionário e fetal humano são um pilar fundamental e insubstituível para o avanço da ciência biomédica e a educação em saúde, oferecendo um repertório vasto e precioso para a compreensão do desenvolvimento humano normal e patológico. Elas são cruciais para a pesquisa de malformações congênitas e a formação ética e empática dos futuros profissionais da saúde. A aquisição e o uso desses materiais envolvem complexas e sensíveis considerações bioéticas, com o consentimento informado sendo um paradigma central em discussão. Historicamente, muitos espécimes foram obtidos sem consentimento, o que exige uma contextualização cuidadosa e a adoção de medidas rigorosas para garantir o uso responsável e ético no presente. Legislações específicas, como a Lei de Anatomia Humana de 2018 na Austrália, e diretrizes internacionais como as do CIOMS e

CNS 466/2012 e 510/2016, estabelecem o quadro legal e normativo para o uso ético desses materiais humanos, assegurando a proteção da privacidade e a dignidade. O contato respeitoso com os corpos cultivados nessas coleções é essencial para a formação ética e humanística dos estudantes, promovendo a empatia e o respeito à dignidade humana.

Essas coleções, tanto físicas quanto digitalizadas, são indispensáveis para as aulas práticas e o ensino contemporâneo, oferecendo a oportunidade única de observar diretamente o desenvolvimento humano e suas variações. Elas contribuem significativamente para a retenção do conhecimento, o desenvolvimento do raciocínio clínico e a formação interprofissional, integrando conhecimentos de embriologia, anatomia, histologia, genética, bioética e imagem médica. Além disso, modelos tridimensionais derivados de embriões reais têm demonstrado utilidade extraordinária em treinamentos para procedimentos minimamente invasivos em fetos, melhorando a segurança e o diagnóstico pré-natal.

Apesar dos notáveis avanços, persistem desafios como a falta de financiamento adequado, a escassez de profissionais especializados e a ausência de políticas públicas robustas para a manutenção, conservação e digitalização desses acervos. É crucial investir na catalogação, restauração, preservação e capacitação contínua de professores e pesquisadores para otimizar o uso desses recursos. O futuro aponta para uma integração cada vez mais intensa e sofisticada entre as coleções físicas e as tecnologias de simulação avançadas, realidade virtual e inteligência artificial. No entanto, é fundamental reconhecer que, apesar de todos esses avanços tecnológicos, nada substitui a experiência sensível, ética e o contato direto com o corpo humano real, especialmente em contextos formativos e educacionais onde a compreensão da vida e da dignidade humana são centrais para a prática médica e a empatia.

Referências

- ABDEL MEGUID, E. M. et al. Explorando a visualização para o ensino de embriologia: uma perspectiva do século XXI. In: *Biomedical Visualisation: Volume 11*. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 173–193.
- ALBERTINE, K. H. AR Presents Celebration of the 40th Anniversary of the Congenital Anomaly Research Center at Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan. *The Anatomical Record*, v. 301, n. 6, p. 945–946, 2018.
- ANDERSON, M. et al. Doação de órgãos e tecidos neonata-is para pesquisa: opções após morte por causas naturais. *Cell and Tissue Banking*, v. 21, p. 289–302, 2020.
- BARASA, E. W. et al. Definindo prioridades de saúde nos níveis macro e meso: uma estrutura para avaliação. *International Journal of Health Policy and Management*, v. 4, n. 11, p. 719–732, 2015.
- BEAUCHAMP, T. L.; CHILDRESS, J. F. *Princípios de ética biomédica*. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- BRAND-SABERI, B. et al. Apresentando a embriologia humana em um Centro Internacional de Referência de Acesso Aberto (HERC). In: YAMADA, S.; TAKAKUWA, T., eds. *O embrião humano*. Rijeka: Dermatol Intech, 2012. p. 21–34.

BROWN, D. D. Departamento de Embriologia da Instituição Carnegie de Washington. *BioEssays*, v. 6, p. 92–96, 1987.

DANIELS, C. R. et al. Informed or misinformed consent? Abortion policy in the United States. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, v. 41, n. 2, p. 181–209, 2016.

DE BAKKER, B. S. et al. Um atlas digital tridimensional interativo e um banco de dados quantitativo sobre desenvolvimento humano. *Science*, v. 354, p. aag0053, 2016.

DICKENS, B. M. Comitês de ética, transplante de órgãos e políticas públicas. *Law, Medicine and Health Care*, v. 20, n. 4, p. 300–306, 1992.

EL-HADDAD, J.; PATHER, N. Developing an ethical framework for informed consent using human fetal and embryological collections: An Australian perspective. *Anatomical Sciences Education*, v. 18, n. 2, p. 192–208, 2025.

EL-HADDAD, J.; PATHER, N. Macro e microética em coletas fetais e embriológicas: explorando os paradigmas do consentimento informado entre partes interessadas com foco na educação australiana. *Anatomical Sciences Education*, v. 17, p. 630–645, 2024.

EL-HADDAD, J.; ŠTRKALJ, G.; PATHER, N. Uma perspectiva global sobre coleções embriológicas e fetais: para onde ir a partir daqui? *Anatomical Record*, v. 305, n. 4, p. 869–885, 2022.

ESTAI, M.; BUNT, S. Melhores práticas de ensino em educação em anatomia: uma revisão crítica. *Annals of Anatomy*, v. 208, p. 151–157, 2016.

FLIERMAN, S. et al. Discrepâncias no estadiamento embrionário: rumo a um padrão-ouro. *Life*, v. 13, n. 5, p. 1084, 2023.

FOURNIQUET, S. E.; BEITER, K. J.; MUSSELL, J. C. Fundamentação ética e diretrizes para o uso contínuo de coleções arquivísticas de restos embrionários e fetais. *Anatomical Sciences Education*, v. 12, p. 407–416, 2019.

FRANZÉN, H. ‘The precious material’: obtaining human fetal bodies for an embryological collection at Uppsala University, ca 1890–1930. *Scandinavian Journal of History*, v. 47, n. 2, p. 178–202, 2021.

GONZÁLEZ-RAMOS, Z. et al. "Meu maior medo é que as pessoas se esqueçam dele": transições emocionais de mães após interromper a gravidez por motivos médicos. *Journal of Clinical Nursing*, v. 32, n. 13–14, p. 3967–3980, 2023.

GRILL, C. Envolvendo as partes interessadas na definição de prioridades de pesquisa: uma revisão de escopo. *Research Involvement and Engagement*, v. 7, n. 1, p. 1–18, 2021.

HAZAN, A. et al. Uma pesquisa canadense sobre as atitudes de pacientes em relação à doação de produtos da concepção para pesquisa no momento do aborto por aspiração. *Contraception*, v. 114, p. 79–84, 2022.

JONES, D. G. Falando pelos mortos: cadáveres em biologia e medicina. Londres: Routledge, 2017.

KAMEDA, T. et al. Digitalização de dados clínicos e epidemiológicos da coleção de embriões humanos de Kyoto: fatores de risco maternos e malformações embrionárias. *Congenital Anomalies*, v. 52, p. 48–54, 2012.

MANNER, J. Die Humanembryologische Dokumentationssammlung Blechschmidt. Um modelo básico de construção em um processo de formação dinâmico. In: LUDWIG, D.; WEBER, C.; ZAUZIG, O., eds. *O material modelo. Objektgeschichten aus der wissenschaftlichen Praxis*. Munique: Wilhelm Fink Verlag, 2014. p. 33–39.

MARKERT, M. Aspectos éticos das coleções de embriões humanos: uma abordagem historicamente fundamentada para a coleção Blechschmidt na Universidade de Göttingen. *Cells, Tissues and Organs*, v. 209, p. 189–199, 2020.

MATSUDA, Y. et al. Imagem de uma grande coleção de embriões humanos usando um microscópio de ressonância magnética superparalelo. *Magnetic Resonance in Medical Sciences*, v. 6, p. 139–146, 2007.

MIZUTA, S. et al. Um sistema de recuperação e apresentação de dados para um banco de dados morfológico de embriões humanos utilizando imagens tridimensionais de microscopia de ressonância magnética. *Transactions of the Japanese Society for Medical and Biological Engineering*, v. 44, p. 665–673, 2006.

MOXHAM, B. J. et al. Embriologia e teratologia nos currículos dos cursos da área da saúde. *European Journal of Anatomy*, v. 21, n. 1, p. 77–91, 2017.

NAGAI, M. et al. Extração de DNA de embriões humanos após preservação de longo prazo em soluções de formalina e Bouin. *Congenital Anomalies*, v. 56, n. 3, p. 112–118, 2016.

NOE, A. A coleção de embriões humanos. In: MAIENSCHIEIN, J.; GLITZ, M.; ALLEN, G. E., eds. *História do Centenário da Instituição Carnegie de Washington*. Departamento de Embriologia, Vol. 5. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. p. 21–61.

O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. Estágios de desenvolvimento em embriões humanos. Washington: Carnegie Institution of Washington, 1987.

RHODES, R. Os menores doadores: a doação de órgãos neonatais oferece esperança em meio à tragédia. 2024.

RIDER, E. A. et al. A saúde na encruzilhada: a necessidade de moldar uma cultura organizacional de ensino e prática humanísticos. *Journal of General Internal Medicine*, v. 33, p. 1092–1099, 2018.

ROBERTSON, E. G. et al. Experiências de pais com doação post-mortem de tumores para gliomas de alto grau: benefícios e sugestões de melhorias. *Neuro-Oncology Advances*, v. 3, n. 1, p. vdab087, 2021.

SIMPSON, C.; McDONALD, F. Repensando a ética da saúde rural. Nova Iorque: Springer International Publishing, 2017. p. 161–171.

SPIRO, H. M. et al., eds. *Empatia e a prática da medicina: além dos comprimidos e do bisturi*. New Haven, CT: Yale University Press, 1993.

SUPONHA, B. W. Atitude e percepção dos estudantes de medicina em relação ao curso de embriologia da Universidade Debre Markos, Etiópia. *Advances in Medical Education and Practice*, v. 13, p. 789–796, 2022.

TRUOG, R. D. et al. Microética: a ética da prática clínica cotidiana. *Hastings Center Report*, v. 45, n. 1, p. 11–17, 2015.

VAWTER, D. E.; GERVAIS, K. G.; CAPLAN, A. L. Riscos da doação de tecido fetal para mulheres. *Journal of Neural Transplantation & Plasticity*, v. 3, n. 4, p. 322, 1992.

VÉLEZ-AGOSTO, N. M. et al. Revisão da teoria bioecológica de Bronfenbrenner: movendo a cultura do macro para o micro. *Perspectives on Psychological Science*, v. 12, n. 5, p. 900–910, 2017.

WHITE, W. D. Consentimento informado: ambiguidade na teoria e na prática. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, v. 8, n. 1, p. 99–119, 1983.

YAMAGUCHI, Y.; YAMADA, S. The Kyoto Collection of Human Embryos and Fetuses: history and recent advancements in modern methods. *Cells Tissues Organs*, v. 205, n. 5–6, p. 314–319, 2018.

CÓDIGO: SB0098

AUTOR: PÉROLA SOARES COMBES

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM DEPRESSÃO TRATADOS COM EXERCÍCIO E ANTIDEPRESSIVO

Resumo

Neste trabalho, discursava-se acerca do Projeto de Enfrentamento à Tristeza, estudo clínico controlado longitudinal, realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, com discentes e funcionários da UFRN, de ambos os sexos, com idade entre 18 à 60 anos, com depressão maior, que foram distribuídos em 2 grupos terapêuticos: voluntários adeptos apenas do tratamento farmacológico (grupo Controle) e indivíduos que aliaram o exercício físico multimodal com o fármaco (grupo Exercício) – que foram pareados quanto ao sexo, idade, renda e escolaridade. Essa produção realizou uma análise dos níveis de Proteína C-Reativa (PCR) dos voluntários participantes desse estudo, no qual pacientes com depressão maior foram tratados usando terapia farmacológica exclusiva e associada ao exercício físico multimodal. Houve uma redução significativa nos níveis de PCR do início para o final do tratamento apenas no grupo que aliou o exercício físico ao medicamento, enquanto o grupo controle não apresentou mudanças significativas.

Palavras-chave: Depressão Maior. Exercício Físico. Marcadores Inflamatórios. PCR.

TITLE: Analysis of inflammatory markers in patients with depression treated with exercise and antidepressants

Abstract

In this paper, we discuss the Project for Coping with Sadness, a controlled longitudinal clinical study, which was carried out at the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, with UFRN students and employees, of both genders, aged between 18 and 60 years, with major depression, who were divided into 2 therapeutic groups: volunteers who adhered only to pharmacological treatment (Control group) and individuals who combined multimodal physical exercise with the drug (Exercise group) – who were matched for sex, age, income and education. This production carried out an analysis of C-reactive protein (CRP) levels of the volunteers participating in this study, in which patients with major depression were treated using exclusive pharmacological therapy and associated with multimodal physical exercise. There was a significant reduction in CRP levels from the beginning to the end of treatment only in the group that combined physical exercise with medication, while the control group showed no significant changes.

Keywords: Major Depression. Physical Exercise. Inflammatory Markers. CRP

Introdução

Em consonância com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 300 milhões de pessoas sofrem, no mundo, com o Transtorno de Depressão Maior (TDM), constituindo uma das principais causas de incapacidade global (Marx et al., 2023). A depressão é um transtorno mental multifacetado, cuja origem e fisiopatologia envolvem diversos fatores, incluindo processos inflamatórios que têm ganhado crescente atenção na literatura científica. Nos últimos anos, um crescente número de evidências tem apontado para uma estreita associação entre processos inflamatórios e a depressão (Dantzer et al., 2008; Milaneschi et al., 2021). Pesquisas indicam que indivíduos com depressão frequentemente apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios no sangue, como citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa (Köhler et al., 2017). Embora a natureza exata dessa relação ainda não esteja completamente elucidada, estas citocinas podem impactar diretamente o sistema nervoso central, afetando a neurotransmissão, a neuroplasticidade e até mesmo a neurogênese. A Proteína C-Reativa (PCR) é um marcador inflamatório não específico produzido primariamente pelo fígado em resposta à IL-6, sendo um dos marcadores inflamatórios mais estudados e acessíveis na prática clínica (Salazar et al., 2014; Sproston & Ashworth, 2018). Devido ao custo-benefício do teste, a PCR é amplamente utilizada para identificar infecções ou outras condições inflamatórias (Hunter, 2015). Na depressão, níveis elevados de PCR são frequentemente associados a menores níveis de bem-estar emocional positivo, aumento do estresse psicológico percebido, ansiedade e transtornos relacionados ao estresse (Ironson et al., 2018; Kennedy & Niedzwiedz, 2022). A importância deste indicador reside no fato de que ele reflete processos inflamatórios sistêmicos que podem estar relacionados à fisiopatologia da depressão e sua monitorização pode fornecer informações valiosas sobre a resposta ao tratamento (Osimo et al., 2019; Ji et al., 2024). Nesse contexto, terapias complementares, como o exercício físico, têm sido sugeridas como moduladores potenciais da resposta inflamatória. A literatura robustamente suporta a noção de que o exercício pode aliviar sintomas de saúde mental e possui propriedades anti-inflamatórias, particularmente na redução da Proteína C-Reativa (PCR) (Gleeson et al., 2011; Pedersen & Saltin, 2015; Kandola et al., 2019). Objetivo: Analisar o efeito adjunto do exercício físico multimodal aos níveis de PCR em pacientes com depressão maior tratados com terapia farmacológica.

Metodologia

O estudo clínico controlado longitudinal base desta análise (Projeto de Enfrentamento à Tristeza), foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, com público de 60 sujeitos, estudantes e servidores da UFRN, de ambos os sexos, com idade entre 18 à 60 anos, com depressão maior, que foram distribuídos em 2 grupos terapêuticos – voluntários adeptos apenas do tratamento farmacológico (grupo controle) e indivíduos que aliaram o exercício físico com o fármaco (grupo exercício) – que foram pareados quanto ao sexo, idade, renda e escolaridade. O recrutamento de participantes se deu por meio de divulgação em cartaz, boletim eletrônico da UFRN, mídias sociais e fórum dos cursos via SIGAA. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento e livre esclarecimento (TCLE). O início do processo de triagem ocorreu através do aplicativo móvel do Programa Enfrentamento à Tristeza. No primeiro contato por meio do aplicativo, os participantes respondem ao Questionário sobre Saúde do Paciente (PHQ-2) para triagem inicial de sintomas depressivos (de Lima Osorio et al., 2009). Aqueles que atingem o ponto de corte são convidados para uma consulta clínica. O diagnóstico da depressão maior foi realizado utilizando as seguintes escalas psicométricas: 1) Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional Miniatura (MINI) usada para diagnóstico de Depressão Maior (Amorim, 2000); 2) a Escala

de Avaliação de Gravidade da Depressão de Montgomery e Asberg (MADRS), aplicada para medir a gravidade da Depressão Maior (Montgomery & Asberg, 1979); e 3) Questionário de Prontidão para Atividade Física (PAR-Q) para garantir que os pacientes estivessem fisicamente aptos para fazer exercícios (Shephard, 1988). Após a inclusão, os voluntários foram distribuídos, em bloco e aleatoriamente, em dois grupos específicos: grupo controle de farmacoterapia exclusiva (GC, n=30), grupo exercício tratado com farmacoterapia mais exercício (GE, n=30). O medicamento antidepressivo utilizado foi o escitalopram (Eurofarma Laboratórios S.A), fornecido gratuitamente pela equipe de pesquisa para garantir a uniformidade do tratamento. O grupo Controle utilizou exclusivamente este ISRS por 12 semanas, enquanto o grupo Exercício recebeu o mesmo medicamento mais um protocolo de exercícios multimodal domiciliar e supervisionado por 12 semanas, realizado quatro vezes por semana (dois dias síncronos e dois dias assíncronos), em média por 30 minutos por dia. O exercício multimodal refere-se a uma configuração estruturada que combina vários tipos de exercícios, incluindo exercício aeróbico, treinamento de resistência, fortalecimento muscular e treinamento de mobilidade/equilíbrio. Os exercícios prescritos foram projetados para serem realizados em casa usando apenas o peso corporal. Nos encontros presenciais basal (inicial), 5ª e 12ª semana, foram coletadas amostras de sangue para dosagem do biomarcador inflamatório Proteína C-Reativa (PCR), a fim de monitorar os níveis de inflamação ao longo do tratamento. As coletas de sangue foram realizadas de forma similar, utilizando material perfurocortante, por técnicos devidamente treinados. Foram coletados 10 ml de sangue no período da manhã, com o voluntário em jejum. O teste de dosagem da PCR baseia-se na aglutinação de partículas de látex revestidas com anticorpos anti-PCR humana quando misturadas com o soro do paciente contendo PCR (Aguilar et al., 2013). A concentração de PCR na amostra é diretamente proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria. As coletas e a dosagem das amostras de sangue foram realizadas no laboratório de medidas hormonais do Centro de Biociências. Para a análise dos dados foram aplicados modelos lineares mistos (LMM) para examinar o efeito do grupo (exercício versus controle) no baseline (t0), quinta semana (t1) e décima segunda semana (t2). As análises foram realizadas usando intenção de tratamento (ITT), com todos os pacientes analisados como membros do grupo ao qual foram randomizados. Para a PCR, idade, dose de medicação e sexo foram incluídos como covariáveis. Significância estatística foi definida como $p < 0,05$, utilizando o software SPSS® para Windows (Nguyen, 2020).

Resultados e Discussões

O estudo incluiu 59 adultos randomicamente alocados em dois grupos: grupo exercício (EG; n = 26, 76,9% mulheres, idade média 28,5 anos) e grupo controle (CG, n = 33, 78,7% mulheres, idade média 25,9 anos). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de PCR no baseline entre os grupos ($p = 0,063$). Uma interação estatisticamente significativa foi observada entre o grupo de tratamento e o tempo [$F(2;130) = 4,752$, $p = 0,010$]. Na 5ª semana (t1), não houve mudanças nos níveis de PCR comparado ao baseline para ambos os grupos: GE ($p = 0,093$) e GC ($p = 0,146$). Assim, em t1, o GE e GC tiveram níveis similares de PCR ($p = 0,174$). Entretanto, na 12ª semana (t2), os níveis de PCR reduziram no GE comparado ao t0 ($p = 0,019$; $d = 0,64$), enquanto não foram observadas mudanças no GC ($p = 0,116$; $d = -0,35$). Ademais, o GE mostrou reduções clinicamente significativas nos níveis de PCR, com tamanho de efeito considerado médio a grande ($d \geq 0,50$) (Norman et al., 2003). Portanto, em t2, o GE mostrou níveis menores de PCR comparado ao GC ($p = 0,043$; $d = 0,50$). Na análise das covariáveis, os resultados indicam que homens comparados às mulheres podem ter níveis diminuídos de PCR ($p < 0,0001$) (Jha et al., 2019). Por outro lado, a idade (p

$< 0,0001$) (Hughes & Kumari, 2018) e a dose de escitalopram podem aumentar ligeiramente os níveis de PCR ($p < 0,0001$). Discussão É possível observar uma redução significativa nos níveis de PCR apenas no grupo que associou exercício físico ao tratamento farmacológico, demonstrando o efeito anti-inflamatório específico da intervenção com exercício multimodal. Esse achado é particularmente relevante, pois confirma que a combinação de exercício físico com tratamento farmacológico oferece benefícios adicionais significativos comparado ao tratamento farmacológico isolado. Estudos anteriores têm demonstrado os efeitos anti-inflamatórios do exercício físico em diferentes populações. Arikawa et al. (2011) observaram que 16 semanas de exercício aeróbico reduziram significativamente os níveis de PCR em mulheres jovens. Similarmente, Fedewa et al. (2017), em meta-análise, confirmaram o efeito do treinamento físico na redução da PCR em ensaios clínicos controlados. Kohut et al. (2006) também demonstraram que o exercício aeróbico, mas não exercícios de flexibilidade/resistência, reduziu significativamente os níveis de PCR em adultos mais velhos. Especificamente em pacientes com depressão, Euteneuer et al. (2017) demonstraram que um programa de exercícios de 12 semanas resultou em reduções significativas dos marcadores inflamatórios, incluindo a PCR. Adicionalmente, Guimarães et al. (2024) confirmaram em revisão sistemática com meta-análise os efeitos agudos e crônicos do exercício físico na redução de biomarcadores inflamatórios em pessoas com depressão. Quanto aos mecanismos pelos quais o exercício pode reduzir os níveis de PCR, potencialmente isso ocorre através de uma combinação de fatores. O eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) e a resposta do cortisol são importantes fatores contribuintes na redução dos níveis de PCR (Athanasίου et al., 2023; Cain & Cidlowski, 2017). O exercício agudo é conhecido como uma resposta ao estresse, aumentando agudamente os níveis de cortisol, que é um potente hormônio anti-inflamatório. Uma vez que o exercício é realizado regularmente, pode beneficiar a capacidade do eixo HPA de regular a produção de cortisol, mediando um efeito anti-inflamatório de longo prazo (McEwen, 2000). Destaca-se que os pacientes fizeram uso do escitalopram, um medicamento da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Evidências recentes indicam que os ISRS não têm efeito significativo na redução da inflamação (Fernandes et al., 2022; O'Brien et al., 2006; Izumi et al., 2023), alinhando-se com nossos achados onde o grupo controle não apresentou redução significativa nos níveis de PCR. O exercício físico atua como adjuvante do tratamento farmacológico, demonstrando a importância de associar métodos adjuvantes ao tratamento medicamentoso usual (Rethorst & Trivedi, 2013; Schuch & Vancampfort, 2021). O exercício multimodal, que incorpora exercício aeróbico, treinamento de resistência e exercícios de mobilidade/equilíbrio, pode proporcionar uma abordagem mais holística e eficaz para melhorias terapêuticas e fisiológicas em pacientes com depressão (Noetel et al., 2024; Heissel et al., 2023). O exercício físico atua como adjuvante do tratamento farmacológico, demonstrando a importância de associar métodos adjuvantes ao tratamento medicamentoso usual (Rethorst & Trivedi, 2013; Schuch & Vancampfort, 2021). O exercício multimodal, que incorpora exercício aeróbico, treinamento de resistência e exercícios de mobilidade/equilíbrio, pode proporcionar uma abordagem mais holística e eficaz para melhorias terapêuticas e fisiológicas em pacientes com depressão (Noetel et al., 2024; Heissel et al., 2023). Meta-análises recentes confirmam consistentemente tanto os efeitos antidepressivos (Kvam et al., 2016; Rethorst et al., 2009; Rossi et al., 2024) quanto anti-inflamatórios do exercício físico em pessoas com depressão (Khorvash et al., 2012; Sun et al., 2023). Trabalhos adicionais têm explorado as interações entre terapias anti-inflamatórias e depressão. Bai et al. (2020) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise sobre a eficácia e segurança de agentes anti-inflamatórios para o tratamento do transtorno depressivo maior. Köhler et al. (2014) investigaram o efeito do tratamento anti-inflamatório na depressão

e sintomas depressivos. Os achados relacionados às covariáveis (sexo, idade e dose de medicação) enfatizam a importância de fatores demográficos e do uso de antidepressivos na interpretação dos níveis de PCR e suas implicações para desfechos clínicos (Jha et al., 2017; Michaud et al., 2013). Embora os resultados sejam promissores, o estudo apresenta limitações como a amostra específica de universitários e o seguimento de 12 semanas, que não permite avaliar a sustentabilidade dos efeitos a longo prazo. Estudos futuros poderiam explorar a relação dose-resposta entre diferentes intensidades de exercício na redução da PCR, investigar a manutenção dos benefícios anti-inflamatórios em seguimentos prolongados, analisar a correlação entre mudanças da PCR e melhora dos sintomas depressivos, e identificar fatores preditivos para otimizar protocolos personalizados de exercício no tratamento adjuvante da depressão.

Conclusão

Os resultados demonstram que o exercício físico multimodal, quando associado ao tratamento farmacológico, promove redução significativa dos níveis de PCR em pacientes com depressão maior, confirmando as propriedades anti-inflamatórias desta intervenção terapêutica complementar. Estes achados estão alinhados com a crescente evidência na literatura que suporta o uso do exercício como uma intervenção adjuvante eficaz no tratamento da depressão, particularmente em relação aos seus efeitos anti-inflamatórios.

Referências

AGUIAR, F. J. B. et al. Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 59, n. 1, p. 85-92, 2013. AMORIM, P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 22, n. 3, p. 106-115, 2000. ARIKAWA, A. Y. et al. Sixteen weeks of exercise reduces C-reactive protein levels in young women. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 43, n. 6, p. 1002-1009, 2011. ATHANASIOU, N.; BOGDANIS, G. C.; MASTORAKOS, G. Endocrine responses of the stress system to different types of exercise. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2023. BAI, S. et al. Efficacy and safety of anti-inflammatory agents for the treatment of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 91, n. 1, p. 21-32, 2020. CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. *Nature Reviews Immunology*, 2017. DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 46-56, 2008. DE LIMA OSÓRIO, F. et al. Study of the discriminative validity of the PHQ-9 and PHQ-2 in a sample of Brazilian women in the context of primary health care. *Perspectives in Psychiatric Care*, v. 45, n. 3, p. 216-227, 2009. EUTENEUER, F. et al. Immunological effects of behavioral activation with exercise in major depression: an exploratory randomized controlled trial. *Translational Psychiatry*, v. 7, n. 5, p. e1132, 2017. FEDEWA, M. V.; HATHAWAY, E. D.; WARD-RITACCO, C. L. Effect of exercise training on C reactive protein: a systematic review and meta-Analysis of randomised and non-randomised controlled trials. *British Journal of Sports Medicine*, 2017. FERNANDES, B. M.; SCOTTI-MUZZI, E.; SOEIRO-DE-SOUZA, M. G. Effects of antidepressant drug therapy with or without physical exercise on inflammatory biomarkers in major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of*

Clinical Pharmacology, 2022. GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011. GUIMARÃES, M. E. A. et al. Acute and chronic effects of physical exercise in inflammatory biomarkers in people with depression: a systematic review with meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research*, v. 179, p. 26-32, 2024. HALLBERG, L. et al. Exercise-induced release of cytokines in patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, v. 126, n. 1-2, p. 262-267, 2010. HEISSEL, A. et al. Exercise as medicine for depressive symptoms? A systematic review and meta-analysis with meta-regression. *British Journal of Sports Medicine*, 2023. HUGHES, A.; KUMARI, M. Age modification of the relationship between C-reactive protein and fatigue: findings from Understanding Society (UKHLS). *Psychological Medicine*, v. 48, n. 8, p. 1341-1349, 2018. HUNTER, R. Cost-effectiveness of point-of-care C-reactive protein tests for respiratory tract infection in primary care in England. *Advances in Therapy*, v. 32, n. 1, p. 69-85, 2015. IRONSON, G. et al. Positive emotional well-being, Health Behaviors, and inflammation measured by C-Reactive protein. *Social Science & Medicine*, v. 197, p. 235-243, 2018. IZUMI, Y. et al. SSRIs differentially modulate the effects of pro-inflammatory stimulation on hippocampal plasticity and memory via sigma 1 receptors and neurosteroids. *Translational Psychiatry*, v. 13, 2023. JHA, M. K. et al. Sex differences in the association of baseline c-reactive protein (CRP) and acute-phase treatment outcomes in major depressive disorder: findings from the EMBARC study. *Journal of Psychiatric Research*, v. 113, p. 165-171, 2019. JHA, M. K. et al. Can C-reactive protein inform antidepressant medication selection in depressed outpatients? Findings from the CO-MED trial. *Psychoneuroendocrinology*, v. 78, p. 105-113, 2017. JI, Y. et al. Association between hs-CRP and depressive symptoms: a cross-sectional study. *Frontiers in Psychiatry*, v. 15, 2024. KANDOLA, A. et al. Physical activity and depression: towards understanding the antidepressant mechanisms of physical activity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 107, p. 525-539, 2019. KENNEDY, E.; NIEDZWIEDZ, C. L. The association of anxiety and stress-related disorders with C-reactive protein (CRP) within UK Biobank. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, v. 19, 2022. KHORVASH, M. et al. An investigation on the effect of strength and endurance training on depression, anxiety, and C-reactive protein's inflammatory biomarker changes. *Journal of Research in Medical Sciences*, v. 17, n. 11, p. 1072-1076, 2012. KÖHLER, C. A. et al. Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 135, n. 5, p. 373-387, 2017. KÖHLER, O. et al. Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects. *JAMA Psychiatry*, v. 71, n. 12, p. 1381, 2014. KOHUT, M. L. et al. Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of β -blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 20, n. 2, p. 201-209, 2006. KVAM, S. et al. Exercise as a treatment for depression. A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, v. 202, p. 67-86, 2016. MARX, W. et al. Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 9, n. 1, p. 44, 2023. MCEWEN, B. Allostasis and allostatic load implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 108-124, 2000. MICHAUD, M. et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, v. 14, n. 12, p. 877-882, 2013. MILANESCHI, Y. et al. Association of inflammation with depression and anxiety: evidence for symptom-specificity and potential causality from UK Biobank and NESDA cohorts. *Molecular Psychiatry*, v. 26, n. 12, p. 7393-7402, 2021. MONTGOMERY, S. A.; ASBERG, M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *British Journal of Psychiatry*, v. 134, n. 4, p. 382-389, 1979. NGUYEN, M. A guide on data analysis. 2020. NOETEL, M. et al.

Effect of exercise for depression: systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, v. 384, p. e075847, 2024. NORMAN, G. R.; SLOAN, J. A.; WYRWICH, K. W. Interpretation of changes in health-related quality of life. *Medical Care*, v. 41, n. 5, p. 582-592, 2003. O'BRIEN, S. M.; SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Antidepressant therapy and C-reactive protein levels. *British Journal of Psychiatry*, v. 188, n. 5, p. 449-452, 2006. OSIMO, E. F. et al. Prevalence of low-grade inflammation in depression: a systematic review and meta-analysis of CRP levels. *Psychological Medicine*, v. 49, n. 12, p. 1958-1970, 2019. PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, v. 25, suppl. 3, p. 1-72, 2015. RETHORST, C. D.; TRIVEDI, M. H. Evidence-based recommendations for the prescription of exercise for major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Practice*, v. 19, n. 3, p. 204-212, 2013. RETHORST, C. D.; WIPFLI, B. M.; LANDERS, D. M. The antidepressive effects of exercise: a meta-analysis of randomized trials. *Sports Medicine*, v. 39, n. 6, p. 491-511, 2009. ROSSI, F. E. et al. Strength training has antidepressant effects in people with depression or depressive symptoms but no other severe diseases: a systematic review with meta-analysis. *Psychiatry Research*, v. 334, p. 115805, 2024.

CÓDIGO: SB0130

AUTOR: ISABELLA LETTIERI DAMASIO PEREIRA

COAUTOR: RODOLFO DANIEL DE ALMEIDA SOARES

COAUTOR: JOSE WILAMY COSME RABELO

COAUTOR: MARIA CECILIA FARIAS DOS SANTOS

COAUTOR: MATHEUS FERNANDES DIAS

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: MACHINE LEARNING PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS EM MIELOGRAMAS PARA O DIAGNÓSTICO HEMATOLÓGICO

Resumo

O mielograma é um exame essencial para o diagnóstico de doenças hematológicas, como leucemias, linfomas e síndromes mielodisplásicas. Entretanto, sua interpretação depende da expertise do hematologista, o que torna o processo suscetível à subjetividade e a possíveis discrepâncias diagnósticas, impactando o prognóstico dos pacientes. Nesse contexto, ferramentas computacionais capazes de identificar padrões podem otimizar o fluxo de trabalho e reduzir vieses interpretativos. Este estudo teve como objetivo aplicar técnicas de Machine Learning (ML) à identificação de células sanguíneas em imagens de mielogramas. Foram utilizadas lâminas de medula óssea do acervo da Unidade de Hemoterapia do HUOL-UFRN, coradas pela técnica de Romanowsky-Leishman, com contraste adequado e morfologia preservada. De cada lâmina, foram obtidas 20 microfotografias em campos criteriosamente selecionados, resultando em um banco de imagens estruturado para treinamento dos algoritmos. As imagens foram processadas por meio do modelo StarDist 2D, utilizando o plugin CSBDeep no software ImageJ e a plataforma ZeroCostDL4Mic no Google Colab. Contudo, em ambas as abordagens, a execução foi inviabilizada por incompatibilidades do TensorFlow entre as bibliotecas e os ambientes de execução. Assim, embora o banco de imagens obtido tenha demonstrado alta qualidade, a aplicação do modelo mostrou-se incompatível com versões atualizadas, evidenciando a necessidade de novos estudos para viabilizar sua implementação.

Palavras-chave: Inteligência artificial. Hematologia. Fotomicrografia.

TITLE: MACHINE LEARNING FOR BLOOD CELL IDENTIFICATION IN MYELOGRAMS FOR HEMATOLOGICAL DIAGNOSIS

Abstract

The myelogram is an essential tool for diagnosing hematological diseases such as leukemias, lymphomas, and myelodysplastic syndromes. However, its interpretation depends on the hematologist's expertise, making the process susceptible to subjectivity and diagnostic discrepancies that may affect patient prognosis. To address this, computational tools capable of identifying patterns can optimize workflow and reduce interpretive bias. This study aimed

to apply Machine Learning (ML) to blood cell identification in myelogram images. Bone marrow smears from the Hemotherapy Unit of HUOL-UFRN, stained with the Romanowsky (Leishman) technique, with adequate contrast and preserved morphology, were used. From each slide, 20 microphotographs were obtained in carefully selected fields, totaling a structured image database for ML training. Images were processed using the StarDist 2D model through the CSBDeep plugin in ImageJ and the ZeroCostDL4Mic platform in Google Colab. However, both approaches were hindered by TensorFlow compatibility issues between libraries and execution environments. Thus, although the image database proved to be of high quality, the Python library application was incompatible with updated versions, underscoring the need for further studies to enable practical implementation.

Keywords: Artificial Intelligence. Hematology. Photomicrography.

Introdução

O mielograma representa um dos principais exames utilizados na prática hematológica, permitindo a avaliação morfológica das células da medula óssea e fornecendo subsídios cruciais para o diagnóstico de diversas doenças, incluindo leucemias, linfomas, anemias e mielodisplasias (ERLICH et al., 2019). No entanto, a interpretação desse exame exige experiência e diversos conhecimentos técnicos manuais específicos, uma vez que nenhum achado isolado é diagnóstico, o que pode acarretar subjetividade na análise (STEENSMA; CAMPO, 2019).

O uso de algoritmos de Machine Learning (ML) tem demonstrado eficácia na análise automatizada de imagens biomédicas, em especial na hematologia laboratorial, contribuindo para o aumento da padronização e a eficiência, porém é investimento ainda oneroso para o poder público, (Obstfeld AE, 2023). Desse modo, esse projeto visou aplicar algoritmos de Machine Learning (ML) na identificação de células sanguíneas em imagens de mielograma para aprimorar o diagnóstico hematológico

Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido a partir da obtenção de amostras medulares na Unidade de Hemoterapia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL-UFRN), sob o CAAE 29008820.0.0000.5292. Foram selecionadas lâminas de distensão de aspirado de medula óssea provenientes do banco de amostras existente na Unidade.

As 10 lâminas coradas pela técnica de Romanowsky, especificamente a coloração de Leishman, foram selecionadas do acervo do Banco de Sangue da Universidade Federal do Rio Grande do Norte no Centro de Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL). Foram capturadas 20 microfotografias por lâmina, totalizando 200 imagens, utilizando-se campos que apresentassem boa coloração, contraste adequado, ausência de artefatos proeminentes e preservação morfológica das estruturas celulares. Cada imagem foi obtida com a magnificação de 400X por meio de uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico.

Em seguida, houve a submissão ao software ImageJ (Fiji), no qual tentou-se utilizar a biblioteca StarDist 2D via plugin CSBDeep. Em seguida, utilizou-se a plataforma

ZeroCostDL4Mic, baseada no Google Colab, para carregar as bibliotecas necessárias à execução da célula.

Resultados e Discussões

Após criar um banco de microfotografias de qualidade para o treinamento de máquina foi constatado que desafios para executar o modelo Stardist 2D (Schmidt et al., 2018) por meio da biblioteca Python, nesse caso houve uma incompatibilidade crítica entre o Java e a versão biblioteca TensorFlow requerida pelo plugin CSBDeep no software ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012;). Apesar de tentativas de correção, incluindo a instalação de versões anteriores do Java, ajustes de variáveis de ambiente e atualizações manuais dos componentes, ainda houveram falhas de inicialização (Figura 1).

Outros usuários da comunidade científica também descreveram erros semelhantes após atualizações recentes do ambiente, conforme registrado no fórum oficial do Image.sc (Image.sc Forum, 2024). Já na plataforma ZeroCostDL4Mic (von Chamier et al., 2021) no Google Colab, observou-se falha recorrente na célula de carregamento de dependências no ambiente do Google Colab (Figura 2) inviabilizaram o processo, especialmente pela ausência da função “register_all” no módulo “tensorflow.compat.v1.framework.graph_util”, indicando desatualização do notebook frente às bibliotecas mantidas no ambiente. Foram realizados diversos procedimentos corretivos, como reinstalação de bibliotecas e downgrade manual de pacotes. Por fim, conclui-se que apesar de existirem bibliotecas para análise de microfotografias, é necessário que estas possuam módulos compatíveis para possibilitar a aplicação efetiva no diagnóstico hematológico.

Conclusão

Assim, embora a biblioteca utilizada nesta pesquisa tenha apresentado limitações relacionadas à compatibilidade, foi possível criar um banco de dados de microimagens de qualidade, no qual pode contribuir para o posterior treinamento de máquina e validação do modelo de aprendizado para utilização na área da hematologia.

Referências

CARVALHO, D. E. et al. Análise citomorfológica do mielograma de pacientes com LLA em um centro hospitalar de referência. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 45, supl. 4, p. S264, out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.529>.

CLB Andrade, MICSE Silva, IMDRP Rosa, LFM Darze, ASD Santos, MMD Santos, RJM Nascimento, SM Freire, RA Rios, TN Rios. Análise do potencial uso de inteligência artificial no diagnóstico hematológico como alternativa ao baixo contingente de hematologistas frente a incidência anual de doenças onco-hematológicas, *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 46, Supl. 4, 2024, p. S519, ISSN 2531-1379, <https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.872>.

El Alaoui, Yousra et al. “A Review of Artificial Intelligence Applications in Hematology Management: Current Practices and Future Prospects.” *Journal of medical Internet research* vol. 24,7 e36490. 12 Jul. 2022, doi:10.2196/36490

ERLICH, M.; BROWNE, C.; WILLIAMS, D. M. The Role of the Bone Marrow Examination in the Evaluation of Hematopoietic Diseases. *Clinical Laboratory Medicine*, v. 39, p. 248-260, 2019.

ESTEVEES, L. P. et al. Uso de Deep Learning para auxiliar no diagnóstico de leucemia mieloide aguda a partir de imagens de lâminas de sangue periférico. *Leukemia Research*, v. 121, p. 101-108, 2020.

HOU, L. et al. Classificação de linfomas com base em um modelo de aprendizado de máquina usando redes neurais convolucionais. *Frontiers in Medicine*, v. 7, p. 242, 2019.

IMAGE.SC Forum. StarDist error since update. 2024. Disponível em: <https://forum.image.sc/t/stardist-error-since-update/107729>. Acesso em: 25 jul. 2025.

Obstfeld AE. Hematology and Machine Learning. *J Appl Lab Med*. 2023 Jan 4;8(1):129-144. doi: 10.1093/jalm/jfac108. PMID: 36610431.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio; PEREIRA, Juliana; BEITLER, Beatriz. Mielograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia: prática e interpretação. Rio de Janeiro: Roca, 2022.

Schindelin, J. et al. Fiji: uma plataforma de código aberto para análise de imagens biológicas. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jun. 2012. DOI: 10.1038/nmeth.2019

SCHMIDT, U. et al. Cell Detection with Star-convex Polygons. *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018. Lecture Notes in Computer Science*, v. 11071. Springer, Cham, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30

STEENSMA, D. B.; CAMPO, E. Subjectivity in Bone Marrow Examination: A Challenge for Hematology. *Blood*, v. 134, p. 1823-1824, 2019.

VON CHAMIER, L. et al. ZeroCostDL4Mic: an open platform to simplify access and use of Deep-Learning in Microscopy. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 2276, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22518-0.

Anexos

FIGURA 01

FIGURA 02

CÓDIGO: SB0180

AUTOR: HERICK JOSE CUNHA CHAVES

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Efeitos do topiramato sobre parâmetros espermáticos de ratos

Resumo

Poucos estudos têm investigado os efeitos do topiramato sobre a fertilidade masculina, sobretudo em relação à produção espermática testicular e à função epididimária. O presente estudo avaliou os efeitos do fármaco sobre parâmetros espermáticos de ratos Wistar tratados oralmente com topiramato (40 ou 160 mg/kg) por 21 dias. Foram analisados a produção diária de espermatozoides, o número de espermátides e espermatozoides em diferentes regiões do epidídimo, além do tempo de trânsito espermático. Os resultados demonstraram que, na dose de 160 mg/kg, o topiramato reduziu significativamente o número de espermátides e a produção diária de espermatozoides, indicando prejuízo na espermatogênese testicular. Na porção cabeça/corpo do epidídimo, observou-se redução significativa do número de espermatozoides apenas na dose mais elevada. Já na cauda, o número de espermatozoides permaneceu semelhante entre os grupos; contudo, o tempo de trânsito espermático foi significativamente aumentado em ambas as doses testadas, sugerindo alteração funcional no epidídimo. Em conclusão, os dados indicam que o topiramato pode comprometer a capacidade reprodutiva em ratos, por reduzir a produção espermática testicular e alterar o tempo de trânsito espermático no epidídimo, sendo esses efeitos mais evidentes em doses mais altas.

Palavras-chave: Topiramato. epidídimo. parâmetros espermáticos. fertilidade masculina.

TITLE: Effects of topiramate on sperm parameters in rats

Abstract

Few studies have investigated the effects of topiramate on male fertility, particularly regarding testicular sperm production and epididymal function. This study evaluated the effects of the drug on sperm parameters in Wistar rats orally treated with topiramate (40 or 160 mg/kg) for 21 days. Daily sperm production, the number of spermatids and spermatozoa in different regions of the epididymis, as well as sperm transit time, were analyzed. Results showed that at the dose of 160 mg/kg, topiramate significantly reduced the number of spermatids and daily sperm production, indicating impairment of testicular spermatogenesis. In the caput/corpus of the epididymis, a significant reduction in sperm count was observed only at the higher dose. In the cauda, sperm number remained similar among groups; however, sperm transit time was significantly increased at both doses, suggesting a functional alteration in the epididymis. In conclusion, these findings indicate that topiramate can impair male fertility in rats by reducing testicular sperm production and altering sperm transit time, with effects being more pronounced at higher doses.

Keywords: Topiramate. epididymis. sperm parameters. male fertility.

Introdução

Poucos estudos avaliaram os efeitos do topiramato sobre a fertilidade masculina, principalmente considerando parâmetros espermáticos testiculares (produção diária de espermatozoides) e epididimários (tempo de trânsito e concentração de espermatozoides). O epidídimo é um importante órgão relacionado à maturação e transporte de espermatozoides. Além disso, 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 (prostaglandinas, NO), hormonais (testosterona, estrógeno) e neuronais (acetilcolina, noradrenalina) (Elfgen et al., 2018). É também demonstrado que alterações na atividade motora do ducto epididimário induzida por fármacos pode ter importantes consequências negativas sobre parâmetros espermáticos (quantidade de espermatozoides no epidídimo, motilidade, morfologia etc) (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 o topiramato possui ações anti-androgênicas (Otoom et al., 2004), anticolinérgicas (Palmieri et al., 2000) e bloqueadoras de canais de cálcio (Sprenger et al., 2018), podemos conjecturar que este fármaco pode alterar a atividade motora do ducto epididimário, gerando alterações na quantidade e qualidade dos espermatozoides armazenados no epidídimo e, por conseguinte, produzindo efeitos antifertilidade. Desta forma, este estudo será conduzido com o intuito de avaliarmos os possíveis efeitos do topiramato sobre parâmetros espermáticos usados como indicadores de fertilidade. Ademais, este trabalho se faz relevante pois pode preencher lacunas no conhecimento relacionadas aos efeitos do topiramato sobre a saúde reprodutiva masculina, uma vez que tal agente é comumente usados por adultos epiléticos em idade reprodutiva (Kanner & Bicchi, 2022). Em posse de tais informações, pode-se direcionar um melhor tratamento antiepilético, evitando possíveis efeitos adversos sobre a fertilidade masculina.

Metodologia

Animais: Foram usados, neste estudo, ratos Wistar com 3-4 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 ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). 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 feitos de acordo com as recomendações da Lei no 11.794 de 08/10/2008 (Lei Arouca) e somente após a aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo 046/2024).

Tratamento, grupos experimentais e eutanásia dos animais: Os ratos foram separados aleatoriamente em grupos experimentais e tratados oralmente (via gavagem) por 21 dias com topiramato 40 ou 160 mg/Kg. Os animais controle receberam solução salina pela mesma via e volume que o animal tratado. As doses de topiramato usadas em nosso estudo são equivalentes às doses usadas em humanos (dose mínima eficaz é 200-400 mg ao dia. Alguns pacientes eventualmente poderão necessitar de doses de até 1600 mg por dia, que é a dose máxima; vide bula do medicamento). Assim, considerando um humano de 60 kg e aplicando-se a fórmula Dose equivalente animal = Dose equivalente a humanos x 6,2 (fator de correção

para ratos) (Nair & Jacob, 2016), obtém-se, aproximadamente, as doses escolhidas para a condução do estudo.

Determinação de parâmetros espermáticos: Os testículos e os epidídimos dos animais tratados com topiramato ou controle foram isolados e processados para a determinação da produção diária, trânsito espermático e concentração de espermatozoides. Para a avaliação da produção diária de espermatozoides, o testículo dos animais tratados ou controle foi decapsulado, pesado e homogeneizado 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 espermatozoides, o número de espermátides (por testículo) foi 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 com topiramato 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 espermatozoides em cada porção do epidídimo pela respectiva produção diária de espermatozoides.

Análise estatística: Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A comparação entre os grupos se deu por meio da Análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida do pós-teste de Dunnet. Cada grupo apresenta um n de 7 animais.

Resultados e Discussões

Resultados: O tratamento com topiramato promoveu alterações significativas nos parâmetros espermáticos testiculares e epididimários, sobretudo na dose mais elevada (160 mg/kg) (Tabela 1). O número de espermátides por testículo foi semelhante entre o grupo controle e o grupo tratado com 40 mg/kg de topiramato, mas apresentou redução significativa no grupo topiramato 160 mg/kg ($p < 0,05$). O mesmo padrão foi observado para o número de espermátides por grama de testículo, sem diferença no grupo topiramato 40 mg/kg em relação ao controle, mas com redução significativa no grupo topiramato 160 mg/kg. A produção diária de espermatozoides, tanto por testículo quanto por grama de testículo, também se manteve semelhante entre controle e o grupo tratado com topiramato 40 mg/kg, mas foi significativamente reduzida no grupo topiramato 160 mg/kg ($p < 0,05$) (Tabela 1). Na região da cabeça/corpo do epidídimo, o número de espermatozoides por testículo não diferiu entre o controle e o grupo tratado com topiramato 40 mg/kg, mas foi significativamente menor no grupo topiramato 160 mg/kg. O número de espermatozoides por grama de testículo e o tempo de trânsito espermático não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Na região da cauda do epidídimo, o número de espermatozoides por testículo e por grama de testículo foi semelhante entre os grupos experimentais. Contudo, o tempo de trânsito foi significativamente maior nos animais tratados com topiramato 40 mg/kg e 160 mg/kg em comparação ao controle ($p < 0,05$). Em conjunto, o tratamento com topiramato reduziu significativamente a espermatogênese testicular e o número de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo apenas na dose de 160 mg/kg, enquanto prolongou o tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo em ambas as doses.

Discussão: Os resultados do presente estudo avaliaram os efeitos do topiramato sobre parâmetros espermáticos quantitativos testiculares e epididimários de ratos. Em síntese, o fármaco em questão apresenta potencial para comprometer a fertilidade masculina, sobretudo na dose mais elevada (160 mg/kg). O topiramato foi capaz de induzir alterações negativas significativas na espermatogênese, evidenciadas pela redução no número de espermátides e na produção diária de espermatozoides apenas na dose de 160 mg/kg. Esses efeitos podem estar associados à ação anti-androgênica do fármaco (Otoom et al., 2004), a qual influencia negativamente a produção de espermatozoides. Adicionalmente, estudos prévios demonstram que o topiramato pode aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio e reduzir enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (Cárdenas-Rodríguez et al., 2013), o que pode comprometer diretamente a funcionalidade germinativa testicular. Contudo, mais investigações são necessárias para esclarecer os mecanismos específicos envolvidos. Observou-se ainda uma diminuição significativa do número de espermatozoides na região da cabeça/corpo apenas na dose de 160 mg/kg, sugerindo que tais alterações possam estar relacionadas a fatores androgênicos, uma vez que o epidídimo depende desses hormônios para manter suas funções plenas (Weigel et al., 2024). Na cauda do epidídimo, embora não tenha havido diferença no número de espermatozoides entre os grupos, verificou-se um aumento significativo no tempo de trânsito espermático em ambas as doses de topiramato. O aumento no tempo de trânsito indica lentificação do transporte dos espermatozoides (Bellentani et. al., 2011), podendo ser uma consequência indireta de alterações funcionais do epidídimo relacionados a ação anti-androgênica do topiramato (Otoom et al., 2004) ou ações diretas deste fármaco sobre atividade motora do ducto epididimário. Esta última hipótese está sendo avaliada atualmente por nosso grupo de pesquisa.

Conclusão

Portanto, os parâmetros espermáticos testiculares e epididimários avaliados neste estudo indicam que o topiramato, especialmente na dose de 160 mg/kg, pode comprometer a capacidade reprodutiva masculina ao afetar tanto a produção espermática quanto a dinâmica de trânsito no epidídimo, sendo este último efeito evidente já em doses mais baixas.

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. <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

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>

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>

Nair, A., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>

Otoom, S., Batieneh, H., Hassan, Z., & Daoud, A. (2004). Effects of long-term use Topiramate on fertility and growth parameter in adult male rats. *Neuro Endocrinology Letters*, 25(5), 351–355. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580169>

Palmieri, C., Kawasaki, H., & Avoli, M. (2000). Topiramate depresses carbachol-induced plateau potentials in subicular bursting cells. *Neuroreport*, 11(1), 75–78. <https://doi.org/10.1097/00001756-200001170-00015>

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>

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>

Sprenger, T., Viana, M., & Tassorelli, C. (2018). Current Prophylactic Medications for Migraine and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics*, 15(2), 313. <https://doi.org/10.1007/S13311-018-0621-8>

Vidal JD, Whitney KM. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis*. 2014 Dec 31;4(2):e979099. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4581048/> Weigel Muñoz M, Cohen DJ, Da Ros VG, González SN, Rebagliati Cid A, Sulzyk V, Cuasnicu PS. Physiological and pathological

aspects of epididymal sperm maturation. Mol Aspects Med. 2024 Dec;100:101321.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39340983/>

Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Rivera-Espinosa L, Romero-Toledo A, Sampieri A 3rd, Ortega-Cuellar D, Montesinos-Correa H, Floriano-Sánchez E, Carmona-Aparicio L. Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:598493.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3877618/>

Anexos

Tabela 1 – Parâmetros espermáticos quantitativos de ratos expostos ao tratamento oral (via gavagem) com topiramato 40 mg/kg e 160 mg/kg ou veículo livre de fármaco (controle) por 21 dias.

CÓDIGO: SB0182

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 como um dos maiores problemas que afetam a saúde física e mental. Trata-se de uma resposta física, psíquica e hormonal do organismo diante de situações que exigem adaptação e podem desequilibrar a homeostase. No contexto universitário, o estudante é exposto a estressores específicos, como provas, carga de estudos, demandas do curso, pressão familiar e concorrência. Este estudo investigou a resposta cardiovascular e emocional de estudantes de Biomedicina da UFRN frente a dois tipos de avaliação: prova escrita e gincana. Foram registrados valores de pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e estado de ansiedade (IDATE) antes e após as atividades, considerando as fases basal, pré-teste, pós-teste e recuperação. Os resultados mostraram aumento da pressão arterial sistólica na prova escrita e da frequência cardíaca na gincana, além de variações no estado de ansiedade em ambos os testes. Em geral, os maiores valores das variáveis cardiovasculares e emocionais ocorreram na fase pré-teste, com retorno próximo ao basal após a finalização. Esses achados sugerem que a expectativa frente às avaliações é mais estressante do que a própria atividade, evidenciando ajustes fisiológicos voltados à adaptação do indivíduo a essas situações.

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 major problems affecting physical and mental health. It is a physical, psychological, and hormonal response of the body to situations that require adaptation and may disrupt homeostasis. In the university context, students are exposed to specific stressors such as exams, study load, course demands, family pressure, and competition. This study investigated the cardiovascular and emotional responses of Biomedicine students at UFRN when exposed to two types of assessments: written test and quiz. Systolic and diastolic blood pressure, heart rate, and anxiety levels (IDATE) were recorded before and after the activities, considering baseline, pre-test, post-test, and recovery phases. Results showed an increase in systolic blood pressure during the written test and higher heart rate during the quiz, along with variations in anxiety levels in both assessments. Overall, the highest cardiovascular and emotional values occurred in the pre-test phase, with a return close to baseline after completion. These findings suggest that the anticipation of

assessments is more stressful than the activity itself, highlighting physiological adjustments aimed at adapting the individual to such situations.

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 significativa 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. A maioria 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. A investigação 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 (A-estado): o sujeito indica como se sente em um determinado 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 Traço-Estado 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 Ansiedade-IDATE);

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: $110,67 \pm 0,26$ mmHg, pré-teste: $117,53 \pm 3,06$ mmHg, pós-teste: $113,50 \pm 3,02$ mmHg e recuperação: $110,13 \pm 2,09$ 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 arterial diastólica na prova escrita obtivemos os seguintes valores: $73,60 \pm 1,70$ mmHg, na fase basal, $76,43 \pm 1,58$ mmHg na fase pré-teste, $76,10 \pm 2,03$ mmHg na fase pós-teste e $74,27 \pm 2,69$ mmHg 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. (Friedman ANOVA = 4,496; $p \geq 0,05$). Na fase basal foi de $72,30 \pm 2,44$ bpm, na pré-teste de $74,13 \pm 2,37$ bpm, no pós-teste de $73,0 \pm 2,74$ bpm e na recuperação foi $71,07 \pm 2,61$ 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: $115,67 \pm 3,11$ mmHg na fase basal, $117,00 \pm 3,38$ mmHg na pré-teste, $117,73 \pm 3,42$ mmHg na pós-teste e $114,53 \pm 3,03$ 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: $77,80 \pm 3,51$ bpm na fase basal, $79,60 \pm 3,10$ bpm na pré-teste, $76,93 \pm 3,29$ bpm na pós-teste e $73,86 \pm 2,64$ 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 post-hoc 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 PA sistólica 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 vasoconstrição 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 significativa 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](https://doi.org/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, I.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 combat casualty simulation. Psychoneuroendocrinology. 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 enfermagem 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 Português. Revista Galego-Portuguesa de Psicoloxía e Educacion. v.10 (8), 2003

Sahão F.T e Nádia K.. Adaptação e saúde mental do estudante universitário: Revisão sistemática da literatura. Psicologia Escolar e Educacional, 25: e224-238, 2021.

Samulski, M.D. Psicologia do Esporte: Manual para a Educação Física, Psicologia e Fisioterapia. Barueri, SP: Editora Manole, 2002.

Santos, Fernando et al. Estresse em estudantes de cursos preparatórios e de graduação em medicina. Revista Brasileira de Educação Médica [Internet] 2017

Sapolsky, R. M. Endocrinology of the Stress- Response. 2002. Em: J. B. Becker, S. M. Breedlove, D. Crews e M. M. McCarthy. Behavioral Endocrinology. 2a. Edição. The MIT Press. Cambridge, Londres. Pp. 409-449

Sarid, O., Anson, O. & Bentov, Y. Reações dos alunos a três exames típicos em ciências da saúde. Adv Health Sci Educ Theory Pract 10, 291–302, 2005.

Shaw DL, Wedding D, Zeldow PB, Diehl N. Special Problems of Medical Students: Cap 6. In Wedding D, eds. Behavior & Medicine. Hogrefe Publishing [online]. 2006.

Smyth J, Ockenfels MC, Porter L, Kirschbaum C, Hellhammer DH, Stone AA. Stressors and mood measured on a momentary basis are associated with salivary cortisol secretion. Psychoneuroendocrinology. May;23(4):353-70. 1998.

Souza J.P.A, Demenech L.M, Dumith S,E Neiva-Silva L. Sintomas de ansiedade generalizada entre estudantes de graduação: prevalência, fatores associados e possíveis consequências. Jornal Brasileiro de Psiquiatria, v. 71, p. 193-203, 2022.

Toews C, Lockyer J, Dobson D, Simpson E, Brownell A, Brenneis F. Analysis of stress levels among medical students, residents and graduate students at four Canadian schools of medicine. Academic Medicine.; 72(11):997-1002. 1997

Vasconcelos, Suzana. Efeitos dos transtornos de ansiedade nas doenças cardiovasculares: uma revisão integrativa. Revista Eletrônica Acervo Médico, v. 1, n. 1, p. e9014, outubro, 2021.

CÓDIGO: SB0186

AUTOR: GABRIELA DE ARAUJO CAMARA SOBRAL

ORIENTADOR: RAQUEL CORDEIRO THEODORO

TÍTULO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DERMATOFITOSE E ESPOROTRICOSE EM PACIENTES ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES, NATAL, RN

Resumo

As dermatofitoses são micoses cutâneas causadas por fungos dermatófitos, comuns em todo o mundo. A infecção ocorre por contato com esporos e manifesta-se como lesões superficiais. As espécies *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* são os principais agentes em humanos. A emergente resistência à terbinafina, antifúngico amplamente usado no tratamento, destaca a importância do diagnóstico espécie-específico, para auxiliar em estudos futuros de resistência. Já a esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix*, transmitidas principalmente via hospedeiro felino infectado e representa um problema de saúde pública no país. Diferentes espécies possuem diferentes perfis de virulência e de susceptibilidade à antifúngicos, por isso a importância do diagnóstico específico. Neste trabalho, foi feito o diagnóstico molecular de espécies de fungos dermatófitos e *Sporothrix* em pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Onofre Lopes, comparando métodos moleculares, fenotípicos e por MALDI-TOF. A metodologia envolveu isolamento fúngico, microcultivo, PCR e sequenciamento. Apesar do pequeno número de amostras analisadas, o método de diagnóstico molecular apresentou resultados diferentes do diagnóstico fenotípico em alguns isolados. Os resultados do sequenciamento demonstraram que a espécie *T. rubrum* foi a mais frequente e, com relação ao *Sporothrix*, todos os isolados pertencem à espécie *S. brasiliensis*.

Palavras-chave: Dermatofitose. Trichophyton. Diagnóstico molecular. Esporotricose.

TITLE: MOLECULAR DIAGNOSIS OF DERMATOPHYTOSIS AND SPOROTRICOSES IN PATIENTS TREATED AT THE DERMATOLOGY OUTPATIENT CLINIC OF THE ONOFRE LOPES UNIVERSITY HOSPITAL, NATAL, RN

Abstract

Dermatophytoses are cutaneous mycoses caused by dermatophyte fungi, common throughout the world. Infection occurs through contact with spores and manifests as superficial lesions. The species *T. rubrum*, *T. interdigitale*, and *T. mentagrophytes* are the main agents in humans. The emerging resistance to terbinafine, an antifungal widely used in treatment,

highlights the importance of species-specific diagnosis to aid in future studies of resistance. Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by fungi of the genus *Sporothrix*, transmitted mainly via infected feline hosts, and represents a public health problem in Brazil. Different species have different virulence and susceptibility profiles to antifungals, hence the importance of specific diagnosis. In this study, molecular diagnosis of dermatophyte and *Sporothrix* species was performed in patients treated at the dermatology outpatient clinic of the Onofre Lopes University Hospital, comparing molecular, phenotypic, and MALDI-TOF methods. The methodology involved fungal isolation, microculture, PCR, and sequencing. Despite the small number of samples analyzed, the molecular diagnostic method presented different results from the phenotypic diagnosis in some isolates. The sequencing results showed that the species *T. rubrum* was the most frequent, and with regard to *Sporothrix*, all isolates belonged to the species *S. brasiliensis*.

Keywords: Dermatophytosis. Trichophyton. Molecular diagnosis. Sporotrichosis.

Introdução

As dermatofitoses são micoses cutâneas causadas por fungos dermatófitos, afetando pele, pelos e unhas. Também são chamadas de tineas, a depender do local da lesão, como tinea capitis, tinea corporis e tinea pedis (Jartarkar *et al.*, 2021). A infecção ocorre através do contato direto com esporos do hospedeiro ou do ambiente contaminado, manifestando-se como lesões superficiais nos tecidos queratinizados, entretanto, a depender do estado da competência imunológica do indivíduo, a infecção pode se tornar invasiva e causar complicações (Begum *et al.*, 2020).

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos e queratinofílicos e possuem, atualmente, 7 gêneros, sendo eles *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum* e *Arthroderma* (Moskaluk *et al.*, 2022). Dentre eles, as espécies *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* são os principais agentes causadores da doença. A correta identificação de espécies no diagnóstico das dermatofitoses é essencial para estudos epidemiológicos e de vigilância da resistência a antifúngicos, em especial terbinafina, itraconazol ou griseofulvina, que são os mais usados (Shen *et al.*, 2021).

Já a esporotricose é uma micose subcutânea causada pela infecção de fungos do gênero *Sporothrix* spp, que pode acometer humanos e animais, e ocorre pela inoculação traumática via hospedeiro felino infectado, através de seus arranhões ou mordidas, ou por solo contaminado. Caracteriza-se por lesões na pele e tecidos subcutâneos de acordo com a competência imune do hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2022). A forma sistêmica da micose é rara e está associada a quadros de imunossupressão (Queiroz-Telles *et al.*, 2019). Essa zoonose está presente em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais e, no Brasil, onde casos de esporotricose ocorrem em 25 dos 26 estados, a doença se tornou um problema de saúde pública bastante negligenciado (Rodrigues *et al.*, 2020).

O gênero *Sporothrix* spp possui 53 espécies. As de interesse clínico são divididas em um clado clínico e um ambiental. As espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* fazem parte do clado clínico, por serem as espécies patogênicas mais recorrentes, e *S. chilensis*, *S. mexicana* e *S. pallida*, por serem eventuais patógenos, são do clado ambiental (Rodrigues *et al.*, 2020). Assim como no caso das dermatofitoses o correto reconhecimento de espécies é imprescindível para a prática clínica, uma vez que há diferenças de virulência e

susceptibilidade a antifúngicos entre as mesmas (Rodrigues *et al.*, 2014).

Atualmente, o método mais utilizado para o diagnóstico das dermatofitoses e esporotricoses é a microscopia da cultura fúngica, que, apesar de ser rápido, não é um método específico e pode ocorrer falsos negativos. Além disso, o pleomorfismo e o lento crescimento dos dermatófitos contribuem para a dificuldade de serem identificados e, com relação aos *Sporothrix*, a microscopia não permite a identificação da espécie, o que pode ter implicações na escolha da terapia antifúngica em diferentes grupos de risco. Desse modo, métodos moleculares, como a PCR, têm sido utilizados para identificação e diagnóstico de dermatofitoses e esporotricose, tendo em vista sua alta especificidade (Lin *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2015). No Brasil, um estudo demonstrou a diferença entre os métodos, onde isolados previamente identificados como *T. mentagrophytes* através da microscopia de cultura, 81,4% das cepas foram classificadas como *T. interdigitale*, 17,3% como *T. rubrum* e 1,3% como *T. tonsurans* por meio do sequenciamento da região ITS (Koehler *et al.*, 2021).

Assim, o objetivo deste trabalho foi o diagnóstico molecular de dermatofitose e esporotricose em pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), em Natal, Rio Grande do Norte, visando um diagnóstico preciso que auxilie no tratamento, além de estudos epidemiológicos, ainda ausente, no estado.

Metodologia

- Aprovação no comitê de ética

O atual plano de trabalho conta com a aprovação do comitê de ética em pesquisa do HUOL, CAAE 70154823.5.2012.5292.

- Isolamento fúngico e identificação fenotípica dos dermatófitos

As amostras biológicas de pacientes atendidos no HUOL com suspeita de dermatofitose foram semeadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol e em meio Ágar Mycosel, enviadas ao Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical (LAMIM - IMT) e incubadas em estufas a 25°C e a 37°C. A partir do crescimento dos fungos, foram feitas análises fenotípicas por microscopia e, quando necessário, foi realizado o microcultivo (cultivo em lâmina) em meio Ágar Batata Dextrose (BDA), para melhor visualização e identificação das estruturas fúngicas.

- Isolamento fúngico dos fungos do gênero *Sporothrix* spp.

As amostras previamente identificadas como pertencentes ao gênero *Sporothrix* spp. foram enviadas pelo Professor Dr. Felipe Guerra (UFPB) por meio do método de preservação Cstellani e, no LAMIM - IMT, elas foram semeadas em meio Ágar Mycosel e mantidas posteriormente em meio ASD a 25°C.

- Identificação pelo MALDI-TOF dos dermatófitos (bruker)

Os fungos dermatófitos foram semeados em meio ASD e com 3-4 dias de crescimento (antes de esporularem) foram raspados com um palito de dente e foi realizada uma extração direta a partir do esfregaço direto na placa de leitura (Target Plate). O esfregaço foi coberto com 1 µL

de Ácido Fórmico 100%, seco naturalmente e depois coberto com 1 µL de HCCA (matriz) e seco novamente antes da leitura pelo MALDI-TOF. Essa etapa foi realizada com o auxílio do Professor Dr. Thales Domingos.

- Extração de DNA

Para a identificação molecular, os DNAs dos fungos dermatófitos e *Sporothrix* foram extraídos seguindo o protocolo do Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit da empresa Norgen Biotek Corp.

- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram realizadas PCRs da região ITS, utilizando os primers ITS1 ou ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990) para identificação das espécies de fungos dermatófitos e, para a identificação genotípica dentro do gênero *Trichophyton*, o gene codificador do fator de alongamento da tradução (TEF-1α) também foi amplificado por meio dos primers EFDermF e EFDermR (Mirhendi *et al.*, 2015). Já para a identificação das espécies de *Sporothrix* foram realizados PCRs utilizando primers específicos para o gene da calmodulina (Rodrigues *et al.*, 2015). As reações de amplificação seguiram as recomendações do fabricante da TaqDNA Polimerase da Promega (GoTaq).

Tanto para a região ITS como para o gene TEF-1α e da calmodulina, a termociclagem realizada foi a seguinte: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A identificação da espécie de *Sporothrix* foi determinada a partir do tamanho do amplicon do PCR espécie-específico do gene da calmodulina, visualizado no gel de eletroforese.

- Purificação dos amplicons

Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o kit GFX PCR DNA da GEHealthcare, seguindo as instruções do fabricante. Logo em seguida, os amplicons foram quantificados no Nanodrop.

- Sequenciamento e análise de sequências

As reações de sequenciamento e eletroforese em capilar foram realizadas na MACROGEN/Coreia do Sul e na Unesp/Botucatu. Logo em seguida, as sequências foram alinhadas por meio da ferramenta Blastn para análise da similaridade com sequências de diferentes espécies de dermatófitos, de referência do GenBank, para, assim, definir a espécie do fungo. O alinhamento foi feito no programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Resultados e Discussões

RESULTADOS:

- Isolamento fúngico e identificação fenotípica dos dermatófitos

Em continuação do plano de trabalho anterior, foram recebidas 13 amostras biológicas e todas foram semeadas em ASD com cloranfenicol e em Ágar Mycosel. Destas, 5 foram

identificadas fenotipicamente como dermatófitos e seus sítios de coleta estão descritos na tabela 1.

A identificação fenotípica foi realizada com base nos aspectos macroscópicos e microscópicos das colônias. Desse modo, em relação a macroscopia, nos isolados identificados como *T. rubrum*, VigD-14, VigD-018A, VigD-23 e VigD-27, a textura era algodonosa, com pregas radiais, de cor branca, que se torna avermelhada nas bordas da colônia com o passar do tempo e no reverso apresenta um pigmento avermelhado que se difunde no meio de cultura. Já a amostra identificada como *T. mentagrophytes*, VigD-18B, apresentou, em meio ASD, colônias de textura furfurácea ou pulverulenta, formando círculos concêntricos, de coloração branco-amarelado ou castanho-avermelhado e o reverso com um pigmento castanho ou avermelhado. As imagens da macroscopia de todos os isolados estão representadas na figura 1.

Com relação a microscopia, nas amostras VigD-14, VigD-018A, VigD-23 e VigD-27, identificadas como *T. rubrum*, foram vistos a presença de microconídios piriformes dispostos perpendicularmente à hifa e poucos macroconídios. Já a amostra VigD-18B, identificada como *T. mentagrophytes*, apresentou em sua microscopia clamidospóros, artroconídios, macroconídios septados em forma de “vagem”, microconídios e hifas ramificadas. As imagens da microscopia estão representadas na figura 2.

Nas demais amostras, obteve-se o crescimento de fungos contaminantes, como *Aspergillus*, de leveduras e até mesmo de bactérias.

- Identificação pelo MALDI-TOF dos dermatófitos (bruker)

Através da identificação por MALDI-TOF, o isolado VigD-14 foi classificado como pertencente a espécie *T. mentagrophytes*, enquanto VigD-18A, VigD-18B, VigD-23 e VigD-27 como *T. rubrum*. Os resultados estão descritos na tabela 2.

- Extração de DNA

A extração foi realizada com todas as amostras, tanto dos dermatófitos como *Sporothrix*, e obteve-se DNAs íntegros e concentrados, visualizados na eletroforese em gel de agarose a 1%, como ilustrado na figura 3.

- PCR e purificação dos amplicons

Os PCRs da região ITS e do gene TEF-1 α para cada uma das amostras de dermatófitos que tiveram seu DNA extraído funcionaram e observou-se bandas em torno de 700 pb a 800 pb em todas as reações (Figura 4). Em seguida, os produtos de PCR foram purificados e quantificados (Figura 5) para posterior sequenciamento.

Com relação aos fungos *Sporothrix*, todos os 59 isolados enviados pelo Professor Dr. Felipe Guerra (UEPB) foram amplificados com os primers específicos do gene da calmodulina (Rodrigues *et al.*, 2015) e, em todos, foram observadas bandas do tamanho de 469 pb quando utilizado os primers SbraF e SbraR, específicos para *S. brasiliensis*, confirmando a espécie dos fungos (Figura 6).

- Sequenciamento e análises de sequências

As amostras enviadas para o sequenciamento na UNESP/Botucatu foram: VigD-14, VigD-18A, VigD-18B, VigD-23 e VigD-27. Após o recebimento das sequências, a análise de similaridade foi feita com outras espécies de dermatófitos disponíveis no banco de dados a partir da ferramenta Blastn. Essa análise demonstrou a espécie de dermatófito a que pertence cada amostra, tanto a partir da região ITS como da região TEF-1 α . Os resultados do sequenciamento estão descritos nas tabelas 3 e 4.

DISCUSSÃO:

Ao total do projeto, obtivemos 25 amostras com suspeita de dermatofitose oriundas do ambulatório de dermatologia do HUOL. Destas amostras, 10 foram raspados de pele de diversas regiões, como membros superiores, inferiores, virilha, nádegas, 8 foram raspados de unha e 5 raspados do couro cabeludo. Dois isolados, VigD-14 e VigD-18, foram obtidos a partir de dois sítios anatômicos: raspado de unha e pé. Destas, obtivemos o crescimento de fungos dermatófitos em apenas 12, todos pertencentes ao gênero *Trichophyton*, o mais frequente nesse tipo de infecção (de Oliveira *et al.*, 2021).

Um dos principais objetivos deste plano de trabalho foi o de comparar os resultados das análises morfológicas com a identificação molecular usando os marcadores mais utilizados para estes gêneros de fungos, a região ITS e o gene TEF-1 α (Salehi *et al.*, 2021). A região ITS, o espaçador transcrito interno, está localizada entre os genes 18S e 28S do DNA ribossômico e é variável dentro das espécies, sendo frequentemente usada para taxonomia de espécies e gêneros (de Hoog *et al.*, 2017). Já o gene TEF-1 α codifica uma parte da maquinaria de tradução de proteínas, consiste em uma cópia única e apresenta um elevado nível de polimorfismo de sequência entre espécies relacionadas (Mirhendi *et al.*, 2015).

O diagnóstico molecular, através do resultado do sequenciamento, mostrou certa divergência em relação ao diagnóstico fenotípico, o que está de acordo com o que é encontrado na literatura (Koehler *et al.*, 2021), uma vez que o sequenciamento é uma técnica muito mais sensível e específica que a microscopia e esta, por sua vez, depende muito do treinamento e qualificação do profissional (Moskaluk *et al.*, 2022). Dos 12 isolados que foram submetidos ao sequenciamento, 7 apresentaram resultados iguais aos da identificação fenotípica, enquanto 5 foram identificados como espécies distintas. Além disso, 5 isolados foram identificados como pertencentes a mesma espécie quando comparados os três métodos: fenotípico, molecular e MALDI-TOF, como demonstrado na tabela 5.

Com relação aos sítios de coleta, uma revisão de literatura publicada em 2022 classifica as dermatofitoses em humanos com base na localização anatômica da lesão e determina, para cada tipo de tinea, as espécies de fungos mais prevalentes que causam a infecção (Moskaluk *et al.*, 2022). A tinea capitis, ou seja, lesões que acometem o couro cabeludo, tem como principal agente etiológico o *T. tonsurans*. Em nossas amostras, as únicas duas com o sítio de coleta no couro cabeludo foram VigD-02 e VigD-11, que demonstraram, após o sequenciamento, pertencer a espécie *T. tonsurans* (Tabela 5). Além disso, o artigo também mostra que a principal espécie envolvida com tinea pedis, tinea manuum e tinea cruris é o *T. rubrum*, e nossos isolados VigD-03, VigD-07A, VigD-07B, VigD-08, VigD-09, VigD-14, VigD-18A, VigD-23 e VigD-27, todos classificados como *T. rubrum* a partir da identificação molecular, tiveram como sítios de coletas raspados de lesões dos membros inferiores, superiores e da região da virilha (Tabela 5). Ademais, um artigo de revisão sobre onicomicoses publicado em 2020 releva que as principais espécies envolvidas com esta micose são *T. rubrum* e *T. interdigitale* (Gupta *et al.*, 2020). Em nossos isolados, o único identificado como *T. interdigitale*, VigD-18B, teve como sítio de coleta raspado de unha.

Essa análise demonstra como o resultado do diagnóstico molecular entra em consenso com o que é encontrado na literatura, reforçando sua especificidade e importância.

Do total dos isolados, 4 foram identificados como *T. mentagrophytes* através do diagnóstico fenotípico, porém, quando analisadas as sequências no programa Blastn, nenhuma amostra foi identificada como sendo pertencente a esta espécie. Uma foi identificada como *T. interdigitale* e, atualmente, há certa divergência na literatura se *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* são diferentes nomes para a mesma espécie ou se realmente são espécies distintas (Švarcová *et al.*, 2023). Pelo sequenciamento, a região ITS e o gene TEF-1 α apresentaram concordância em relação a identificação da espécie de dermatófito para todos os isolados, onde a maioria foi identificado como *T. rubrum* (9), 2 como *T. tonsurans* e 1 como *T. interdigitale*. A prevalência de *T. rubrum* chama a atenção pois já foram descritos diversos casos e mecanismos de resistência a terbinafina, itraconazol e voriconazol, como mutações de ponto no gene esqualeno epoxidase e super expressão dos genes *TruMDR2* e *TruMDR3*, para esta espécie (Kruithoff *et al.*, 2024), o que mostra que a escolha de um método de diagnóstico mais sensível e específico é importante e pode influenciar no tratamento do paciente. Além disso, o resultado do diagnóstico molecular, em que destacou a presença de *T. rubrum* e *T. tonsurans*, está de acordo com o que foi encontrado no estudo realizado por Silvia-Rocha *et al.* (2017), no Rio Grande do Norte, entretanto ele realizou apenas a identificação clássica por métodos de cultura e microscopia. Assim, nosso estudo realizou pela primeira vez uma análise molecular de isolados clínicos de dermatófitos no estado.

Acerca do diagnóstico molecular dos isolados de *Sporothrix* enviados da UFPB, todas as 59 amostras foram identificadas como *S. brasiliensis*, que é a espécie mais prevalente no Brasil e tem um perfil mais zoofílico do que comparado com *S. schenckii*, pois está muito relacionada à transmissão da doença nos felinos. A espécie *S. brasiliensis* também possui um grande potencial de dispersão geográfica, e no Brasil, a região metropolitana do Rio de Janeiro sofre de uma epidemia de esporotricose e foi descrita como o possível centro de origem, de onde a doença se espalhou para outros estados da região sudeste, sul e nordeste (Rodrigues *et al.*, 2022). Além disso, estudos mostram que a identificação fenotípica pode levar a falsos resultados, reforçando a importância do diagnóstico molecular, uma vez que o diagnóstico preciso da esporotricose, incluindo a identificação do agente etiológico, é crucial para o sucesso do tratamento, especialmente em áreas onde diferentes espécies de *Sporothrix* coexistem (Xavier *et al.*, 2023).

Conclusão

Dentre os resultados apresentados neste plano de trabalho, é importante destacar a diferença entre o diagnóstico fenotípico e o diagnóstico molecular para as dermatofitoses. O sequenciamento da região ITS e do gene TEF-1 α mostraram que a espécie *T. rubrum* foi a mais frequente. Esta espécie está associada a casos de resistência a antifúngicos, especialmente a terbinafina, principal droga utilizada no tratamento das dermatofitoses. Já com relação ao diagnóstico molecular dos *Sporothrix*, a espécie de todos os isolados foi *S. brasiliensis*.

Referências

- BEGUM, J. et al. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. *Journal of Basic Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 293–303, 31 jan. 2020.
- DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, v. 182, n. 1, p. 5–31, 2017.
- DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. The prevalence of dermatophytoses in Brazil: a systematic review. *Journal of Medical Microbiology*, v. 70, n. 3, 1 mar. 2021.
- GUPTA, A. K. et al. Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 34, n. 9, 1 abr. 2020.
- JARTARKAR, S. R. et al. Pathogenesis, immunology and management of dermatophytosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 1, p. 39, 2021.
- KOEHLER, A. et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of 75 clinical isolates of *Trichophyton* spp. from southern Brazil. *Journal De Mycologie Medicale*, v. 31, n. 4, p. 101201–101201, 1 dez. 2021.
- KRUITHOFF, C. et al. Dermatophyte Infections Worldwide: Increase in Incidence and Associated Antifungal Resistance. *Life*, v. 14, n. 1, p. 1, 1 jan. 2024.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2 maio 2018.
- LIN, B. B. et al. Multiplex RT-PCR provides improved diagnosis of skin and nail dermatophyte infections compared to microscopy and culture: a laboratory study and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 101, n. 3, p. 115413, nov. 2021.
- MIRHENDI, H. et al. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Medical Mycology*, v. 53, n. 3, p. 215–224, 1 abr. 2015.
- MOSKALUK, A. E.; VANDEWOUDE, S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. *Pathogens*, v. 11, n. 9, p. 957, 23 ago. 2022.
- QUEIROZ-TELLES F., Buccheri R., Benard G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, p. 8, 11 jan. 2019.
- RODRIGUES, A.M., de Hoog, G.S., de Cássia Pires, D. et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, 23 abr. 2014.
- RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 12, p. e0004190, 1 dez. 2015.
- RODRIGUES A.M., Della Terra P.P., Gremião I.D., Pereira S.A, Orofino-Costa R., de Camargo Z.P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 813–842, 12 fev. 2020.

RODRIGUES, A.M., Gonçalves, S.S., de Carvalho, J.A., Borba-Santos, L.P., Rozental, S., Camargo, Z.P.d. 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.

SALEHI, Z.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Molecular Epidemiology, Genetic Diversity, and Antifungal Susceptibility of Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Human Dermatophytosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 4 jun. 2021.

ŠVARCOVÁ, M. et al. Defining the relationship between phylogeny, clinical manifestation, and phenotype for *Trichophyton mentagrophytes/interdigitale* complex; a literature review and taxonomic recommendations. *Medical Mycology*, v. 61, n. 5, p. myad042, 1 maio 2023.

SHEN, J. et al. The Emerging Terbinafine-Resistant *Trichophyton* Epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing? *Dermatology*, v. 238, n. 1, p. 60–79, 31 maio 2021.

SILVA-ROCHA, W. P.; DE AZEVEDO, M. F.; CHAVES, G. M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 27, n. 1, p. 57–64, mar. 2017.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, p. 315–322, 1990.

XAVIER, M. O. et al. *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, Therapy, and Recent Developments. *Journal of fungi*, v. 9, n. 9, 2023.

Anexos

Tabela 1. Descrição dos sítios de coleta de cada amostra biológica.

Figura 1. Macroscopia dos isolados VigD-14 (A), VigD-18A (B), VigD-18B (C), VigD-23 (D) e VigD-27(E).

Figura 2. Microscopia do isolado VigD-14 identificado como *T. rubrum* (A), microscopia do isolado VigD-18A identificado como *T. rubrum* (B) e microscopia do isolado VigD-18B identificado como *T. mentagrophytes* (C).

Tabela 2. Descrição do resultado da identificação dos dermatófitos pelo MALDI-TOF, com seus respectivos scores.

Figura 3. Eletroforeses das extrações de DNA dos isolados VigD-14, VigD-18A e VigD-18B (A), VigD-23 e VigD-27 (B) e alguns isolados de *Sporothrix* (C). Marcador de 1 kb.

Figura 4. Eletroforese da PCR da região ITS e TEF-1 α dos isolados VigD-02 e VigD-03. Marcador de 100 pb.

Figura 5. Eletroforese após a purificação da PCR da região ITS e TEF-1 α dos isolados VigD-14 e VigD-18A. Marcador Low DNA Mass Ladder.

Figura 6. Eletroforese da PCR do gene da calmodulina específico para *S. brasiliensis* de isolados de *Sporothrix*. Marcador de 100 pb.

Tabela 3. Resultado do sequenciamento da região ITS.

Tabela 4. Resultado do sequenciamento da região TEF-1 α .

Tabela 5. Comparação entre os resultados do diagnóstico fenotípico, diagnóstico molecular (através do sequenciamento da região ITS e do gene TEF-1 α) e do diagnóstico pelo MALDI-TOF de cada amostra, com seus respectivos sítios de coleta.

CÓDIGO: SB0191

AUTOR: AMANDA SILVEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: AURIGENA ANTUNES DE ARAUJO

TÍTULO: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA NANOEMULSÃO COM GEL DE QUITOSANA CONTENDO TRIANCINOLONA ACETONIDA

Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos biológicos de uma nova formulação de nanoemulsão em gel de quitosana associada à triancinolona acetamida (TA) em modelo experimental de úlcera traumática em ratos. Trata-se de um estudo pré-clínico, in vivo, com 104 ratos Wistar machos, submetidos à indução de úlcera na mucosa jugal esquerda e avaliados nos períodos de 3 e 7 dias. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais: Controle positivo (n=24), com úlcera tratada com veículo do gel; Grupo experimental 2 (n=8), animais sem úlcera e sem tratamento; Grupo experimental 3 (n=24), com úlcera tratada com gel de quitosana; Grupo experimental 4 (n=24), com úlcera tratada com gel contendo apenas TA; e Grupo experimental 5 (n=24), com úlcera tratada com gel contendo quitosana e TA. Em todos os grupos com úlcera, a mucosa jugal esquerda foi removida para análise. As avaliações incluíram evolução da área ulcerada, porcentagem de contração, análises histológicas por hematoxilina-eosina (inflamação, fibrose e áreas ulceradas), imunohistoquímica (Ki-67, FGF-2, KGF), detecção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α), biomarcadores de estresse oxidativo (MDA, GSH, SOD) e expressão gênica (NFRF2, NF κ B p65, eNOS, iNOS, VEGF) por RT-PCR. Os dados serão submetidos à análise estatística pelo GraphPad Prism 5.0, utilizando ANOVA seguida de pós-teste, com nível de significância de 5%. Este trabalho busca oferecer novas terapêuticas para o tratamento de úlceras orais.

Palavras-chave: Aftas, Triancinolona acetonida, Quitosana

TITLE: BIOLOGICAL EVALUATION OF A NANOEMULSION WITH CHITOSAN GEL CONTAINING TRIANCINOLONE ACETONIDE

Abstract

The present study aims to evaluate the biological effects of a new chitosan-based nanoemulsion gel formulation combined with triamcinolone acetonide (TA) in an experimental model of traumatic ulcers in rats. This is a preclinical, in vivo study involving 104 male Wistar rats, subjected to ulcer induction on the left buccal mucosa and evaluated at 3 and 7 days. Animals were distributed into experimental groups: Positive Control (n=24), with ulcers treated with the gel vehicle; Experimental Group 2 (n=8), healthy animals without treatment; Experimental Group 3 (n=24), with ulcers treated with chitosan gel; Experimental Group 4 (n=24), with ulcers treated with gel containing only TA; and Experimental Group 5 (n=24), with ulcers treated with chitosan and TA gel. In all ulcer groups, the left buccal mucosa was collected for analysis. Evaluations included ulcer area progression, percentage of contraction, histological analysis with hematoxylin-eosin (inflammation, fibrosis, and

ulcerated areas), immunohistochemistry (Ki-67, FGF-2, KGF), measurement of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α), oxidative stress biomarkers (MDA, GSH, SOD), and gene expression (NRF2, NF κ B p65, eNOS, iNOS, VEGF) by RT-PCR. Data will be statistically analyzed using GraphPad Prism 5.0, applying ANOVA followed by post-hoc tests, with a significance level of 5%. This study aims to provide new therapeutic approaches for the treatment of oral ulcers.

Keywords: Aphthous ulcers, Triamcinolone acetonide, Chitosan

Introdução

Os corticosteróides têm uma estrutura esquelética básica compreendendo 21 átomos de carbono dispostos em quatro anéis, modificações nesta estrutura básica levam ao desenvolvimento de compostos com potências variadas e diferentes efeitos adversos (SWEETMAN, 2009). Os corticosteroides são classificados como glicocorticoides (reguladores do metabolismo dos carboidratos) ou mineralocorticoides (reguladores do equilíbrio eletrolítico), tendo como escolha os glicocorticoides pela potente ação supressora sobre a inflamação (DE FREITAS; DE SOUZA, 2007).

A mucosa, cobrindo quase todas as superfícies orais, pode ser utilizada como local adesivo para prolongar a liberação do fármaco, resultando em melhor efeito terapêutico. Um sistema mucoadesivo de liberação de fármacos é uma grande preocupação como um dos métodos de liberação do composto ativo através das membranas mucosas. A liberação do fármaco na mucosa oral é dividida em dois mecanismos, ou seja: liberação prolongada do fármaco para dar um efeito terapêutico local, ou liberação rápida do fármaco para obter um efeito terapêutico sistêmico rapidamente (SUHARYANI et al., 2021).

A triancinolona acetona (TA) é um agonista sintético do receptor de glicocorticóide que se liga diretamente aos receptores intracelulares de glicocorticóide, fazendo com que o receptor se transloque para o núcleo e desencadeie um amplo espectro de respostas anti-inflamatórias. Em modelos animais, essas respostas incluem: produção de lipocortinas, que suprimem a liberação de ácido araquidônico pró-inflamatório das membranas plasmáticas, uma redução na infiltração de células imunes, provavelmente pela supressão do recrutamento de células imunes e ativação de células imunes e uma diminuição na permeabilidade vascular e proliferação vascular através da regulação negativa do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). (FUNG; SYED, 2022). Alguns trabalhos científicos foi observado no estudo da solubilização da triancinolona através das ciclodextrinas e co-solventes obtendo uma formação de complexo estável e aumentando a solubilidade da triancinolona base em meio aquoso, proporcionando uma boa absorção e biodisponibilidade (DE MEDEIROS et al., 2016).

A quitosana (CH) é obtida da desacetilação da quitina, polissacarídeo natural extraída das carapaças dos crustáceos. A CH é constituída pelos copolímeros β -(1 $\rightarrow$ 4)- Dglucosamina e β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina. Inúmeros sistemas tem sido desenvolvidos com a quitosana com a finalidade de modificar a 22 biodisponibilidade de fármacos, tais sistemas incluem micropartículas, hidrogéis, nanopartículas e membranas. Além disso, a quitosana possui propriedades importantes no tratamento de ulcerações, como antimicrobiano, antiulcerativo, cicatrizante, biocompatível e baixa toxicidade (NASCIMENTO, 2020).

Diante do exposto, poucos estudos vêm sendo realizados na tentativa de corrigir ou melhorar as características limitantes da TA. Para a elaboração de um novo fármaco deve-se pensar no sistemas de liberação a fim de melhorar sua estabilidade, aumentar a permanência no local de

ação, e consequentemente, otimizar sua eficácia terapêutica. Esse estudo tem a finalidade de avaliar os efeitos biológicos em modelo experimental de úlcera traumática em ratos de uma nanoemulsão em gel da quitosana com triancilona acetamida.

Metodologia

4.1 Caracterização do Estudo

Descrição pré-clínica, in vivo.

Justificativa do número de animais.

Critérios de inclusão e exclusão.

4.2 Local dos Experimentos

Laboratório de Farmácia Industrial para formulação.

Laboratório de Farmacologia para procedimentos experimentais e análises.

4.3 Produção e Caracterização do Gel

Formulação da nanoemulsão com quitosana e TA.

Referência à tese de doutorado de Nascimento (2020).

Parâmetros físico-químicos e mecânicos do gel.

4.4 Animais e Alojamento

Número total de animais, peso e idade.

Condições de alojamento, alimentação e temperatura.

Distribuição aleatória e justificativa estatística.

4.5 Grupos de Estudo

Detalhamento dos 10 grupos experimentais (3D e 7D), incluindo controles positivos e negativos, e grupos tratados com diferentes combinações de gel.

Distribuição dos animais para análises histológicas, bioquímicas e moleculares.

4.6 Protocolo Experimental

Procedimentos anestésicos e indução da úlcera.

Aplicação tópica do gel.

Monitoramento pós-operatório.

4.7 Eutanásia

Procedimento padronizado e coleta da mucosa jugal.

Distribuição das amostras para HE, imunohistoquímica, MDA e RT-PCR.

Controle negativo com mucosa contralateral.

4.8 Avaliação Diária

Peso corporal, consumo de água e alimento, observação do bem-estar.

4.9 Análise Comportamental

Teste de Campo Aberto: descrição da arena, tempo de observação e parâmetros medidos.

Escala de Grimace para avaliação de dor e desconforto.

4.10 Análise Macroscópica da Úlcera

Medição da área da úlcera (D e d), cálculo da área, correlações com o tempo e percentual de contração.

4.11 Estudo Morfológico

Fixação em formol, processamento histológico, cortes de 5 μ m.

Coloração Hematoxilina-Eosina.

Análise em microscopia óptica (aumentos de 40x, 100x e 400x).

Escore histológico adaptado de Cho et al.

4.12 Análise Imunohistoquímica

Cortes de 3,5 μ m, método enzimático estreptavidina-biotina.

Anticorpos utilizados: Ki-67, FGF-2, KGF.

Procedimentos de desparafinização, recuperação antigênica, incubação e revelação.

4.13 Marcadores de Estresse Oxidativo

Dosagem de MDA: metodologia detalhada.

Dosagem de GSH: homogeneização e leitura espectrofotométrica.

Estimativa de SOD: método de Beauchamp e Fridovich, cálculo de unidades enzimáticas.

4.14 Dosagem de Citocinas Inflamatórias

Homogeneização da mucosa, armazenamento à -80°C.

Ensaios de ELISA para IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α .

4.15 Análise de Expressão Gênica (RT-PCR)

Extração de RNA, síntese de cDNA.

Reações em tempo real para NFRF2, NF κ B P65, eNOS, iNOS, VEGF.

Método 2- $\Delta\Delta C_t$ para quantificação relativa.

4.16 Análise Estatística

Uso do GraphPad Prism 5.0.

Teste t de Student, ANOVA com pós-teste, Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

Determinação do tempo de cicatrização de 50% da úlcera.

Critério de significância: $p < 0,01$.

5. Resultados e Impactos Esperados

Redução da área ulcerada e do tempo de cicatrização.

Diminuição da inflamação, infiltração de células imunes, permeabilidade vascular.

Promoção da qualidade de vida dos animais (3Rs).

Produto economicamente viável devido à acessibilidade da quitosana.

Base científica para pesquisas futuras e potencial estudo clínico em humanos.

Divulgação em periódicos e congressos para fomentar conhecimento científico.

Resultados e Discussões

A aluna de Iniciação Científica concluiu o curso de formação em Manejo e Cuidado de Animais de Laboratório, adquirindo habilidades essenciais para atuação em pesquisas pré-clínicas. Durante o desenvolvimento do projeto, a aluna tem atuado diretamente no manejo dos animais, incluindo sedação, monitoramento pós-anestésico, aplicação tópica de fármacos, coleta de tecidos e acompanhamento do bem-estar animal.

Além disso, a aluna recebeu treinamento nas análises laboratoriais de coloração Histológica Hematoxilina-Eosina (HE), dosagem de citocinas inflamatórias, marcadores de estresse oxidativo (MDA, GSH, SOD) e RT-PCR. Os grupos experimentais conduzidos incluem animais com úlcera tratados com veículo, quitosana, triancinolona acetona ou a combinação de ambos, nos períodos de três e sete dias, além de grupos sem úlcera como controle. As análises laboratoriais (HE, dosagem de citocinas, estresse oxidativo e RT-PCR) estão previstas para execução em 2025/2026.

O projeto proporciona à aluna experiência prática com manejo de animais, sedação, administração de fármacos e execução de técnicas laboratoriais complexas, consolidando competências essenciais para a pesquisa pré-clínica.

4. Resultados e Impactos Esperados

A nanoemulsão de quitosana com triancinolona acetona na forma de gel tem como objetivo reduzir reações inflamatórias e acelerar o processo de cicatrização da mucosa lesada em indivíduos com úlceras traumáticas. A formulação em nanoemulsão apresenta melhor

absorção do fármaco, maior permeabilidade e estabilidade, além de biocompatibilidade, biodegradabilidade e liberação controlada.

O gel também apresenta viabilidade financeira, visto que a quitosana é um produto barato e facilmente obtido, extraído das carapaças de crustáceos. A partir dos resultados obtidos, espera-se que o produto possa ser aplicado em outros modelos experimentais, ampliando sua aplicabilidade em medicina e áreas correlatas.

Atualmente, os resultados encontram-se em andamento. Após a conclusão da fase pré-clínica in vivo e com base nos resultados alcançados, o grupo pretende avançar para a fase clínica, utilizando o gel em pacientes acometidos por úlceras traumáticas atendidos no serviço de Estomatologia do Departamento de Odontologia da UFRN, promovendo a translação do desenvolvimento laboratorial para a prática clínica.

Conclusão

Os dados obtidos até o momento indicam que a nanoemulsão de quitosana associada à triancinolona acetônida pode representar uma abordagem terapêutica eficaz na cicatrização de úlceras traumáticas. Observações preliminares sugerem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes relevantes, além do papel promissor da quitosana como veículo biocompatível e de baixo custo. No entanto, são necessárias análises complementares para confirmar esses efeitos e avaliar a viabilidade da aplicação clínica. Assim, a continuidade da pesquisa busca consolidar esses achados e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento da estomatite aftosa recorrente.

Referências

AKINTOYE, Sunday O.; GREENBERG, Martin S.. Recurrent Aphthous Stomatitis. *Dental Clinics Of North America*, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 281-297, abr. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2013.12.002>.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1971;44(1):276-87.

CAVALCANTE, Galyléia Meneses; PAULA, Renata Janaína Sousa de; SOUZA, Leonardo Peres de; SOUSA, Fabrício Bitu; MOTA, Mário Rogério Lima; ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 227-234, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502011000300012>.

Cho AS et al. Efeito do fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF) na mucosite ulcerativa induzida por 5-FU em bolsas bucais de hamster . *Exp Toxicol Pathol*. 2006;57(4):321-8.

Costa CMD, Santos RCCd, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2006;42:345-50.

ELIAS, Marcus L. et al. Recurrent aphthous stomatitis: An enigmatic entity and sign of systemic disease. *Indian Journal of Dermatology*, v. 67, n. 6, p. 834, 2022.

FREITAS, Thais Helena Proença; DE SOUZA, Daniella Abbruzzini Ferreira.
Corticosteróides sistêmicos na prática dermatológica. Parte I - Principais efeitos adversos.
Anais Brasileiros de Dermatologia, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 63–70, 2007.

MANFREDINI et al.. Recurrent Aphthous Stomatitis: treatment and management.
Dermatology Practical & Conceptual, [S.L.], p. 2021099, 28 set. 2021. Mattioli1885.
<http://dx.doi.org/10.5826/dpc.1104a99>.

NASCIMENTO et al., . Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an
alternative for burn wound treatment in rats. Acta Cirurgica Brasileira, [S.L.], v. 24, n. 6, p.
460-465, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502009000600007>.

NASCIMENTO, Ednaldo Gomes do. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA E MECÂNICA DE MEMBRANAS DE QUITOSANA CONTENDO
SISTEMAS MULTICOMPONENTES DE TRIANCINOLONA ACETONIDA. 2020. 117 f.
Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmaceuticas, Departa Farmácia, Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020. Cap. 21.

PLEWA, Michael C.; CHATTERJEE, Kingshuk. Aphthous stomatitis. 2022

SUHARYANI, Ine; MOHAMMED, Ahmed Fouad Abdelwahab; MUCHTARIDI,
Muchtaridi; WATHONI, Nasrul; ABDASSAH, Marline. Evolution of Drug Delivery
Systems for Recurrent Aphthous Stomatitis. Drug Design, Development And Therapy, [S.L.],
v. 15, p. 4071-4089, set. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s328371>.

SÁNCHEZ-BERNAL, J.; CONEJERO, C.; CONEJERO, R.. Aftosis oral recidivante. Actas
Dermo-Sifiliográficas, [S.L.], v. 111, n. 6, p. 471-480, jul. 2020. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2019.09.004>.

SIDDIQUE YH, ARA G, AFZAL M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen
peroxide in cultured human lymphocytes. Dose-response : a publication of International
Hormesis Society. 2012;10(1):1-10.

SWEETMAN, Sean C. Martindale: The complete drug reference. 36 edição ed. Londres:
Pharmaceutical Press, 2009

NEVILLE, Brad. Patologia oral e maxilofacial. Elsevier Brasil, 2011.

CÓDIGO: SB0197

AUTOR: JAYANE MARIA DO NASCIMENTO SILVA

ORIENTADOR: ELAINE CRISTINA GAVIOLI

TÍTULO: S-CETAMINA E N,N-DIMETILTRIPTAMINA REVERTEM
COMPORTAMENTO DESAMPARADO EM CAMUNDONGOS

Resumo

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma das principais causas de incapacidade global, e uma parcela significativa de pacientes não responde propriamente aos antidepressivos convencionais, com cerca de 30% exibindo quadro de Depressão Resistente ao Tratamento (DRT). Logo, substâncias de ação rápida, como a S-cetamina e a N,N-dimetiltriptamina (DMT), têm despertado interesse pelo potencial de reverter sintomas depressivos por mecanismos distintos dos fármacos tradicionais, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Este estudo avaliou os efeitos dessas drogas no modelo de desamparo aprendido em camundongos. Os animais foram mantidos em alojamento coletivo e distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle, S-cetamina (antidepressivo de referência) e DMT, ambos na dose de 10 mg/kg, ip. Após a indução do fenótipo desamparado, os tratamentos foram administrados. 24 horas depois, os animais foram testados para a reversão do comportamento do tipo depressivo e 30 horas após a administração, realizou-se o teste de campo aberto para avaliar parâmetros locomotores e exploratórios. Verificou-se que tanto a S-cetamina quanto a DMT reverteram substancialmente o comportamento de desamparo, sugerindo um rápido efeito antidepressivo, sem alterações locomotoras. Os achados reforçam o potencial promissor da DMT para o tratamento da depressão. A pesquisa sustenta a necessidade de estudos adicionais para elucidar os mecanismos da ação antidepressiva e segurança da DMT.

Palavras-chave: S-cetamina; N,N-dimetiltriptamina; desamparo aprendido; antidepressivo

TITLE: S-KETAMINE AND N,N-DIMETHYLTRIPTAMINE REVERSE LEARNED
HELPLESSNESS IN MICE

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is one of the leading causes of disability around the globe, and a significant portion of patients do not respond properly to conventional antidepressants, with about 30% exhibiting Treatment-Resistant Depression (TRD). Therefore, fast-acting substances, such as S-ketamine and N,N-dimethyltryptamine (DMT), have attracted interest due to their potential to reverse depressive symptoms through mechanisms distinct from traditional drugs, such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). This study evaluated the effects of these drugs in the learned helplessness model in mice. The animals were housed collectively and randomly distributed into three groups: control, S-ketamine (reference antidepressant), and DMT, both at a dose of 10 mg/kg, i.p. After the induction of the helpless phenotype, the treatments were administered. 24 hours later, the animals were

tested for the reversal of depressive-like behavior, and 30 hours after administration, the open-field test was performed to evaluate locomotor and exploratory parameters. It was found that both S-ketamine and DMT substantially reversed helpless behavior, suggesting a rapid antidepressant effect, without locomotor alterations. The findings reinforce the promising potential of DMT for the treatment of depression. The research supports the need for additional studies to elucidate the mechanisms of antidepressant action and the safety of DMT.

Keywords: S-ketamine;N,N-dimethyltryptamine;learned helplessness;antidepressant

Introdução

O transtorno depressivo representa uma das principais causas de incapacidade no mundo, sendo um transtorno mental complexo e debilitante, que afeta negativamente a qualidade de vida e impõe grande impacto socioeconômico. Apesar de grandes avanços na farmacoterapia, antidepressivos convencionais, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), ainda são amplamente utilizados. Entretanto, essa classe de medicamentos apresenta limitações, como um tempo para início de ação lento, baixa eficácia em uma parcela significativa dos pacientes e ocorrência de recaídas frequentes (CAMERON et al., 2018). Nesse contexto, a busca por alternativas terapêuticas com efeito antidepressivo rápido e sustentado tem ganhado destaque na pesquisa neuropsicofarmacológica, onde a etapa pré-clínica envolvendo modelos animais torna-se indispensável para avaliação da eficácia e segurança de novos compostos.

A S-cetamina, enantiômero da cetamina, tem sido investigada como uma dessas alternativas de efeito rápido. Sua ação antagonista não competitiva nos receptores NMDA do glutamato está associada à indução de rápida neuroplasticidade e modulação de circuitos neurais envolvidos na regulação do humor (ZANOS et al., 2019). Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado seu potencial para reverter sintomas depressivos em poucas horas, mesmo em casos de Depressão Resistente ao Tratamento (DRT), caracterizada pela resposta inadequada a, no mínimo, dois antidepressivos, apesar da adesão ao tratamento (FDA, 2019; EMA, 2021).

Já a N,N-dimetiltryptamina (DMT) é um alcaloide triptamínico encontrado em diversas plantas, também sendo produzido endogenamente em mamíferos. Apresenta propriedades psicodélicas potentes mediadas principalmente pela ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} (CARBONARO et al., 2015). Pesquisas recentes sugerem que compostos psicodélicos podem promover efeitos antidepressivos rápidos, possivelmente relacionados à facilitação de estados de neuroplasticidade e reorganização funcional de redes cerebrais (LIMA DA CRUZ et al., 2025). Por essa razão, a DMT foi investigada como potencial antidepressivo de ação rápida, utilizando a S-cetamina como controle positivo para fins comparativos.

O modelo de desamparo aprendido em camundongos é amplamente utilizado para investigar mecanismos fisiopatológicos da depressão e avaliar a eficácia de novos compostos. Nesse contexto, a exposição a situações inescapáveis leva ao desenvolvimento de um estado comportamental caracterizado por passividade e redução da capacidade de escapar de estímulos aversivos, análogo a sintomas depressivos em humanos. A reversão desse comportamento após a administração de fármacos é considerada evidência pré-clínica de potencial antidepressivo (WU et al., 2021).

Diante da necessidade de alternativas terapêuticas rápidas, este estudo avaliou os efeitos da S-cetamina e da DMT no modelo de desamparo aprendido, e utilizou o teste de campo aberto para verificar se houveram alterações motoras que influenciaram os resultados. A comparação entre esses compostos pode elucidar novos mecanismos farmacológicos com potencial aplicação no tratamento da depressão.

O presente trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre terapias inovadoras para o tratamento do transtorno depressivo, fornecendo evidências experimentais da atividade antidepressiva de compostos com mecanismos de ação distintos dos fármacos antidepressivos convencionais. Além disso, reforça a importância de explorar abordagens farmacológicas capazes de oferecer alívio rápido e eficaz dos sintomas depressivos.

Metodologia

Animais

Os efeitos da administração aguda de S-cetamina e DMT foram avaliados no modelo do desamparo aprendido em camundongos, onde foram utilizados 58 camundongos Swiss machos (35–45 g), com idade entre 12 e 17 semanas, provenientes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (41 × 34 × 16 cm), com no máximo oito indivíduos por caixa, com livre acesso à água e ração. As condições ambientais foram mantidas controladas, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 6h00). Todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo nº 334.016/2023).

Drogas e Tratamentos

As seguintes drogas foram utilizadas: (S)-Cetamina 10 mg/kg (Cristália, SP, Brasil) e fumarato de N,N-dimetiltriptamina (DMT) 10 mg/kg. As doses testadas foram escolhidas com base em estudos com animais (MAENG et al., 2008; CAMERON et al., 2017). O veículo utilizado na solubilização das drogas, solução salina 0,9%, foi utilizado como controle negativo. Os tratamentos foram administrados intraperitonealmente (ip) 24 horas antes da sessão teste do protocolo de desamparo aprendido.

Desamparo aprendido

O modelo de desamparo aprendido foi conduzido com base em protocolo modificado de Chourbaji et al. (2005), utilizando uma caixa com dois compartimentos interligados por uma porta guilhotina, com piso de grades conectadas a um gerador de choques elétricos. O procedimento foi realizado em quatro sessões consecutivas: duas de indução, uma de triagem e uma de teste. Nas sessões de indução (dias 1 e 2), os animais foram expostos a choques inescapáveis nos pés (120 e 150 choques, respectivamente, 0,5 mA, 1–10 s), em ciclos aleatórios com intervalos médios de 10 s. Para evitar efeitos de lateralidade, os lados de início das sessões de choques foram alternados entre os dias.

Na sessão de triagem ou secreening (dia 3), os camundongos passaram por 5 minutos de habituação e, em seguida, foram submetidos a 30 ciclos de choques escapáveis, podendo fugir para o compartimento oposto. Logo após à sessão de triagem, os animais considerados

desamparados foram tratados com DMT ou S-cetamina. Animais com até 9 respostas de escape foram classificados como desamparados, tratados e expostos à sessão teste (dia 4), realizada 24 h após o tratamento. A sessão de teste ocorreu do mesmo modo que a sessão de a triagem. Foram registrados o número de fugas e a latência de fuga. Todos os testes ocorreram no período claro (08:00–13:00 h), sob controle de ruído e luminosidade, com avaliação realizada por observador cego à condição experimental.

Teste de campo aberto

Vinte e oito horas após a administração dos fármacos, o teste de campo aberto foi realizado, a fim de avaliar a locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso. Os camundongos foram colocados individualmente no centro de uma arena quadrada ($40 \times 40 \times 40$ cm), iluminada com luz vermelha, e a exploração da arena foi registrada por 30 minutos por uma vídeo câmera com detecção no espectro infravermelho. A análise foi realizada com o software Anymaze®, A distância total percorrida, o tempo gasto e a distância percorrida na zona central (20×20 cm) durante os primeiros 10 minutos foram medidos. A maior permanência na zona central sugere comportamento do tipo ansiolítico, enquanto a evitação indica comportamento ansiogênico (Seibenhener e Wooten, 2015).

Resultados e Discussões

Dos animais expostos ao estresse inescapável, calculou-se que 65 % deles tornaram-se desamparados (58 de 89 camundongos). Imediatamente após a sessão de screening, somente os animais desamparados foram, de forma randômica, divididos entre os grupos: veículo (controle), S-cetamina 10 mg/kg ou DMT 10 mg/kg e tratados por via i.p. uma única vez. Vinte e quatro horas após o tratamento, os camundongos foram re-expostos à sessão de choque escapável e a latência para fuga, bem como a frequência de fugas do compartimento onde receberam o choque nas patas foi registrado.

A Figura 2 ilustra o efeito dos tratamentos no comportamento dos animais nas sessões de choques escapáveis, screening e teste, sendo que a sessão de teste ocorre 24h após o tratamento com S-cetamina e DMT. A figura 2a ilustra a frequência de fugas na sessão de screening e teste para cada grupo tratado. Observa-se que na sessão de screening o número de fugas está abaixo do ponto de corte que é menor ou igual a 10 fugas (Fig. 2a). Já para a sessão teste, no grupo controle a maioria apresentou frequência de 10 fugas abaixo de 10, enquanto que nos grupos tratados com S-cetamina e DMT, a maioria dos animais apresenta frequência de fugas acima de 10 (Fig. 2a). De forma quantitativa, observa-se que a média de fugas na sessão teste difere entre os grupos (Fig. 2b, ANOVA 1-via, $F(2, 27)=4,41$, $p=0,02$), sendo significativamente maior que o controle nos grupos tratados com S-cetamina e DMT. Já na sessão de screening, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados e controle (Fig. 2b, $p>0,05$). Na Figura 2c, observa-se a média da latência de fugas entre os grupos tanto na sessão screening quanto na sessão teste. Para este parâmetro, detectou-se redução significativa da latência de fugas nos últimos 15 ciclos de choques da sessão teste nos animais tratados com S-cetamina e DMT em comparação com o controle (Fig. 2c, ANOVA 2-vias, efeito tratamento: $F(2, 116)=5,22$, $p<0,005$, efeito tempo: $F(3, 116)=14,03$, $p<0,001$, interação: $p>0,05$), sugerindo que os animais tratados com S-cetamina e DMT fogem mais rápido que os controles nos 15 últimos ciclos de choques nas patas.

A Figura 3 ilustra o efeito dos tratamentos com S-cetamina, DMT ou veículo na locomoção espontânea dos camundongos 30h após as injeções. Na Figura 3a, observa-se que os tratamentos não afetaram, de maneira significativa, nem a distância percorrida pelos camundongos no teste do campo aberto analisada em blocos de 5 min (Fig. 3a, ANOVA 2-vias, $p > 0.05$) nem a distância percorrida acumulada nos 30 min de observação (Fig. 3b, ANOVA 1-via, $p > 0.05$). Ainda, os tratamentos também não foram capazes de alterar a exploração de áreas centrais do campo aberto, observadas nos 10 primeiros minutos de teste (Fig. 3c, ANOVA 1-via, $p > 0.05$). Em conjunto, esses dados sugerem que os tratamentos com S-cetamina e DMT não parecem afetar a locomoção espontânea dos animais e nem mesmo a exploração de áreas centrais do campo aberto.

Os dados obtidos neste estudo com a S-cetamina na reversão do comportamento desamparado se assemelham à estudos prévios com camundongos (REF) e ratos (REF) no modelo de desamparo aprendido e servem principalmente para validação das nossas condições experimentais. Porém, os resultados obtidos com a DMT neste estudo são inéditos, já que esta é a primeira vez que são descritos efeitos antidepressivos para a DMT em animais expostos à modelo animal de depressão com forte validade. Os já disponíveis na literatura apontavam para efeito antidepressivo rápido da DMT em humanos depressivos (FALCHI-CARVALHO et al., 2025; SWIECZKOWSKI et al., 2025). Os dados pré-clínicos já disponíveis na literatura para a DMT mostravam efeito do tipo antidepressivo em testes comportamentais como natação forçada (CAMERON et al., 2018) e no modelo agudo de depressão induzido pelo LPS (DO NASCIMENTO et al., 2025). Cabe discutir que os testes comportamentais usados para seleção de fármacos com potencial antidepressivo não mimetizam as alterações sintomatológicas e nem etiológicas do transtorno, logo apresentam boa margem para identificar resultados falso-positivos (PLANCHEZ et al., 2019). O estudo em questão apresenta algumas vantagens em relação aos dados pré-clínicos já disponíveis na literatura, uma vez que o modelo de depressão utilizado possui validade translacional, já que induz um fenótipo desamparado, semelhante à comportamentos observados em outras espécies de mamíferos, incluindo humanos, e neste contexto, a DMT, semelhante a S-cetamina - um antidepressivo padrão, reverteu o comportamento desamparado. Por fim, as alterações observadas não foram enviesadas por potenciais alterações na locomoção espontânea dos animais.

Conclusão

Conclui-se que, no modelo de desamparo aprendido, tanto a S-cetamina quanto o DMT foram capazes de reverter de maneira significativa o fenótipo desamparado em camundongos, sem alterar a locomoção espontânea dos animais, que poderia ser um viés na interpretação dos resultados.

Embora os mecanismos de ação não tenham sido explorados neste estudo, é plausível que tais efeitos estejam relacionados à modulação de circuitos neurais e sistemas de neurotransmissores envolvidos na plasticidade sináptica e no processamento emocional, já que os efeitos observados ocorrem 24 h após o tratamento farmacológico. Considerando-se a relevância clínica do desamparo aprendido como modelo translacional de depressão, estes resultados reforçam a importância de estudos adicionais para elucidar os mecanismos de ação da DMT, visando seu potencial uso terapêutico no manejo de transtornos depressivos.

Referências

Cameron LP, Benson CJ, Dunlap LE, Olson DE. Effects of N, N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. *ACS Chem Neurosci*. 2018 Jul 18;9(7):1582-1590. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00134. Epub 2018 Apr 24. PMID: 29664276; PMCID: PMC7196340.

CARBONARO, T. M.; ESHLEMAN, A. J.; FORSTER, M. J. et al. The role of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} and mGlu₂ receptors in the behavioral effects of tryptamine hallucinogens N,N-dimethyltryptamine and N,N-diisopropyltryptamine in rats and mice. *Psychopharmacology* (Berlin), v. 232, n. 1, p. 275–284, jan. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24985890/>. Acesso em: 11 ago. 2025.

CHOURBAJI, S. et al. Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice. *Brain Research Protocols*, [S.l.], v. 16, n. 1-3, p. 70–78, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.09.002>. Acesso em: 10 maio 2025.

do Nascimento Sousa D, de Azevedo M, Santos ML, Borges TKDS, de Oliveira DM, Caldas ED. Immunomodulatory and behavioral effects of ayahuasca and N, N-dimethyltryptamine in a rat model of lipopolysaccharide-induced depression. *Metab Brain Dis*. 2025 Jun 11;40(5):220. doi: 10.1007/s11011-025-01650-6. PMID: 40498206.

EMA – European Medicines Agency. Spravato: EPAR – Product Information. Amsterdam: EMA, 2021. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spravato>. Acesso em: 15 ago. 2025.

Falchi-Carvalho M, Palhano-Fontes F, Wießner I, Barros H, Bolcont R, Laborde S, Ruschi B Silva S, Montanini D, C Barbosa D, Teixeira E, Florence-Vilela R, Almeida R, K A de Macedo R, Arichelle F, J Pantrigo É, V Costa-Macedo J, da Cruz Nunes JA, de Araújo Costa Neto LA, Nunes Ferreira LF, Dantas Corrêa L, da Costa Bezerra RB, Arcoverde E, Galvão-Coelho N, B Araujo D. Rapid and sustained antidepressant effects of vaporized N,N-dimethyltryptamine: a phase 2a clinical trial in treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology*. 2025 May;50(6):895-903. doi: 10.1038/s41386-025-02091-6. Epub 2025 Apr 22. PMID: 40258990; PMCID: PMC12032144.

FDA – Food and Drug Administration. FDA approves new nasal spray medication for treatment-resistant depression; available only at a certified doctor's office or clinic. Silver Spring: FDA, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements>. Acesso em: 15 ago. 2025.

LIMA DA CRUZ, R. V. et al. Psychedelics promote neuroplasticity through the activation of intracellular 5-HT_{2A} receptors. *Scientific Reports*, v. 14, 16964, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59984-7>. Acesso em: 15 ago. 2025.

Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry*. 2008 Feb 15;63(4):349-52. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.05.028. Epub 2007 Jul 23. PMID: 17643398.

MCINTYRE, R. S.; ALSUWAIDAN, M.; BAUNE, B. T. et al. Treatment-resistant depression: definition, prevalence, detection, management, and investigational interventions.

World Psychiatry, v. 22, n. 3, p. 394-412, 2023. Disponível em:
<https://doi.org/10.1002/wps.21120>. Acesso em: 11 ago. 2025.

Planchez B, Surget A, Belzung C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J Neural Transm (Vienna)*. 2019 Nov;126(11):1383-1408. doi: 10.1007/s00702-019-02084-y. Epub 2019 Oct 4. PMID: 31584111; PMCID: PMC6815270.

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: JoVE*, n. 96, e52434, 2015. Disponível em:<https://doi.org/10.3791/52434>. Acesso em: 10 maio 2025.

Swieczkowski D, Kwaśny A, Cubala WJ. Safety and tolerability of NN-dimethyltryptamine (DMT) in healthy volunteers and Major Depressive Disorder (MDD) patients: A systematic review of early-phase clinical trials. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2025 Jul 13;140:111419. doi: 10.1016/j.pnpbp.2025.111419. Epub 2025 Jun 7. PMID: 40484114.

WU, M. et al. Attenuated dopamine signaling after aversive learning is restored by ketamine to rescue escape actions. *eLife*, v. 10, e64041, 2021. Disponível em:<https://doi.org/10.7554/eLife.64041>. Acesso em: 15 ago. 2025.

ZANOS, P. et al. Ketamine and ketamine metabolite pharmacology: insights into therapeutic mechanisms. *Pharmacological Reviews*, v. 70, n. 3, p. 621-660, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.117.015198>. Acesso em: 15 ago. 2025.

Anexos

Figura 1 – Esquema experimental do modelo de desamparo aprendido e protocolo de tratamento.

Figura 2 – Reversão do comportamento de desamparo 24 h após o tratamento com S-cetamina e DMT (ambos 10 mg/kg, ip) em camundongos.

Figura 3 – Tratamento com S-cetamina e DMT (10 mg/kg, ip) não afetou a locomoção espontânea dos camundongos observada 30 h após as injeções.

CÓDIGO: SB0199

AUTOR: ELIZABETH COSTA SOBRAL DE ALBUQUERQUE

COAUTOR: RAFAELA TORRES DANTAS DA SILVA

COAUTOR: EMILY LIMA OLIVEIRA

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Imunoplasticidade dos macrófagos: investigação ex vivo da polarização m1/m2 e potencial de reversibilidade fenotípica

Resumo

Macrófagos desempenham papéis cruciais na imunidade inata e adaptativa, mas também podem promover o desenvolvimento de tumores e suprimir o sistema imunológico. Eles se polarizam em dois tipos: M1, pró-inflamatório ativado por IFN- γ , e M2, que promove imunossupressão, angiogênese e metástase, associado ao crescimento tumoral. A polarização dos macrófagos pode indicar a agressividade do câncer, com M2 ligadas a tumores mais agressivos. Estudos mostraram a possibilidade de reverter a polarização de M1 para M2 e vice-versa através de estímulos com citocinas, podendo ser explorada como estratégia terapêutica no tratamento do câncer. Assim, o objetivo deste trabalho é isolar, caracterizar e polarizar macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c nos fenótipos M1 e M2, além de explorar o potencial de reverter o fenótipo desses macrófagos in vitro como nova abordagem terapêutica. Foram utilizados camundongos BALB/c para isolar macrófagos peritoneais, diferenciados in vitro em M1 e M2 com LPS e IFN- γ ; IL-4 e IL-13, respectivamente. A polarização foi confirmada por microscopia óptica e citometria de fluxo, revelando características morfológicas e marcadores de superfície distintos. Os resultados sugerem uma polarização bem-sucedida, com morfologias diferenciadas para M1 e M2. Essa polarização pode ser explorada para novos tratamentos contra cânceres agressivos, revertendo macrófagos associados a tumores para diminuir o crescimento tumoral.

Palavras-chave: Polarização, Macrófagos, Câncer, Citocinas, M1, M2.

TITLE: Analysis of M1 and M2 polarization of murine peritoneal macrophages in the production of regulatory cytokines and drug resistance in cancer cells

Abstract

Macrophages play crucial roles in both innate and adaptive immunity, but they can also promote tumor development and suppress the immune system. They polarize into two types: M1, pro-inflammatory and activated by IFN- γ , and M2, which promotes immunosuppression, angiogenesis and metastasis, and is associated with tumor growth. Macrophage polarization can indicate cancer aggressiveness, with M2 macrophages linked to more aggressive tumors. Studies have shown that it is possible to reverse polarization from M1 to M2 and vice versa through cytokine stimulation, which can be explored as a therapeutic strategy in cancer treatments. Thus, the aim of this work is to isolate, characterize and polarize peritoneal macrophages from BALB/c mice into M1 and M2 phenotypes and to

explore the potential of reversing the phenotype of these macrophages in vitro as a novel therapeutic approach. The experiment described uses BALB/c mice to isolate peritoneal macrophages, which are differentiated in vitro into M1 and M2 macrophages using LPS, IFN- γ , IL-4, and IL-13. Polarization was confirmed by light microscopy and flow cytometry, revealing the morphological and surface marker characteristics of the polarized macrophages. The results suggest that polarization was successful, with distinct morphological characteristics for M1 and M2. Polarization can be exploited for novel treatments against aggressive cancers, reversing tumor-associated macrophages to decrease tumor growth.

Keywords: Polarization, Macrophages, Cancer, Cytokines, M1, M2.

Introdução

O sistema imunológico é um complexo de células, moléculas e tecidos que atuam em conjunto para identificar e eliminar agentes estranhos, como fungos, bactérias e vírus, além de remover células danificadas ou anormais e responder a lesões, mantendo a homeostasia corporal (1). Ele é dividido em dois tipos: imunidade inata e adaptativa. A inata é a primeira linha de defesa, inespecífica e rápida, enquanto a adaptativa atua tardiamente com o reconhecimento específico de antígenos e formação de memória imunológica (1,2). Compreender essa distinção é essencial para entender as respostas imunes em diferentes contextos como infecções, inflamações e câncer (2).

A imunidade inata teve seus estudos iniciados com Elias Metchnikoff e sua descoberta das células fagocíticas (3). Ela é formada por barreiras físicas, citocinas, células como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e basófilos. Atua de forma imediata promovendo a inflamação e recrutando células adaptativas. Já a imunidade adaptativa, ativada pela inata, é mais específica e duradoura, mediada por linfócitos T e B que se diferenciam em células efetoras e de memória (3,4).

Um elo entre os dois tipos é a apresentação de antígenos por APCs (células apresentadoras de antígenos), como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Elas fagocitam patógenos, processam os antígenos e os apresentam por MHC (5,6). Os macrófagos, além da atividade fagocítica, funcionam como APCs e ativam T CD4⁺ e T CD8⁺ (7), podendo se polarizar funcionalmente em dois fenótipos: M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios) (8).

Os macrófagos M1, ativados por IFN- γ , LPS e TNF- α , secretam citocinas como TNF α , IL-1 e IL-6, promovendo uma resposta inflamatória eficaz contra patógenos (8,9). No câncer, os M1 têm papel antitumoral, induzindo apoptose e ativando linfócitos T citotóxicos (10,11). Atuam em estágios iniciais do tumor, suprimindo o crescimento por recrutamento de T CD8⁺ e células NK por meio de CXCL10 e CXCL11 (12,13).

Os M2, ativados por IL-4, IL-13 e IL-10, têm baixa apresentação antigênica e promovem imunossupressão, angiogênese, reparo tecidual e ativação de resposta Th2 (14,15). Subdividem-se em M2a (reparo e alergias), M2b (imunorregulação), M2c (remodelação tecidual) e M2d (TAMs — macrófagos associados a tumor), que estimulam angiogênese e progressão tumoral (16,17).

A polarização dos macrófagos é influenciada pelo microambiente e pode indicar a agressividade de tumores, já que M2 são expressos em neoplasias agressivas (18). TAMs favorecem progressão tumoral por angiogênese, imunossupressão e transição epitélio-mesenquimal (EMT), facilitando a metástase (19).

Nesse contexto, modelos *in vitro* com macrófagos RAW 264.7 têm sido usados por grupos como o “Alterações morfológicas, nanomedicina e oncologia-inflamação experimental” do LAICI-UFRN. Esses estudos utilizam nanopartículas com imunoterápicos para reverter macrófagos M2-TAM para o perfil M1, além do uso de vesículas extracelulares derivadas de M1 como carreadoras de drogas, promovendo aumento de T CD8⁺ em tumores agressivos (20-22).

Apesar das vantagens, a linhagem RAW 264.7 apresenta limitações, como alterações genotípicas/fenotípicas com passagens em cultura e aumento de arginase 1 após múltiplas passagens (23,24). Por isso, modelos *ex vivo* com macrófagos isolados de camundongos têm sido preferidos, permitindo respostas mais fisiológicas (25).

A partir do sangue, medula óssea ou líquido peritoneal de camundongos, é possível obter culturas primárias com características mais próximas ao *in vivo*. O uso de macrófagos peritoneais se destaca por ser menos invasivo, fornecer quantidade adequada de células e permitir estudos da polarização M1/M2 (25,26). Assim, este trabalho propõe investigar a polarização de macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos BALB/c, utilizando microscopia óptica invertida e imunofenotipagem para análise do perfil funcional dessas células.

Metodologia

Manutenção dos animais

Camundongos BALB/C machos entre 8 - 12 semanas de idade, pesando entre 21 e 28 g, foram usados para o modelo de isolamento de macrófagos peritoneais. Os animais foram adquiridos no Laboratório de Imunologia Keizo Asami (Fiocruz, PE) e mantidos de acordo com os princípios éticos para experimentação animal. O projeto o qual esse plano de trabalho está inserido foi aprovado pela CEUA/UFRN pelo n. 344.026/2023. Os animais desse projeto foram alojados no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal em Farmacologia da Inflamação e Investigação do Câncer (LAFINC), em gaiolas ventiladas individualmente (com filtro isolador superior) a 22 °C com exaustão com capacidade para 30 trocas de ar por hora, ciclo claro/escuro de 12 horas e com água e comida livremente acessíveis.

Eutanásia dos animais e isolamento do lavado peritoneal *in vivo*

O método usado para diferenciar os macrófagos foi descrito anteriormente (23) e adaptado pela aluna. Primeiramente, os 12 animais foram divididos em dois grupos de acordo com o experimento, 6 camundongos foram separados para diferenciação de macrófagos e confirmação da morfologia por microscopia óptica, e os 6 restantes foram posteriormente separados em grupos para diferentes tratamentos com diferenciação confirmada por citometria de fluxo. Assim, camundongos, com exceção dos grupos “Não marcado” e “Não tratado”, foram tratados com LPS à concentração de 0,02 uL/mL (33) em 1 mL de Tampão Fosfato-Salino (PBS) por 4 horas anteriores à eutanásia com administração peritoneal. Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical precedido de anestesia inalatória com 5% de 20 isoflurano (27), em seguida, são levados à capela de fluxo laminar e posicionados em decúbito dorsal, pinçados nas patas e banhados com álcool 70%. Posteriormente, é realizada a abertura da pele na região anterior esquerda até metade do abdômen para a exposição do peritônio e com auxílio de uma seringa de 5 mL e uma agulha

de 26 ½ G foi administrado 2-3 mL de PBS 1X suplementado com 3% de Soro Bovino Fetal (SBF) gelado na parte exposta do peritônio acima do osso femoral. Após a administração de PBS, é feita uma massagem sutil com auxílio dos dedos em movimento de vai-e-vem no peritônio do animal por 2 minutos. O líquido é então recuperado dentro de eppendorfs de 2 mL e reservados no gelo para serem levados à cultura celular. Os eppendorfs foram centrifugados a 4°C por 8 minutos com 1500 RPM. O sobrenadante é descartado e ressuspenso com 1 mL de “ACK Lysing Buffer” e depois centrifugado novamente e o pellet ressuspendido com 300 uL de RPMI+AB+SBF (20%) para os grupos tratados e com RPMI+AB para os grupos controle. As células foram plaqueadas em uma placa com 6 poços e mantidas na estufa por 24 horas.

Polarização dos macrófagos peritoneais

A polarização foi realizada anteriormente no LAICI e o protocolo foi reproduzido no presente estudo (28,29). Após 24 horas os poços foram lavados com 100 uL ACK Lysing Buffer por 5 minutos para a retirada de hemácias remanescentes e depois com PBS para a retirada das células que não aderiram à placa. Em seguida, 2 poços foram estimulados para a polarização do tipo M1 com 1 uL LPS na concentração 2,5 ug/mL em RPMI sem SBF e com 2 uL IFN-γ na concentração 0,2 ug/mL em RPMI sem SBF e outros dois poços foram tratados com 1 uL de IL-4 e IL-13 na 10 ng/mL em RPMI sem SBF por 48 horas para a polarização do macrófago-M2. Além disso, dois poços da placa não foram estimulados, sendo tratados apenas com RPMI sem SBF, para a observação de macrófagos MO, obtendo, dessa forma, o seguinte esquema de placa.

Análise morfológica

Após as 48 horas de diferenciação, a placa reservada para morfologia foi revestida com parafilme e levada para o microscópio de luz Telaval 31 (ZEISS, Oberkochen, Alemanha). A placa foi analisada comparando as morfologias, e as fotos foram obtidas nas lentes objetivas de 10X, 20X, 40X e 63X por poço.

Citometria de Fluxo

Para a realização da análise da polarização a partir da citometria de fluxo, o lavado peritoneal foi polarizado para M1 e M2 de modo semelhante a placa para a análise morfológica, com adição de controles que foram retirados de animais sem tratamento prévio com LPS resultando em seis poços mantidos por 48 horas apenas com RPMI. Após 48 horas, as células foram coletadas e bloqueadas com 0,5% de PBA por 45 minutos e então cada poço foi alíquotado para um tubo FACS e adicionado 50 uL PBA. Para a imunomarcagem, dois tubos FACS não sofreram marcação, servindo de controle não marcado (MO unstained), dois tubos FACS foram marcados com 100 uL de anticorpos anti-CD163-PercCP (1:500; Invitrogen, REF 46 1631-80) para controle negativo do anti-CD163, dois tubos FACS foram marcados com 100 uL de anti-CD68-FITC (1:500) para o controle negativo do anti-CD68, dois tubos FACS tratados com LPS + IFN-γ foram marcados com 100 uL de anti-CD68 FITC (1:500; Invitrogen, REF MA1-82739) para analisar a polarização para macrófagos-M1, dois tubos FACS tratados com IL4 + IL13 foram marcados com 100 uL de anti-CD163-PercCP (1:500; Invitrogen, REF 46-1631-80) para analisar a polarização de macrófagos-M2. Todos os tubos foram incubados por 30 minutos e analisados usando BD FACSCalibur flow cytometer (Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) para 10.000 eventos. Os resultados foram analisados no FlowJo software (BD Biosciences).

Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism versão 10.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CÁ, EUA). Os resultados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido por comparação com o controle MO não tratado com média +- desvio padrão (DP) pelo teste de Dunnet com valores de $P > 0,05$ significativos.

Resultados e Discussões

Avaliação da viabilidade celular

Após a realização da confirmação morfológica por microscopia óptica, um poço de cada célula polarizada (M0, M1 e M2) foi aleatoriamente utilizado para o congelamento dessas células. O cell scraper foi utilizado para soltar as células e todo o meio foi transferido para tubos falcons, após a transferência, os poços foram lavados com PBS para recuperar o máximo de células. O falcon foi centrifugado por 5 minutos à 3000 RPM, o pallet formado foi ressuspensionado com 1 mL de RPMI e as células passaram por contagem na câmara de Neubauer com azul de tripan. Foi contado por volta de 60.000 células por poço que foram congeladas em criotubos contendo 15 uL de suspensão celular, 3 uL de DMSO e 982 uL de RPMI cada. Depois do processo de congelamento em criotubos, as células foram descongeladas e plaqueadas em uma placa de 6 poços para avaliar a capacidade de adesão após o congelamento após 24 horas.

Análise morfológica por microscopia óptica

A análise morfológica do lavado peritoneal foi demonstrada nas figuras 1, 3 e 4. O grupo MO que não recebeu tratamento, apenas foi mantido em cultura por 48 horas em RPMI sem SBF (Figura 1) demonstrou um fenótipo similar a monócitos cultivados em cultura como RAW.264.7 (Figura 2), apresentando formato oval ou circular com ausência de ramificações (Figura 1 - D) e podendo estar aderidas ou não à placa.

O grupo M1 recebeu tratamento com LPS e IFN- γ (Figura 3) e a análise morfológica do grupo demonstrou uma alteração na morfologia devido a esse tratamento, as células apresentaram a formação de filopódios (Figura 3 - B) e um formato dendrítico (Figura 3 - C), além disso, algumas apresentam granulações (Figura 3 - D), conseguindo ser distinguidas das células MO que não receberam tratamento, assemelhando-se mais ao fenótipo conhecido como M1.

O grupo M2 recebeu o tratamento com IL-4 e IL-13 (Figura 4) e a análise morfológica do grupo demonstrou uma alteração na morfologia devido a esse tratamento diferente dos grupos anteriores (MO e M1). As células apresentaram morfologia mais espinhosa, alongada similar a fibroblastos, com grandes filopódios (Figura 4 - B), de modo similar ao apresentado na literatura (30,31) para macrófagos M2 (Figura 4 - D) e criando a terceira população observada na análise morfológica.

Confirmação da polarização por citometria de fluxo

A polarização dos macrófagos peritoneais para os fenótipos M1 e M2 foi confirmada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos conjugados anti-CD68-FITC para o fenótipo M1 e

anti-CD163-PerCP-Cy5.5 para o fenótipo M2, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos.

Os resultados demonstraram que, após o estímulo com citocinas pró-inflamatórias, 32,7% (Quadrante Q3) das células expressaram CD68, enquanto apenas 4,72% (Quadrante Q3) dos macrófagos não tratado (controle negativo) apresentaram marcação positiva para esse marcador, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; One-Way ANOVA), indicando uma indução eficaz para o fenótipo M1 (Figura 5 e 6).

Da mesma forma, a exposição a citocinas anti-inflamatórias resultou em 40% (Quadrante Q1) de células positivas para CD163, caracterizando o fenótipo M2. O controle negativo correspondente mostrou apenas 0,14% (Quadrante Q1) de positividade para esse marcador, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; One-Way ANOVA), indicando uma indução eficaz para o fenótipo M2 (Figura 7 e 8).

A análise do controle isento de anticorpos fluorescentes demonstrou 92,5% (Quadrante Q4) de células sem marcação, reforçando a especificidade dos anticorpos utilizados e validando a metodologia adotada (Figura 5-A e Figura 7-A). Esses achados confirmam que o protocolo experimental empregado foi eficaz na indução dos perfis de polarização M1 e M2 em macrófagos peritoneais.

Discussão:

Macrófagos apresentam um importante papel no sistema imune, trabalhando não apenas na defesa do organismo com outras células como os polimorfonucleares, mas também na restauração de feridas e na inflamação(32,33). Ademais, macrófagos apresentam uma variação de fenótipos que são estimulados de acordo com o microambiente em que estão presente, dessa forma, os fenótipos M1 e M2 são comumente estimulados *in vitro* (33,34) em busca de compreender melhor o papel de cada fenótipo. Desse modo, o isolamento de monócitos peritoneais pode fornecer macrófagos primários para avaliar a polarização dessas células *in vitro* (35).

Esse estudo visou avaliar o perfil do isolado peritoneal retirado de camundongos Balb/c, desse modo, o isolamento do lavado peritoneal de camundongos e o estabelecimento das células em cultura celular realizado corrobora um protocolo previamente estabelecido por (35,36). Assim, foi isolada uma linhagem celular primária em que foi observado a viabilidade e aderência de células peritoneais coletadas e, após submissão aos tratamentos *in vitro*, evidenciou-se um comportamento esperado da linhagem celular primária na polarização, assemelhando ao padrão ouro, RAW 264.7, linhagem celular murina de macrófagos que é muito utilizada para pesquisas envolvendo monócitos para avaliação do seu papel no sistema imune, como já usado anteriormente para a variação fenotípica de macrófagos (37).

Em relação a polarização do lavado peritoneal em macrófagos tipo 1 (M1) e tipo 2 (M2), a análise morfológica realizada por microscopia óptica reforçou os achados esperados quanto à morfologia dos diferentes fenótipos, de modo que o grupo M0, o qual não recebeu tratamento durante as 48 horas de incubação na estufa sendo mantido apenas com RPMI sem SFB, se assemelhou à monócitos não ativados da linhagem celular RAW 264.7 observados em microscopia óptica invertida, apresentando-se uma morfologia predominantemente arredondada ou oval, em presença evidente de grânulos ou filopódios (37,20).

Em contrapartida o lavado peritoneal tratado com LPS e IFN- γ para a polarização clássica para macrófagos M1 (38), apresentou uma alteração na morfologia observada no grupo não tratado (M0) se afastando da morfologia da RAW 264.7, ou seja, de monócitos e se assemelhando a macrófagos diferenciados para o fenótipo M1, apresentando morfologia similar a de células dendríticas, arredondados com a presença de grânulos citoplasmáticos, e com formação de filopódios. Tais achados são consistentes com dados da literatura que descrevem essas alterações como resultado da ativação pró-inflamatória dos macrófagos (39).

O grupo M2, tratado com IL-4 e IL-13 para a ativação alternativa de macrófagos (40), apresentou uma morfologia heterogênea, apresentando uma população com a presença de grandes filopódios bem formados e semelhança com fibroblastos e uma segunda população com filopódios menores e um formato mais arredondado com a ausência de grânulos. A presença de uma subpopulação de M2 é esperada devido a variedade de subtipos de macrófagos M2 (38). Ademais, essa diferença morfológica é um indicativo de diferenciação dos macrófagos como apresentado em outros estudos (37,20) e está de acordo com os resultados esperados (41).

Para confirmar a polarização dos macrófagos nos fenótipos M1 e M2, foi realizada citometria de fluxo. Os resultados indicaram que os macrófagos ativados classicamente (M1) apresentaram 32,7% de positividade para o marcador CD68, valor superior ao observado no grupo controle não tratado com citocinas pró-inflamatórias. Esse achado corrobora com estudos prévios que demonstram a polarização de células da linhagem RAW 264.7 para o fenótipo M1 após estímulo com citocinas inflamatórias (20).

Da mesma forma, os macrófagos ativados alternativamente com citocinas anti-inflamatórias demonstraram 40% de positividade para o marcador CD163, característico do fenótipo M2. Esse resultado confirma a eficácia da polarização para M2, em concordância com a literatura, que descreve a ação de IL-4 e IL-13 na indução desse fenótipo.

Os dados da citometria de fluxo corroboram com a análise morfológica realizada por microscopia óptica que observou alterações fenotípicas compatíveis com os perfis M1 e M2, como citado anteriormente. A associação dessas duas análises fornece uma boa interpretação dos resultados, validando a polarização dos diferentes fenótipos de macrófagos.

Contudo, vale ressaltar que embora a polarização para os marcadores M1 (32,7%) e M2 (40%) seja compatível com estudos em culturas primárias, é menor do que o observado na literatura para linhagens imortalizadas. Esse cenário é esperado devido a heterogeneidade do lavado peritoneal que pode apresentar subpopulações não reativas aos estímulos, entretanto, os valores encontrados estão dentro do esperado na literatura para modelos ex vivo (41).

Entretanto, no presente estudo foi observado uma perda significativa da viabilidade celular após o descongelamento. Esse resultado é uma limitação de culturas primárias que tendem a ser mais sensíveis a ciclos de congelamento, afetando seu armazenamento a longo prazo e a reprodutividade do estudo, o que não é observado em linhagens imortalizadas como a RAW 264.7 (24). Nesse sentido, ajustes metodológicos como a associação de DMSO com trealose em busca de recuperar a viabilidade dos macrófagos primários são aprimoramentos necessários no futuro para ampliar o uso de modelos ex vivo e melhorar seus resultados.

Assim, observa-se que a polarização do lavado peritoneal de camundongos BALB/c para macrófagos M1 e M2 foi bem sucedida segundo os resultados da análise morfológica em que a estrutura celular se assemelha ao já observado anteriormente em outros estudos, quanto à

confirmação dos fenótipos pela técnica de citometria de fluxo. Esses resultados são complementares e validam o uso de macrófagos peritoneais como modelo confiável para estudos de polarização M1/M2 in vitro. Além disso, os resultados corroboram com dados da literatura, tanto em termos de morfologia quanto de expressão de marcadores, reforçando a validade do protocolo e sua aplicabilidade em outros estudos.

Conclusão

A pesquisa apresentada demonstra a viabilidade do uso de um modelo ex vivo com macrófagos peritoneais isolados de camundongos BALB/c para verificar a capacidade de polarização de macrófagos primários nos fenótipos M1 e M2 a partir do tratamento com citocinas pró e anti-inflamatórias como LPS e IFN- γ para M1, e IL-4 e IL-13 para M2. O tratamento foi eficaz para indução dos dois perfis funcionais, como demonstrado por alterações morfológicas observadas por microscópio óptico invertido e pela expressão de marcadores de superfície confirmada por citometria de fluxo.

A análise em conjunto dessas duas metodologias demonstrou a presença de fenótipos típicos, com expressão significativa de CD68 no grupo M1 com 32,7% de positividade e CD163 no grupo M2 com 40%, o que são valores consistentes com a literatura. Tais achados validam o protocolo experimental e reforçam a possibilidade de usar modelos ex vivo como uma alternativa mais próxima da fisiológica para estudar a polarização de macrófagos.

Além disso, ao evidenciar a eficiência da polarização, este trabalho contribui com dados relevantes para o avanço na compreensão da imunoplasticidade dos macrófagos e reforça sua importância no contexto tumoral, onde o equilíbrio entre os fenótipos M1 e M2 pode modular diretamente a progressão ou regressão de neoplasias. A possibilidade de reverter o perfil M2, associado a tumores agressivos, para M1 abre caminho para futuras estratégias imunoterapêuticas.

Portanto, as perspectivas futuras implica no aprimoramento desta metodologia com o testes de crioprotetores para expandir o uso dos macrófagos primários após o congelamento, diminuindo uma das limitações deste trabalho e investigar a possibilidade de reversão fenotípica in vitro, avaliando se macrófagos previamente polarizados para M1 ou M2 podem ser repolarizados mediante novos estímulos e qual o impacto disso sobre funções dos macrófagos em diversas patologias, como o câncer.

Referências

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2022). Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. (6ª ed.)

RIBAS, A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. Cancer Discovery, v. 5, n. 9, p. 915–919, 13 ago. 2015.

Kaufmann SH. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the nobel prize to paul ehrlich and elie metchnikoff. Nat Immunol. (2008) 9:705–12. 10.1038/ni0708-705

JANWAY, C. A. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5. ed. New York: Garland Science, 2001.

EIZ-VESPER, B.; SCHMETZER, H. Antigen-Presenting Cells: Potential of Proven und New Players in Immune Therapies. Transfusion Medicine and Hemotherapy, v. 47, n. 6, p. 429–431, 2020.

GAUDINO, S. J.; KUMAR, P. Cross-Talk between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. Frontiers in Immunology, v. 10, n. 360, 6 mar. 2019.

MURPHY, K.; WEAVER, C. Janeway's Immunobiology. 9. ed. New York: Garland Science, 2016.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature, v. 496, n. 7446, p. 445–455, abr. 2013.

Kovacevic Z., Sahni S., Lok H., Davies M.J., Wink D.A. and Richardson D.R. (2017) Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1861, 995–999 10.1016/j.bbagen.2017.02.021

Deng Z., Shi F., Zhou Z., Sun F., Sun M.H., Sun Q., Chen L., Li D., Jiang C.Y., Zhao R.Z., et al. M1 macrophage mediated increased reactive oxygen species (ROS) influence wound healing via the MAPK signaling in vitro and in vivo. Toxicol. Appl. Pharm. 2019;366:83–95. doi: 10.1016/j.taap.2019.01.022.

ZHOU, W.; YANG, F.; ZHANG, X. Roles of M1 Macrophages and Their Extracellular Vesicles in Cancer Therapy. Cells, v. 13, n. 17, p. 1428–1428, 26 ago. 2024.

Hadrop, S.; Donia, M.; thor Straten, P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron.2013, 6, 123–133.

Susek, K.H.; Karvouni, M.; Alici, E.; Lundqvist, A. The Role of CXCR Chemokine Receptors 1–4 on Immune Cells in the Tumor Microenvironment. Front. Immunol. 2018, 9, 2159.

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021.

Bouhlef, M.A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Diévert, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadzki, C.; Jude, B.; Topier, G.; Marx, N.; et al. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-Inflammatory Properties. Cell Metabol. 2007, 6, 137–143.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in Immunology, v. 25, n. 12, p. 677–686, dez. 2004.

GHARAVI, A. T. et al. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. Cellular & Molecular Biology Letters, v. 27, n. 1, 3 out. 2022.

Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. Cancer Cell. 13 de abril de 2015;27(4):462–72.

CASSETTA, L.; POLLARD, J. W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 12, p. 887–904, 26 out. 2018.

Junior, R. F. A. et al. Retinoic acid-loaded PLGA nanocarriers targeting cell cholesterol potentialize the antitumour effect of PD-L1 antibody by preventing epithelial-mesenchymal transition mediated by M2-TAM in colorectal cancer. *Transl Oncol* 31, 101647, doi:10.1016/j.tranon.2023.101647 (2023). acesso: 23/05/24

Cavalcante, Rômulo S., et al. “STAT3/NF-KB Signalling Disruption in M2 Tumour -Associated Macrophages Is a Major Target of PLGA Nanocarriers/PD-L1 Antibody Immunomodulatory Therapy in Breast Cancer.” *British Journal of Pharmacology*, vol. 178, no. 11, 1 June 2021, pp. 2284–2304, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8251773/, <https://doi.org/10.1111/bph.15373>.

Jorquera-Cordero, Carla, et al. “Extracellular Vesicles from M1-Polarized Macrophages Combined with Hyaluronic Acid and a β -Blocker Potentiate Doxorubicin’s Antitumor Activity by Downregulating Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer.” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 5, 17 May 2022, p. 1068, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051068>.

BOSSHART, H.; HEINZELMANN, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, v. 4, n. 21, p. 438–438, nov. 2016.

TACIAK, B. et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0198943, 11 jun. 2018.

VIERHOUT, M. et al. A novel ex vivo approach for investigating profibrotic macrophage polarization using murine precision-cut lung slices. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 741, p. 151038, 2024.

COURT, M. et al. Proteomic Signature Reveals Modulation of Human Macrophage Polarization and Functions Under Differing Environmental Oxygen Conditions. v. 16, n. 12, p. 2153–2168, 8 set. 2017.

BRASIL. Resolução normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013 - Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal –CONCEA, 2013.

de Araujo Junior, Raimundo Fernandes, et al. “Ceramide and Palmitic Acid Inhibit Macrophage-Mediated Epithelial–Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer.” *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 468, no. 1-2, 28 Mar. 2020, pp. 153–168, <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03719-5>.

SOUZA, S. V. DE P. et al. M1 Macrophage Extracellular Vesicles and TLR3 Agonist Nanoparticles Down-Regulate Immunosuppression and Metastasis via AKT/TAM in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular carcinogenesis*, p. 10.1002/mc.70003, Winter 2025.

THIRANUT JAROONWITCHAWAN et al. Stimulation of the farnesoid X receptor promotes M2 macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 27 jan. 2023.

COURT, M. et al. Proteomic Signature Reveals Modulation of Human Macrophage Polarization and Functions Under Differing Environmental Oxygen Conditions. v. 16, n. 12, p. 2153–2168, 8 set. 2017.

ISIDRO, R. A.; APPLEYARD, C. B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 311, n. 1, p. G59–G73, 1 jul. 2016.

MILLS, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, v. 32, n. 6, p. 463–488, 2012.

TEDESCO, S. et al. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 71, 2018.

ZHANG, Y. et al. High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PloS One*, v. 8, n. 9, p. e76147, 2013.

HUNTER, M. M. et al. In Vitro-Derived Alternatively Activated Macrophages Reduce Colonic Inflammation in Mice. *Gastroenterology*, v. 138, n. 4, p. 1395–1405, abr. 2010.

Hong, G.E., Park, H.S., Kim, J.A., Nagappan, A., Zhang, J., Kang, S.R., Won, C.K., Cho, J.H., Kim, E.H., Kim, G.S.: Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of *Fraxinus rhynchophylla* on lipopolysaccharide (LPS)-induced murine Raw 264.7 cells. *J.Biomed. Res.* 13, 331–338 (2012)

STRIZOVA, Z. et al. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clinical Science (London, England : 1979)*, v. 137, n. 15, p. 1067–1093, 1 ago. 2023.

BOUVET, M. et al. Proteomic Profiling of Macrophages by 2D Electrophoresis. *Journal of Visualized Experiments*, n. 93, 4 nov. 2014.

MILLS, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, v. 32, n. 6, p. 463–488, 2012.

PLOEGER, D. T. et al. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Communication and Signaling*, v. 11, n. 1, p. 29, 2013.

Anexos

Figura 1: Painel de Caracterização morfológica após polarização por microscopia óptica: Após 48 horas na estufa sendo apenas mantido no meio RPMI sem soro bovino fetal, os macrófagos peritoneais apresentaram morfologia semelhante às células RAW 264.7.

Morfologia de macrófagos RAW 264.7 em microscopia óptica. Fonte: KUSUMASTUTI, et al. 2021.

Figura 3: Painel de Caracterização morfológica após polarização por microscopia óptica:
Após 48 horas na estufa recebendo o tratamento com LPS+IFN gama os macrófagos
peritoneais apresentam morfologia semelhante ao fenótipo M1

Figura 4: Painel de Caracterização morfológica após polarização por microscopia óptica:
Após 48 horas na estufa recebendo o tratamento com IL4+IL13 os macrófagos peritoneais
apresentam morfologia semelhante ao fenótipo M2 grandes alongamentos de filopódio

Figura 5: Painel de Histograma de Citometria de Fluxo para o fenótipo M1: Painel de
citometria de fluxo para a confirmação do fenótipo M1.

Análise estatística do fenótipo M1: Gráfico com porcentagem de células positivas para o
marcador CD68 comparando o grupo Não tratado com o grupo +LPS + IFN- γ .
* $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figura 7: Painel de Histograma de Citometria de Fluxo para o fenótipo M2: Painel de
citometria de fluxo para a confirmação do fenótipo M2.

Figura 8: Análise estatística do fenótipo M2: Gráfico com porcentagem de células positivas
para o marcador CD163 comparando o grupo Não tratado com o grupo + IL-4 + IL-13.
* $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

CÓDIGO: SB0205

AUTOR: NICOLE BEZERRA DE MEDEIROS LIMA

COAUTOR: FERNANDA PALHANO XAVIER DE FONTES

COAUTOR: GEOVAN MENEZES DE SOUSA JÚNIOR

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: DEPRESSÃO RESISTENTE AO TRATAMENTO: A EFICÁCIA DA CETAMINA SUBCUTÂNEA ASSOCIADA À PSICOTERAPIA ASSISTIDA NA SUICIDABILIDADE

Resumo

Esse artigo pretende analisar a variação do nível de suicidalidade para pacientes com depressão resistente ao tratamento submetidos à psicoterapia assistida por cetamina (PAC), sendo $n = 24$. As variações no nível de suicidalidade foram avaliadas por meio do Inventário Beck de Ideação Suicida (BSI) e da MADRS-IS (Escala de Depressão de Montgomery-Åsberg – ideação suicida) nas sessões 1, 4 e 8. Como resultado, foi visto em ambas as escalas uma redução significativa entre a sessão 1 e 4 e entre a sessão 1 e 8, porém, não entre a sessão 4 e 8. Portanto, o estudo sugere que injeções subcutâneas semanais de cetamina reduzem a tendência suicida em pacientes depressivos resistentes ao tratamento, com uma ação sustentada ao longo de pelo menos 8 semanas, ou seja, confirmando um efeito a médio prazo após múltiplas administrações da cetamina pela via subcutânea, ao mesmo tempo que abre possibilidades para que estudos acerca da psicoterapia assistida por cetamina perdurem a fim de que conclusões sólidas possam ser construídas, inclusive comparando este grupo submetido à PAC a um outro submetido apenas à aplicação da cetamina subcutânea.

Palavras-chave: Cetamina. Depressão resistente ao tratamento. Psicoterapia assistida.

TITLE: TREATMENT-RESISTANT DEPRESSION: THE EFFECTIVENESS OF SUBCUTANEOUS KETAMINE ASSOCIATED WITH ASSISTED PSYCHOTHERAPY IN SUICIDALITY

Abstract

This article aims to analyze the variation in the level of suicidality for patients with treatment-resistant depression undergoing ketamine-assisted psychotherapy (CAP), $n = 24$. Variations in the level of suicidality were assessed using the Beck Suicidal Ideation Inventory (BSI) and the MADRS-IS (Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale – suicidal ideation) in sessions 1, 4, and 8. As a result, a significant reduction was seen on both scales between sessions 1 and 4 and between sessions 1 and 8, but not between sessions 4 and 8. Therefore, the study suggests that weekly subcutaneous injections of ketamine reduce suicidality in treatment-resistant depressed patients, with a sustained action over at least 8 weeks, that is,

confirming a medium-term effect after multiple administrations of ketamine via the subcutaneous route, while also opening the possibility for studies on ketamine-assisted psychotherapy to continue so that solid conclusions can be drawn, including comparing this group subjected to CAP to another subjected only to subcutaneous ketamine application.

Keywords: Ketamine. Treatment-resistant depression. Assisted psychotherapy.

Introdução

O transtorno depressivo maior é uma condição clínica prevalente, atingindo cerca de 300 milhões de pessoas no mundo. Atualmente existem diversos antidepressivos utilizados para restaurar pacientes mentalmente deprimidos a um estado mental melhorado, reduzindo a intensidade dos sintomas, com destaque para o comportamento suicida (RAMELO, 2021). Apesar desse número crescente e promissor de novas drogas, percebe-se que, ainda assim, não há um avanço significativo na eficácia dos tratamentos, o que é indispensável quando se pensa na melhoria da qualidade de vida do paciente. Depressão resistente ao tratamento (DRT) é definida como depressão grave com resposta insatisfatória a dois medicamentos (em dosagem ótima e duração adequada) de duas classes diferentes de antidepressivos. Em alguns casos, esses pacientes respondem a combinação de antidepressivos ou eletroconvulsoterapia (ECT) (Al-Harbi, 2012). Alguns estudos sugerem que o uso de antidepressivos poderia resultar em um aumento do risco de ideação suicida e comportamentos correlatos, sobretudo ADTs (antidepressivos tricíclicos), visto que, em uma metanálise realizada pela Food and Drug Administration (FDA) com sujeitos que faziam tratamento com antidepressivos em ensaios para transtornos mentais, observou-se uma elevação no risco de ideação suicida e autolesões não fatais (RAMELO, 2021). Por outro lado, pacientes com DRT também enfrentam um risco aumentado de ideação suicida caso uma alternativa de tratamento não seja encontrada (RECCO, 2020). Nos últimos anos, ensaios clínicos evidenciaram resposta antidepressiva da cetamina já nos primeiros dias após a primeira sessão, incluindo casos que não responderam à ECT (LIMA, 2020). Entretanto, estudos com administração intramuscular (IM) e subcutânea (SC) da cetamina ainda são pouco comuns, embora a via SC tenha benefícios, como mais fácil administração e poder alcançar níveis plasmáticos da cetamina comparáveis à via IV. Além disso, os estudos que avaliam o uso da cetamina por via SC em pacientes com inclinação suicida geralmente são agudos, ou seja, com um período curto de análise (ACEVEDO-DIAZ, 2020). Portanto, é importante analisar também a resposta à longo prazo do tratamento através da via SC e seus possíveis efeitos colaterais. A discussão sobre o uso da cetamina para o tratamento de pacientes com DRT torna-se relevante, pois minimiza os riscos de efeitos adversos sobre o comportamento suicida, ao mesmo tempo que oferece um tratamento efetivo na redução dos sintomas depressivos, destacando-se a questão do suicídio. Segundo CORRÊA (2018), a cetamina como terapia farmacológica auxiliar na prevenção ao comportamento suicida se evidencia por 3 razões: a letargia da eficácia dos tratamentos atuais, a natureza repetente do ato de tentativa de suicídio, sendo primordial impedir a primeira tentativa dessa ação e, por fim, sua letalidade. Durante a experiência com cetamina, memórias traumáticas podem vir à tona, sendo um contexto propício para que essas experiências possam ser trabalhadas. Desse modo, estão emergindo os primeiros modelos de psicoterapia assistida por cetamina (PAC), diferenciando-se das intervenções psiquiátricas tradicionais, pois focam na busca de soluções e na modificação de padrões cognitivos e comportamentos (Dore et al. 2019; Muscat et al. 2021). A PAC também oferece um espaço de psicoeducação sobre os efeitos e a segurança da cetamina. Considerando as evidências sobre os impactos positivos da cetamina em quadros de DRT e na redução dos níveis de suicidalidade dos pacientes, é fundamental analisar o uso da cetamina a longo prazo por via

de administração subcutânea associada à psicoterapia assistida. Isso permitirá uma melhor compreensão das vantagens e possíveis efeitos adversos de estratégia terapêutica, contribuindo para a melhoria dos tratamentos na depressão resistente e na prevenção do suicídio.

Metodologia

Participantes

O estudo recrutou 24 pacientes com idade entre 18 e 65 anos com depressão resistente ao tratamento e com indicação para terapia com cetamina pela equipe de psiquiatria do HUOL. A triagem de pacientes ocorreu no ambulatório de depressão do HUOL, utilizando a SCDI (Entrevista Clínica Estruturada para DSM-5) a fim de atender aos critérios de inclusão e exclusão. O estudo é restrito a pacientes em episódio depressivo grave/severo atual, ocorrendo há pelo menos 4 semanas, e que já tenham feito uso de pelo menos dois medicamentos antidepressivos, em dose e duração adequadas. Os critérios de exclusão incluem condições físicas e mentais que impeçam o uso seguro de cetamina: hipertensão não controlada, insuficiência cardíaca congestiva ou outras evidências de comprometimento do estado cardíaco, DPOC, obesidade grave, aumento da pressão intracraniana, gravidez, hipertireoidismo, resposta adversa prévia à cetamina, sintomas psicóticos presentes ou passados, distúrbio de identidade dissociativo, distúrbio do espectro do autismo e sintomas prodrômicos da esquizofrenia. Os pacientes que preencheram os critérios de elegibilidade para participação no estudo foram solicitados a preencher e assinar o consentimento informado (TCLE), e realizar a primeira aferição dos sintomas de depressão pela Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS).

Desenho experimental

O estudo é composto da aplicação de escalas clínicas e coleta de sangue e saliva em pacientes que estão sendo submetidos ao protocolo clínico para tratamento de depressão resistente ao tratamento que consiste na aplicação de cetamina subcutânea em co-terapia com a PAC, 1 vez por semana durante 8 semanas.

No dia da aplicação da cetamina ou PAC, o paciente é recebido por um membro da equipe de pesquisa, que tornará a explicar detalhes dos procedimentos. Foram coletados dados demográficos e clínicos da doença no encontro inicial do estudo e também realizadas todas as medidas de linha de base por meio da aplicação das escalas:

- 1) MADRS (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale): é um questionário de 10 itens amplamente utilizado para avaliar a gravidade da depressão em ensaios clínicos e na prática e foi aplicada antes e após cada sessão com cetamina.
- 2) CADSS (Clinician Administered Dissociative State Scale): avalia sintomas dissociativos e psicotomiméticos antes da administração da cetamina, quarenta (40) minutos após e passado o efeito agudo da cetamina para a análise de sua resposta no organismo do paciente.
- 3) BSI (inventário Beck de ideação suicida): medida escalar de auto-relato, que objetiva a identificação da presença de ideação suicida que foi aplicada um dia antes da sessão, no dia da sessão - antes da aplicação da cetamina - e um dia após a aplicação da cetamina.

Ao final de cada sessão, os participantes foram avaliados clinicamente e liberados, na presença do acompanhante. Um dia após as sessões, é solicitado aos pacientes que preencham

a BSI. A aplicação das escalas que aferem depressão (MADRS) e suicídio (BSI) foi realizada até a nona semana.

Esse estudo fez uso de cetamina na forma de Dextrocetamina, à dose recomendada de 0,5 mg/kg na primeira infusão. Caso não haja resposta adequada, a segunda infusão é realizada com dose de 0,75 mg/kg e as subsequentes 1 mg/kg. Nesse processo de escalonamento, a dose mais baixa para a qual observamos resposta (e.g., 0,5 ou 0,75 mg/kg) foi repetida ao longo do tratamento.

O programa de PAC consiste em três etapas conduzidas pelo Psicoterapeuta: Preparação, Experiência e Integração. Os encontros da primeira fase, a de preparação, são marcados após a inclusão do paciente no estudo e antes da primeira aplicação de cetamina. Essa fase consiste na preparação para vivência da experiência com a cetamina, momento em que o paciente recebe a psicoeducação sobre os efeitos físicos e psíquicos da cetamina, dissociação, expansão de consciência, correlação entre história de traumas e depressão, bem como benefícios dessa modalidade terapêutica.

A segunda fase, da Experiência, ocorre durante a aplicação da cetamina. Nesta fase, durante o procedimento, o participante será continuamente monitorado por um psicólogo treinado para manejar efeitos físicos, dissociativos e desregulação emocional ou somática pela evocação de experiências traumáticas. Nessa fase será reforçada a postura de observador externo e será solicitado de forma não diretiva que as experiências vivenciadas internamente sejam colocadas em palavras.

A terceira fase, da Integração, ocorre no dia seguinte da aplicação de cetamina e poderá ser realizada de forma presencial ou à distância, o objetivo principal é aproveitar a abertura da consciência para abordar de forma não diretiva a experiência, fornecendo espaço para o participante compartilhar suas percepções e auxiliar no manejo de dificuldades surgidas, e construir, junto ao participante, uma compreensão da experiência a partir de uma posição de observador externo, e possibilitar a generalização das aprendizagens adquiridas para a vida cotidiana de forma mais flexível e saudável.

Análise estatística

Nesse estudo, a suicidabilidade (MADRS-IS e BSI) foi utilizada como variável dependente, a sessão de dosagem de cetamina (Sessão 1, Sessão 4 e Sessão 8) como variável de medida repetida e a idade covariável. Para análise dos dados, foi utilizada a estratégia de intenção de tratar, no qual os casos ausentes foram substituídos pela média na respectiva sessão. Para testar o efeito da psicoterapia assistida por cetamina nos índices de suicidabilidade ao longo das sessões, foi realizada uma análise de covariância de medidas repetidas (ANCOVA- MR) e pós-hoc de Holm (com ajuste para múltiplas comparações). O tamanho do efeito relatado foi o d de Cohen. O nível de significância estatística foi $p < 0,050$.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Dos 24 pacientes que preencheram os critérios de inclusão para serem submetidos à PAC, 2 abandonaram o estudo durante sua execução: um participante após a terceira aplicação por questões pessoais e um participante após a terceira aplicação apresentou planejamento suicida necessitando de internação e foi descontinuado do estudo, totalizando 22 participantes ao final.

Ao final, foi encontrado um efeito da sessão para a MADRS-IS ($F(1,4, 34,8) = 7,790, p = 0,004$) e para a BSI ($F(1,7, 42,8) = 3,746, p = 0,038$). Os testes pós-hoc indicaram que ambas os índices diminuíram entre a Sessão 1 e a Sessão 4 (MADRS-IS: $t = 5,70, p < 0,001, d = 1,38$; BSI: $t = 3,43, p = 0,002, d = 0,65$) e entre a Sessão 1 e a Sessão 8 (MADRS-IS: $t = 7,03, p < 0,001, d = 1,70$; BSI: $t = 4,69, p < 0,001, d = 0,89$), mas não entre a Sessão 4 e a Sessão 8 (MADRS-IS: $t = 1,33, p = 0,190, d = 0,19$; BSI: $t = 1,26, p = 0,215, d = 0,24$) (Figura 1).

DISCUSSÃO

Em relação ao efeito da cetamina observado no estudo, os resultados analisados corroboram a eficácia, a médio prazo, das 8 sessões de infusões subcutâneas repetidas de cetamina na redução da ideação suicida dos pacientes com DRT de forma sustentada ao longo de pelo menos 4 e 8 semanas. Uma resposta semelhante foi observada em um estudo que demonstrou efeitos cumulativos na redução da ideação suicida em pacientes submetidos a infusões repetidas de cetamina intravenosa três vezes por semana com manutenção dos efeitos a partir de infusões uma vez por semana (PHILLIPS et al. 2020). Porém, o nosso estudo fez uso da via subcutânea e apenas 1 vez por semana, sendo mais viável para ser aplicado no cotidiano e menos oneroso, mas, ainda assim, alcançando resultados promissores.

Ionescu et al, 2021, realizou um estudo com adultos com depressão maior e ideação suicida ativa, comparando spray nasal de escetamina em relação ao placebo 2 vezes por semana durante 4 semanas. A avaliação da gravidade dos sintomas depressivos e do nível de ideação suicida era realizada antes, 4 e 24 horas após a primeira dose do spray nasal, sendo observado, ao final, uma redução significativa do nível de suicidabilidade dos pacientes. Ao contrapor esses dados com os resultados do nosso estudo, é possível observar que as múltiplas administrações de cetamina subcutânea também apresentam eficácia na redução da ideação suicida, entretanto, com a vantagem dos custos reduzidos em relação à escetamina intranasal, além da possibilidade de manter um benefício a médio prazo, o que, no estudo comparado, assim como na grande maioria, só se observam análises a curto prazo.

Um ponto importante de ser ressaltado em relação ao estudo é que os pacientes continuaram com prescrições orais de antidepressivos que já faziam uso antes do estudo, o que pode ser um fator de confusão, a exemplo do que foi mostrado no ensaio clínico de Hu et al. (2015), em que a associação de infusão de cetamina a inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) produziu menor tempo de resposta em comparação ao grupo fazendo uso de ISRS associado a placebo, resultando em pontuações mais baixas em escalas para avaliação da ideação suicida. Esse contexto chama atenção para a possibilidade de se investir em estudos que controlem o tipo de antidepressivo usado pelos pacientes submetidos à administração da cetamina a fim de que associações medicamentosas que potencializam os efeitos antidepressivos sejam analisadas.

Além disso, é válido reiterar que esse estudo, ao avaliar o impacto da PAC no nível de suicidabilidade dos pacientes, é imprescindível no cenário atual, tendo em vista que grande parte dos trabalhos publicados avaliam o efeito da psicoterapia assistida por cetamina nos sintomas depressivos e em outros transtornos psiquiátricos, sem necessariamente se atentar aos pacientes com ideação suicida ativa (Drozd, et al. 2022; Dore et al. 2019; Yermus et al. 2024).

É importante destacar que o estudo em questão ainda pretende fazer uma análise comparativa entre um grupo submetido exclusivamente à cetamina e outro submetido à PAC, a fim de

elucidar se existe uma diferença significativa quanto à associação da medicação com a psicoterapia. Nesse sentido, ao se debruçar sobre a literatura atual, percebe-se um grande potencial na associação da psicoterapia ao uso da cetamina em pacientes com ideação suicida, a exemplo do estudo CBT-ENDURE, o qual foi o primeiro a examinar o potencial da terapia cognitivo-comportamental na melhora dos resultados a longo prazo após o uso da cetamina em pacientes com TDM e ideação suicida, demonstrando que pesquisas futuras devem ser incentivadas, mas a psicoterapia parece ser valiosa na capacidade de melhorar os resultados a longo prazo ou de minimizar a carga contínua do tratamento com a cetamina nesses pacientes (Kitay, B. M. et al. 2023).

Portanto, o estudo em questão permite ampliar conhecimentos já consolidados acerca da eficácia a médio prazo das múltiplas aplicações de cetamina subcutânea associada à psicoterapia assistida no que se refere à redução da ideação suicida, especialmente explicitada pela manutenção da queda dos valores de BSI e da MADRS-IS nas sessões 4 e 8 em relação ao início do estudo (sessão 1), sendo necessário persistir na investigação dessa estratégia terapêutica em pacientes com depressão resistente ao tratamento, inclusive comparando a eficácia entre o uso exclusivo da cetamina e a associação com a psicoterapia.

Conclusão

Com base no que foi apresentado, pode-se constatar que os resultados analisados têm muito a contribuir com estudos futuros, uma vez que permite validar o uso da cetamina por uma via de administração com menor custo - subcutânea - e com eficácia a médio prazo, emergindo como uma interessante possibilidade no tratamento de pacientes com ideação suicida que requerem acompanhamento por períodos mais longos. Além disso, chama atenção para a possibilidade de resultados promissores da inclusão da psicoterapia como estratégia de potencialização do efeito da cetamina no que se refere à redução do nível de suicidabilidade dos pacientes. Dessa forma, tanto a cetamina subcutânea quanto a associação com a psicoterapia emergem como estratégias para ampliar o acesso a tratamentos eficazes e menos onerosos para pacientes com DRT.

Referências

ACEVEDO-DIAZ, Elia E. et al. Comprehensive assessment of side effects associated with a single dose of ketamine in treatment-resistant depression. *Journal of Affective Disorders*, v. 263, p. 568-575, 2020.

AL-HARBI, K. S. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Preference and Adherence*, v. 6, p. 369-388, 2012.

CORRÊA, Cristiane Rodrigues et al. O uso de cetamina no tratamento de pacientes com tendências suicidas: uma revisão literária. *Revista Interdisciplinar Ciências Médicas*, v. 2, n. 2, p. 57-65, 2018.

DORE, J. et al. Ketamine Assisted Psychotherapy (KAP): Patient Demographics, Clinical Data and Outcomes in Three Large Practices Administering Ketamine with Psychotherapy. *J Psychoactive Drugs*, [S.l.], v. 51, n. 2, p. 189-198, abr./jun. 2019.

DOS SANTOS, Paulo Ricardo Pereira; DE PAULA, Scheyla Pereira; DE CARVALHO, Clézio Rodrigues. O uso de antidepressivos e sua possível influência na manifestação de comportamento suicida. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, v. 3, n. 7, p. 676-683, 2020.

DROZDZ, Sandra J. et al. Ketamine assisted psychotherapy: a systematic narrative review of the literature. *Journal of Pain Research*, v. 15, p. 1691-1706, 2022.

KITAY, B. M. et al. Cognitive behavioral therapy following esketamine for major depression and suicidal ideation for relapse prevention: The CBT-ENDURE randomized clinical trial study protocol. *Psychiatry Research*, v. 330, p. 115585, dez. 2023.

LIMA, Ana Júlia Modesto et al. Os efeitos do uso da cetamina em pacientes com depressão resistente ao tratamento. 2020.

MUSCAT, S. A.; HARTELIUS, G.; CROUCH, C. R.; MORIN, K. W. An Integrative Approach to Ketamine Therapy May Enhance Multiple Dimensions of Efficacy: Improving Therapeutic Outcomes With Treatment Resistant Depression. *Front Psychiatry*, [S.l.], v. 12, p. 710338, 24 nov. 2021.

RAMELO, Bruna Cristina et al. Avaliação do uso de antidepressivos e sua relação com a incidência de suicídio. *Revista Ensaios Pioneiros*, v. 5, n. 1, p. 61-71, 2021.

SOUZA, Fábio Gomes de Matos. Tratamento da depressão. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 21, p. 18-23, 1999.

YERMUS, Ryan et al. Ketamine-assisted psychotherapy provides lasting and effective results in the treatment of depression, anxiety, and post-traumatic stress disorder at 3 and 6 months: Findings from a large retrospective effectiveness study. *Psychedelic Medicine*, 2024.

Anexos

figura 1

CÓDIGO: SB0220

AUTOR: HEITOR AUGUSTO TRINDADE DE FARIA

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A PERSONALIDADE E A RESPOSTA CLÍNICA À CETAMINA SUBCUTÂNEA NA DEPRESSÃO RESISTENTE AO TRATAMENTO

Resumo

Introdução: O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma das principais causas de incapacidade global. Um terço dos pacientes com TDM não responde aos tratamentos convencionais, caracterizando a Depressão Resistente ao Tratamento (DRT). A cetamina, tradicionalmente um anestésico, demonstrou eficácia no tratamento da DRT, com início de resposta terapêutica rápida. Contudo, a relação entre os traços de personalidade e a resposta ao tratamento de DRT com cetamina ainda é pouco investigada. **Metodologia:** Foram recrutados 48 pacientes com DRT e distribuídos em dois grupos: Psicoterapia Assistida por Cetamina (n=24) e apenas cetamina (n=24). A gravidade dos sintomas foi avaliada pela Escala Clínica de Montgomery-Åsberg para Depressão e os traços de personalidade pela Escala de Personalidade dos Cinco Grandes Fatores. A análise da associação entre personalidade e resposta clínica foi realizada apenas para o grupo que usou apenas cetamina. **Resultados e Discussão:** Ambos os grupos apresentaram uma redução progressiva nos sintomas depressivos ao longo do tempo, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. No grupo que usou apenas cetamina, o fator de personalidade Abertura foi o único que associado significativamente à resposta clínica, o que corrobora com achados de outras modalidades de tratamento para DRT. O modelo para predição da resposta clínica não foi significativo. Futuras pesquisas podem explorar novas relações entre a cetamina e a mudança nos traços de personalidade.

Palavras-chave: Cetamina; saúde mental; personalidade; depressão resistente.

TITLE: Analysis of the Relationship Between Personality and Clinical Response to Subcutaneous Ketamine in Treatment-Resistant Depression

Abstract

Introduction: Major Depressive Disorder (MDD) is a leading cause of global disability. One-third of patients with MDD do not respond to conventional treatments, a condition known as Treatment-Resistant Depression (TRD). Ketamine, traditionally an anesthetic, has demonstrated effectiveness in treating TRD, with a rapid therapeutic response onset. However, the relationship between personality traits and the response to ketamine treatment for TRD remains poorly investigated. **Methodology:** A total of 48 patients with TRD were recruited. They were divided into two groups: ketamine-assisted psychotherapy (KAP) (n=24) and ketamine alone (n=24). Symptom severity was evaluated using the Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS). Personality traits were assessed using the Big Five Personality Factors (BFF) Scale. The association between personality and clinical

response was analyzed only for the ketamine-alone group. Results and Discussion: Both groups showed a progressive reduction in depressive symptoms over time, but the difference was not statistically significant. In the ketamine-alone group, the personality trait 'Openness' was the only one significantly associated with clinical response. This finding is consistent with results from other TRD treatments. The model for predicting clinical response was not significant. Future research could explore new relationships between ketamine and changes in personality traits.

Keywords: Ketamine; mental health; personality; treatment-resistant depression.

Introdução

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição psiquiátrica de alta incidência global e que afeta a capacidade funcional e os vínculos sociais, sendo considerada uma das principais causas de incapacidade e invalidez em todo o mundo, e estima-se que cerca de 300 milhões de indivíduos convivem com o diagnóstico de TDM (Global Burden Disease, 2019). Um desafio notável é que aproximadamente um terço dos pacientes (Conway et al., 2017) não responde de forma satisfatória aos tratamentos com antidepressivos convencionais. Quando essa resposta inadequada persiste após o uso de dois tipos diferentes de antidepressivos ou tratamentos similares, o paciente é classificado como Depressão Resistente ao Tratamento (DRT) (Conway et al., 2017). Ao longo das últimas duas décadas, a busca por novas alternativas para a DRT levou a diversos estudos sobre a cetamina, um antagonista dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato. Essa substância, tradicionalmente usada como anestésico, demonstrou ser eficaz no tratamento da DRT, destacando-se pela agilidade do início da resposta terapêutica, que varia de 40 minutos a 24 horas, em contraste com as semanas necessárias para os antidepressivos atuais. Em 2019, a Food and Drug Administration (FDA 2019; Wajs et al., 2020) nos Estados Unidos, e posteriormente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, aprovaram o Spravato® (escetamina) em spray nasal. Contudo, o alto custo dessa forma de aplicação incentivou novas pesquisas para testar vias de administração menos onerosas, como a intravenosa e, posteriormente, a subcutânea. Os efeitos psicotomiméticos e dissociativos, entre outros efeitos colaterais da cetamina, parecem estar diretamente relacionados à dose e à via de administração, visto que ambos influenciam a farmacocinética da droga (Katalinic et al., 2013). A via de administração subcutânea é promissora para o tratamento da depressão com cetamina, pois aparenta provocar menos efeitos colaterais, resulta em níveis plasmáticos comparáveis aos da administração intravenosa e tem administração mais simples. Alguns estudos sugerem que o tipo de personalidade do paciente pode modular a resposta clínica em diversos transtornos, como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (Francez et al., 2015) e o Transtorno de Ansiedade (Silva et al., 2013). Tais estudos revelaram que níveis mais elevados de neuroticismo e valores mais baixos de conscienciosidade na personalidade do paciente aumentam o risco de sintomas residuais de depressão após o tratamento do TDM (Pitanupong et al., 2023). Contudo, os estudos que investigam a relação entre os traços de personalidade do paciente e a resposta clínica no tratamento da DRT com a administração de cetamina são escassos. Com isso, diante dos avanços em pesquisas sobre a relevância clínica da cetamina subcutânea como antidepressivo, especialmente em casos de DRT, e a possível influência dos fatores de personalidade na resposta terapêutica, torna-se essencial a análise, por meio de estudos clínicos, da relação entre a resposta clínica gerada por essa substância e os fatores de personalidade em pacientes com depressão resistente.

Metodologia

Foram recrutados 48 pacientes com idades entre 18 e 65 anos, diagnosticados com depressão resistente ao tratamento, que tinham sido recomendados para terapia com cetamina pela equipe de psiquiatria do HUOL. Os participantes foram inicialmente identificados e convidados a participar no ambulatório de depressão do HUOL. Após fornecerem seu consentimento informado através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foi realizada uma avaliação inicial para verificar sua elegibilidade para a pesquisa. A pesquisa incluiu apenas pacientes que apresentavam depressão de intensidade moderada a grave, com duração mínima de quatro semanas, e que já tinham recebido, com dose e duração adequadas, pelo menos dois medicamentos antidepressivos. Os critérios de exclusão incluíram condições de saúde física e mental que possam comprometer a segurança do uso da cetamina, como pressão arterial não controlada, insuficiência cardíaca congestiva ou outras doenças cardíacas, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), obesidade grave, aumento da pressão intracraniana ou do líquido cerebrospinal, gravidez, hipertireoidismo, histórico de reações adversas à cetamina, presença atual ou passada de sintomas psicóticos, transtorno dissociativo de identidade, transtorno do espectro autista e sintomas prodrômicos de esquizofrenia. Pacientes que não se qualificaram ou optaram por não participar foram encaminhados para o tratamento convencional. Após a seleção, os participantes foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: um grupo recebeu Psicoterapia Assistida por Cetamina (PAC) (n=24), e o outro recebeu somente cetamina (n=24). A randomização considerou também a disponibilidade de terapeutas para condução da PAC. A triagem inicial dos pacientes ocorreu em uma consulta clínica presencial no ambulatório de depressão do HUOL, onde um psiquiatra da equipe aplicou a Entrevista Clínica Estruturada para DSM-5 (SCDI) para diagnosticar a DRT. Os pacientes que atenderam aos critérios de elegibilidade assinaram o TCLE e tiveram a gravidade de seus sintomas depressivos avaliada inicialmente pela Escala Clínica de Montgomery-Åsberg para Depressão (MADRS). Nesse momento, também foram coletados dados demográficos. Após a inclusão no estudo, os traços de personalidade foram avaliados usando a Escala de Personalidade dos Cinco Grandes Fatores (CGF) (Hauck Filho et al., 2012). A avaliação dos traços de personalidade foi realizada apenas no grupo que recebeu somente cetamina. O monitoramento dos sintomas de depressão ao longo do estudo foi feito com a MADRS (Montgomery e Asberg, 1979), que foi administrada antes de cada sessão de cetamina e novamente na nona semana, uma semana após a última administração. O protocolo para o grupo que recebeu apenas cetamina consistiu em 8 sessões de aplicação subcutânea. As sessões ocorreram na sala de infusão do ambulatório de psiquiatria do HUOL, equipada com maca e duas poltronas para duas infusões simultâneas. No dia da sessão, os pacientes estavam em jejum de sólidos por 4 horas e de líquidos por 2 horas. Os pacientes alocados para o grupo PAC, além dos procedimentos já descritos, passaram pelas três fases da psicoterapia assistida: Preparação, Experiência e Integração, com a primeira fase iniciando-se antes da primeira aplicação de cetamina. O estudo utilizou Dextrocetamina, começando com uma dose inicial recomendada de 0,5 mg/kg na primeira infusão. Se a resposta não era adequada, a segunda infusão foi de 0,75 mg/kg, e as infusões subsequentes foram de 1 mg/kg. Durante o escalonamento, a dose mais baixa que proporcionou uma resposta eficaz (por exemplo, 0,5 ou 0,75 mg/kg) foi mantida ao longo do tratamento. Nesse estudo, cada fator de personalidade do BFI (avaliado apenas no grupo cetamina-exclusivo) e a MADRS foram utilizados como variáveis dependentes, enquanto a resposta clínica ao tratamento e o grupo de tratamento (Cetamina ou Psicoterapia Assistida por Cetamina [PAC]) foram utilizados como variável independente. O paciente foi considerado apresentar resposta clínica quando sua MADRS na última sessão (Sessão 8) representasse uma redução $\geq 50\%$ em relação à MADRS inicial (Semana 1). Para análise dos

dados, foi utilizada a estratégia de intenção de tratar, no qual os casos ausentes foram substituídos pela média do grupo na respectiva sessão. Para testar o efeito dos tratamentos nos sintomas depressivos (MADRS) ao longo das sessões, foi realizada uma análise de covariância de medidas repetidas (ANCOVA-MR) e pós-hoc de Holm, utilizando a idade como covariável. A diferença na taxa de resposta entre os grupos foi investigada pelo teste do Qui-quadrado. Para avaliar a associação entre resposta e personalidade, foi utilizado o teste t independente, com correção dos valores de p para comparações múltiplas por meio do método False Discovery Rate. Por fim, uma análise de regressão múltipla foi realizada para investigar o potencial dos fatores de personalidade como preditores da resposta clínica. As análises que envolvem os fatores de personalidade foram realizadas apenas para o grupo Cetamina visto que o grupo PAC ainda não teve tais dados curados para realização de análise estatística. O tamanho de efeito relatado foi o d de Cohen. O nível de significância estatística foi $p < 0,050$.

Resultados e Discussões

Para os sintomas depressivos (MADRS), foi encontrado apenas efeito de tempo ($F(1,9, 88,3) = 7,566, p = 0,001$) e não interação grupo*tempo ($F(1,9, 88,3) = 2,256, p = 0,114$), indicando que ambos os grupos reduzem progressivamente os sintomas depressivos (todos os p-valores do pós-hoc $< 0,001$). Avaliando os tamanhos de efeito, o grupo PAC apresenta maior tamanho de efeito entre semanas 1 e 8 (PAC: $d = 2,19$; Cetamina: $d = 1,69$); enquanto o grupo Cetamina possui tamanho de efeito ligeiramente maior entre as semanas 1 e 4 (PAC: $d = 1,43$; Cetamina: $d = 1,48$) (Figura 1). Com relação à resposta clínica, isto é, uma redução $\geq 50\%$ na MADRS ao final do tratamento em relação ao início do tratamento, o grupo PAC apresentou taxa de 60,9% de resposta, enquanto do grupo que foi tratado apenas com Cetamina, um total de 52,2% dos pacientes apresentou resposta (Figura 2). Apesar da diferença numérica, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($2(1) = 0,09, p = 0,766$). Tais achados são contrários a outros estudos recentes, que apontam para um benefício clínico estatisticamente significativo da psicoterapia antes, durante e depois da aplicação da cetamina, independente da forma de administração, não só na depressão resistente ao tratamento, mas em diversos distúrbios psiquiátricos (Drozd et al., 2022; Sakopoulos et al., 2025). Novos estudos também apontam para a possibilidade de uma melhor resposta clínica com o uso da cetamina em dose mais alta (1mg/kg) e aplicação única (Sakopoulos et al., 2024). Contudo, pesquisas que avaliam a resposta da PAC em diferentes doses e a resposta clínica em diferentes etapas do tratamento ainda é escassa. Para a análise da relação dos fatores de personalidade com a resposta clínica, realizado nos pacientes tratados apenas com Cetamina, foi encontrado um efeito apenas para o fator Abertura ($t = -4,401, p = 0,001, p$ ajustado $= 0,005, d = -2,541$), no qual pessoas que obtiveram resposta clínica ao tratamento pontuaram mais neste fator (Figura 3). Os demais fatores não apresentaram associação com a resposta clínica ao tratamento (p-valores $> 0,050$). Os resultados obtidos corroboram com os achados de pesquisas que utilizam outras modalidades de tratamento para Depressão Resistente, como a Deep-Brain-Stimulation (estimulação cerebral profunda), que também apontam para uma melhor resposta clínica em pacientes com maior traço de abertura (Ramasubbu et al., 2021). Além disso, a associação do traço de abertura com a resposta clínica está em concordância com uma recente meta-análise sobre a relação dos traços de personalidade com o resultado do tratamento de saúde mental no geral (Bucher et al., 2019), apesar de não ter sido observadas as associações positivas com os traços de amabilidade, extroversão e consciência e a associação negativa com o neuroticismo, presentes na meta-análise. Contudo, outros estudos apontam uma associação positiva entre o próprio traço de

abertura à experiência, além do traço de amabilidade, com a busca de cuidados relacionados à saúde mental, enquanto houve uma associação negativa com o traço de neuroticismo (Szücs et al., 2025), o que pode ter influenciado na amostra analisada. Também não foram avaliadas as relações entre a resposta clínica da utilização da cetamina e outras escalas de personalidade, como a Escala de Avaliação da Personalidade de Eysenck (EPQ) (Eysenck et al., 1985) e o Inventário de Temperamento e Caráter de Cloninger (TCI) (Cloninger et al., 1993), o qual já tem descritos associações entre seus fatores de evitação de danos, e a diminuição dos fatores de autodireção e cooperação com uma maior resposta clínica no tratamento da depressão resistente com medicamentos antidepressivos (Takahashi, 2013). Além disso, novos estudos podem investigar os fatores de personalidade também no grupo tratado com PAC, comparando com a resposta ao grupo tratado exclusivamente com cetamina. Por fim, o modelo para predição da resposta clínica por meio dos fatores de personalidade não foi significativo ($F(5, 17) = 1,607$, $p = 0,212$), com todos os fatores com estimativas não significativas (todos os p -valores $> 0,05$).

Conclusão

Dessa forma, o presente estudo buscou analisar a possível relação entre a resposta clínica gerada a partir da administração de cetamina subcutânea, e os fatores de personalidade individuais precedentes, em pacientes diagnosticados com Depressão Resistente ao Tratamento, a partir de um ensaio clínico aberto. Novos estudos nessa área podem ser realizados no âmbito de investigar a relação entre a administração, em diferentes doses e aplicações, de cetamina subcutânea e a mudança nos traços de personalidade dos pacientes ao longo do tratamento. Além disso, pesquisas futuras também podem explorar a relação da resposta clínica com outras escalas de avaliação da personalidade, como a EPQ e a TCI, e avaliando os fatores de personalidade também no grupo tratado com PAC.

Referências

Global Burden Disease. (2019). Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 354 Diseases and Injuries for 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet, 392*(10159), 1789-1858. Conway, C. R., George, M. S., & Sackeim, H. A. (2017). Ketamine: The First Effective Antidepressant in a Half Century. *Journal of Clinical Psychopharmacology, 37*(4), 301-307. Wajs, E., Aluisio, L., Holder, R., Daly, E. J., Lane, R., Lim, P., ... & Sanacora, G. (2020). Esketamine Nasal Spray for Rapid Reduction of Depressive Symptoms in Patients with Major Depressive Disorder Who Have Active Suicidal Ideation with Intent: Double-blind, Randomized Study (ASPIRE I). *The Journal of Clinical Psychiatry, 81*(3), 19m13191. Katalinic, N., Lai, R., Somogyi, A., Mitchell, P. B., & Glue, P. (2013). Ketamine as a New Treatment for Depression: A Review of Its Efficacy and Adverse Effects. *Aust N Z J Psychiatry, 47*(8), 710-727. Francez, C. G., Lobo, I., & Galvão, D. S. (2015). The Impact of Personality Traits on PTSD Treatment Outcomes. *Journal of Traumatic Stress Disorders & Treatment, 4*(2), 250-259. Silva, M. C., Lima, M. C., & Torres, P. L. (2013). The Role of Personality in Anxiety Disorders: A Study in Brazilian Patients. *Journal of Anxiety Disorders, 27*(5), 491-497. Pitanupong, J., Sathaporn, W., & Chotipanit, P. (2023). Personality Traits and Residual Symptoms of Depression After Treatment in Patients with Major Depressive Disorder: A Study in a Thai Hospital. *Asian Journal of Psychiatry, 79*, 103342. Bucher, M. A., Suzuki, T., & Samuel,

D. B. (2019). A meta-analytic review of personality traits and their associations with mental health treatment outcomes. *Clinical Psychology Review*, 70(1), 51–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cpr.2019.04.002> Drozd, S. J., Goel, A., McGarr, M. W., Katz, J., Ritvo, P., Mattina, G. F., Bhat, V., Diep, C., & Ladha, K. S. (2022). Ketamine Assisted Psychotherapy: A Systematic Narrative Review of the Literature. *Journal of Pain Research*, 15(15), 1691–1706. <https://doi.org/10.2147/JPR.S360733> Ramasubbu, R., McAusland, L., Chopra, S., Clark, D. L., Bewernick, B. H., & Kiss, Z. H. T. (2021). Personality changes with subcallosal cingulate deep brain stimulation in patients with treatment-resistant depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 46(4), E490–E499.
<https://doi.org/10.1503/jpn.210028> Sakopoulos, S., & Hinz, L. D. (2024). Long-Term Effects of Single and Repeated Ketamine Infusions on Treatment-Resistant Depression: A Retrospective Chart Review Study. *Psychoactives*, 3(4), 501–512.
<https://doi.org/10.3390/psychoactives3040031> Sakopoulos, S., & Todman, M. (2025). The Effects of Psychotherapy on Single and Repeated Ketamine Infusion(s) Therapy for Treatment-Resistant Depression: The Convergence of Molecular and Psychological Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(14), 6673–6673.
<https://doi.org/10.3390/ijms26146673> Szücs, A., Hui, R., Tang, W., Zhou, L., Lazarus, M., Maier, A. B., & Valderas, J. M. (2025). Personality and help-seeking for psychological distress: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2024.1405167> Takahashi, M., Shirayama, Y., Muneoka, K., Suzuki, M., Sato, K., & Hashimoto, K. (2013). Personality Traits as Risk Factors for Treatment-Resistant Depression. *PLoS ONE*, 8(5), e63756.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063756>

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

CÓDIGO: SB0222

AUTOR: LUIZA MACEDO DELGADO

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: ANÁLISE DA RELEVÂNCIA DA DISSOCIAÇÃO PARA A RESPOSTA CLÍNICA NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO RESISTENTE COM CETAMINA SUBCUTÂNEA

Resumo

A depressão resistente ao tratamento (DRT) é caracterizada pela ausência de resposta após dois antidepressivos adequados e traz grande impacto social e em saúde. A cetamina, em doses subanestésicas, é alternativa promissora pela rápida ação antidepressiva, mas pode induzir sintomas dissociativos agudos, cuja relação com os desfechos clínicos é incerta. Este estudo avaliou a associação entre efeitos dissociativos e resposta antidepressiva em pacientes com DRT submetidos a múltiplas doses de cetamina subcutânea associada à psicoterapia assistida por cetamina (PAC). Foram incluídos 24 pacientes do Hospital Universitário Onofre Lopes, submetidos a oito sessões semanais de cetamina subcutânea (0,5–1 mg/kg). Os sintomas depressivos foram avaliados pela Escala de Depressão de Montgomery-Åsberg (MADRS) e os dissociativos pela Clinician-Administered Dissociative States Scale (CADSS). As análises incluíram regressão linear simples e correlações de Pearson e Spearman ($p < 0,05$). Não houve associação significativa entre CADSS e MADRS ao longo do tratamento ($p = 0,664$). Apenas na primeira sessão observou-se correlação positiva moderada entre dissociação e depressão ($p = 0,469$; $p = 0,024$), não sustentada depois. Conclui-se que os efeitos dissociativos não foram preditores consistentes da resposta clínica. Limitações como pequeno tamanho amostral e possível inadequação da CADSS restringem interpretações. Futuras pesquisas devem incluir amostras maiores e instrumentos mais abrangentes.

Palavras-chave: Depressão resistente; Cetamina; Dissociação; Psicoterapia

TITLE: Analysis of the Relevance of Dissociation for Clinical Response in the Treatment of Treatment-Resistant Depression with Subcutaneous Ketamine

Abstract

Treatment-resistant depression (TRD) is defined by lack of response to at least two adequate antidepressants and is associated with significant social and health impacts. Subanesthetic ketamine is a promising alternative due to rapid antidepressant effects but can induce acute dissociative symptoms, whose relationship with clinical outcomes is unclear. This study evaluated the association between dissociative effects and antidepressant response in TRD patients undergoing multiple subcutaneous ketamine sessions combined with ketamine-assisted psychotherapy (KAP). Twenty-four patients at Hospital Universitário Onofre Lopes received eight weekly subcutaneous ketamine sessions (0.5–1 mg/kg). Depressive symptoms were assessed with the Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) and dissociative symptoms with the Clinician-Administered Dissociative States Scale (CADSS).

Analyses included simple linear regression and Pearson and Spearman correlations ($p < 0.05$). No significant association was found between CADSS and MADRS scores over treatment ($p = 0.664$). A moderate positive correlation between dissociation and depression was observed only in the first session ($p = 0.469$; $p = 0.024$) and was not sustained. Acute dissociative effects did not consistently predict clinical response. Limitations such as small sample size and possible CADSS inadequacy restrict interpretations. Future studies should include larger samples and more comprehensive assessment tools.

Keywords: Treatment-Resistant Depression; Ketamine; Dissociation; Psychotherapy

Introdução

3. INTRODUÇÃO

A depressão resistente ao tratamento (DRT) representa um desafio significativo para a psiquiatria contemporânea, sendo caracterizada pela ausência de resposta clínica satisfatória após o uso adequado de, no mínimo, dois antidepressivos de diferentes classes (Caldioli et al. 2021). Estima-se que cerca de 70% dos indivíduos diagnosticados com Transtorno Depressivo Maior (TDM) não alcançam a remissão completa dos sintomas com os tratamentos convencionais, o que contribui para elevados prejuízos sociais, ocupacionais e físicos, além de aumento na morbimortalidade e nos custos com cuidados médicos (Bahij et al. 2021; Goetz et al. 2010).

Nesse contexto, a cetamina — um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) — tem se destacado como uma alternativa promissora para o manejo da DRT. Em doses subanestésicas, tem demonstrado rápida ação antidepressiva, inclusive em casos refratários à eletroconvulsoterapia (Pagnin et al. 2008; Zarate et al. 2006; Murrough et al. 2013; Berman et al. 2000). Embora a maioria dos estudos clínicos utilize as vias intravenosa (IV) ou intranasal, a administração subcutânea (SC) da cetamina vem sendo investigada como estratégia viável, por ser de aplicação mais simples e alcançar níveis plasmáticos comparáveis à via IV (Gálvez et al. 2014; Loo et al. 2016; George et al. 2017; Glue et al. 2011; Chilukuri et al. 2014). Além disso, evidências apontam maior eficácia clínica com infusões repetidas em comparação a uma única dose (Coyle and Laws 2015).

Além da sua ação antidepressiva, a cetamina é conhecida por induzir efeitos psicoativos agudos, o que a classifica como um psicodélico não-clássico. Apesar de não agir sobre receptores de serotonina como agem os psicodélicos clássicos (dimetiltryptamina, ácido lisérgico dietilamida e psilocibina), a cetamina compartilha diversas similaridades com essas substâncias, especialmente a indução de estados alterados de consciência, fenômeno denominado dissociação (Dai et al. 2023). Podendo se manifestar com sensação de distanciamento da realidade, alterações na percepção corporal e do ambiente, além de distorções do tempo e da própria identidade, esses efeitos dissociativos são geralmente transitórios e surgem logo após a administração da substância (Ballard et al. 2020).

Tais propriedades psicomiméticas dos psicodélicos, clássicos e não-clássicos, vêm sendo motivo de crescente interesse em estudos recentes no campo da psiquiatria, especialmente no que diz respeito às suas implicações em desfechos terapêuticos (Ko et al. 2022). Nesse sentido, essas experiências subjetivas, historicamente interpretadas como efeitos adversos, atualmente são fundamento para questionamentos sobre sua possível eficácia antidepressiva (Breeksema et al. 2022).

Diante disso, torna-se relevante investigar a dissociação como possível mediadora da resposta clínica ao tratamento com cetamina. Considerando o potencial da via subcutânea como alternativa terapêutica prática e eficaz, o presente estudo tem como objetivo analisar a relação entre os efeitos dissociativos agudos e os desfechos clínicos em pacientes com DRT submetidos a múltiplas doses de cetamina subcutânea.

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 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 24 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).

4.2 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 ou outras cardiopatias, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), obesidade grave, hipertensão intracraniana, gravidez, hipertireoidismo, histórico de efeitos adversos graves com cetamina, sintomas psicóticos, transtorno de identidade dissociativo, transtorno do espectro autista ou sinais prodrômicos de esquizofrenia. Pacientes que não preencheram os critérios ou optaram por não participar foram encaminhados ao tratamento padrão.

4.3 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. Em seguida, foi aplicado o instrumento de avaliação de gravidade dos sintomas depressivos, a Escala de Depressão de Montgomery-Åsberg (MADRS), além da coleta de dados demográficos.

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. A MADRS foi reaplicada semanalmente, antes de cada administração da cetamina, e uma vez adicional na nona semana (uma semana após a última sessão). Os sintomas dissociativos foram avaliados semanalmente com a Escala de Estado Dissociativo Administrada pelo Clínico (CADSS), aplicada antes da infusão e 40 minutos após, ainda sob o efeito da substância.

Além dessas etapas, os participantes passaram também pelas três fases da psicoterapia assistida: Preparação, Experiência e Integração. 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 no dia seguinte, 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.

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.

4.4 Análise de resultados

Para investigar a possível associação entre os sintomas dissociativos agudos e os sintomas depressivos ao longo do tratamento, foi conduzida uma regressão linear simples, utilizando como variável preditora a pontuação total da CADSS (Clinician-Administered Dissociative States Scale) e como variável dependente a pontuação total da MADRS (Montgomery–Åsberg Depression Rating Scale).

Uma análise de regressão linear simples com reamostragem por bootstrap (1000 iterações) foi realizada para estimar a robustez dos coeficientes. Também foi calculada a correlação de Pearson. Além disso, uma análise de correlação de Spearman foi conduzida de forma pareada entre os itens semanais da MADRS e da CADSS (ex: MADRS e CADSS após 1ª dose, MADRS e CADSS após a 2ª dose e assim por diante). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. A análise foi conduzida no SPSS software 28.0.

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS

5.1 Análise de associação entre dissociação e sintomas depressivos

Não foi encontrado resultado significativo de associação entre os escores de dissociação (CADSS total) e os sintomas depressivos (MADRS total). O modelo não foi estatisticamente significativo ($\beta=0,032$; $t=0,435$; $p=0,664$). A análise de reamostragem do tipo bootstrap corroborou a ausência de efeito significativo da variável preditora ($B = 0,061$; $SE = 0,052$; $p = 0,243$).

A correlação de Pearson revelou uma associação positiva fraca entre os escores totais de CADSS e MADRS ($r = 0,102$; $p = 0,079$), sugerindo tendência à correlação, embora sem significância estatística. Esses resultados indicam que os níveis de dissociação subjetiva, conforme mensurados pela CADSS, não se associaram de forma significativa aos sintomas depressivos autorrelatados (MADRS).

5.2 Análise pareada item a item

Entre os oito pares analisados, apenas o par MADRS e CADSS após a 1ª dose apresentou correlação estatisticamente significativa, com $\rho = 0,469$, $p = 0,024$, e $IC95\% = [0,057; 0,744]$. Esse resultado sugere uma correlação positiva moderada entre a dissociação e os sintomas depressivos na primeira semana de tratamento, ou seja, que escores mais elevados de dissociação estavam associados a escores mais elevados de depressão nesse momento.

Em contraste, os demais pares não apresentaram correlações significativas, com coeficientes de Spearman variando entre $-0,121$ e $0,256$, e valores de p superiores ao nível de significância adotado ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo não evidenciaram associação entre os escores de dissociação, avaliados pela CADSS, e os escores de sintomas depressivos, mensurados pela MADRS, ao longo das oito semanas de tratamento com cetamina subcutânea em pacientes com depressão resistente ao tratamento (DRT). Esses dados sugerem que a dissociação subjetiva aguda, embora frequente durante as sessões, não atuou como preditora direta da resposta clínica antidepressiva. Entretanto, é importante destacar que a amostra reduzida pode ter limitado o poder estatístico da análise, de modo que a questão permanece inconclusiva.

Em consonância com o resultado obtido, uma meta-análise recente avaliou a relação entre os efeitos psicoativos da cetamina e os desfechos clínicos na depressão, sem encontrar correlação significativa, tanto no conjunto geral de transtornos mentais quanto nos casos exclusivamente de depressão (Tavares et al. 2025). Essas evidências corroboram a interpretação de que estados alterados de consciência, como a dissociação, podem não ser essenciais para os benefícios antidepressivos.

Por outro lado, uma revisão sistemática publicada em 2024 examinou 29 estudos que relacionavam os estados alterados induzidos pela cetamina com desfechos terapêuticos e encontrou resultados mistos: 52% relataram associação positiva, 45% nenhuma associação e 3% uma relação negativa (Gonçalves et al. 2024). Para sessões subcutâneas, especificamente, as evidências de vínculo com resposta clínica foram nulas — alinhando-se ao presente estudo que utiliza essa via de administração.

Outro ponto que merece atenção é a escolha do instrumento de avaliação. Embora a CADSS seja a escala mais utilizada em pesquisas sobre cetamina, sua validade para captar nuances da experiência dissociativa no contexto terapêutico é limitada (Gonçalves et al. 2024). A CADSS foi originalmente desenvolvida para avaliar estados dissociativos relacionados ao transtorno de estresse pós-traumático, e pode não ser suficientemente sensível para caracterizar os efeitos específicos induzidos pela cetamina (Bremner et al. 1998). Nesse sentido, o papel de tal escala é questionável, visto que pode impor restrições na exploração da complexidade das mudanças de consciência induzidas por psicodélicos. Assim, surgem inovações metodológicas em estudos que utilizam instrumentos como as escalas de estados

alterados de consciência em 11 ou 5 dimensões (11D-ASC; 5D-ASC) ou a Hood's Mysticism Scale (HMS), que abordam aspectos mais sutis da experiência, como unidade, espiritualidade e insight, permitindo correlações mais diretas com os desfechos terapêuticos (Tavares et al. 2025).

Logo, apesar da ausência de associação significativa entre dissociação aguda e resposta antidepressiva no presente estudo, os resultados evidenciam a necessidade de aprofundar a compreensão dos mecanismos da cetamina. A literatura apresenta achados inconsistentes, possivelmente devido a diferenças na via de administração, dosagem e contexto psicoterapêutico, sugerindo que a relação entre dissociação e resposta clínica pode ser mais complexa do que uma simples correlação direta. Ademais, limitações metodológicas, como amostra reduzida e possíveis restrições da CADSS, impedem conclusões definitivas. Por fim, pesquisas futuras com amostras maiores, escalas mais abrangentes (5D-ASC ou 11D-ASC) e métodos que considerem a interação entre neurobiologia, experiência psicodélica e integração psicoterapêutica podem orientar protocolos mais personalizados e eficazes para a DRT.

Conclusão

7. CONCLUSÕES

O presente estudo buscou analisar a relação entre os efeitos dissociativos agudos induzidos pela cetamina e a resposta clínica antidepressiva em pacientes com depressão resistente ao tratamento, submetidos a oito sessões de cetamina subcutânea. Os achados demonstraram que, embora os sintomas dissociativos estivessem presentes em diversos momentos do tratamento, não se observaram associações estatisticamente significativas entre os escores da CADSS e da MADRS, sugerindo que a dissociação não foi um preditor direto da melhora clínica observada. Isso reforça a ideia de que os efeitos psicoativos da cetamina, especialmente a dissociação, não são componentes indispensáveis para sua eficácia antidepressiva.

As principais fragilidades deste estudo incluem o pequeno tamanho da amostra e a possível inadequação da escala CADSS para analisar a experiência psicodélica no contexto terapêutico. Diante disso, a ausência de uma correlação robusta não permite uma conclusão definitiva sobre o papel da dissociação.

Dessa forma, pesquisas futuras com amostras maiores e o uso de instrumentos de avaliação mais abrangentes, como as escalas 5D-ASC ou 11D-ASC, são cruciais para aprofundar a compreensão sobre os mecanismos da cetamina e otimizar os protocolos de tratamento para a DRT.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Dai R, Larkin TE, Huang Z, Tarnal V, Picton P, Vlisides PE, Janke E, McKinney A, Hudetz AG, Harris RE, Mashour GA. (2023) Classical and non-classical psychedelic drugs induce common network changes in human cortex. **Neuroimage*, 273*, 120097.

Ko K, Knight G, Rucker JJ, Cleare AJ. (2022) Psychedelics, Mystical Experience, and Therapeutic Efficacy: A Systematic Review. *Front Psychiatry* 13:917199.

Ballard, E. D., & Zarate Jr, C. A. (2020). The role of dissociation in ketamine's antidepressant effects. *Nature Communications*, 11*, 6431.

da Costa Gonçalves, K.T., de Tavares, V.D.O., de Moraes Barros, M.L. et al. (2025). Ketamine-induced altered states of consciousness: a systematic review of implications for therapeutic outcomes in psychiatric practices. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 275*, 1271–1299

Tavares VDO, da Costa Gonçalves KT, de Moraes Barros ML, de Brito AJC, Cavalcanti-Ribeiro P, Palhano-Fontes F, Falchi-Carvalho M, Nunes EA, Sarris J, Perkins D, Fernandes-Osterhold G, de Araujo DB, Galvão-Coelho NL. (2025) Ketamine's Altered States Meta-Analysis: The Relationship Between Psychomimetic and Clinical Effects With Focus in Depression. *J Clin Psychopharmacol*, 45*(2):127-139.

Bahij, R., Norrholm, S. D., Touma, T. A., Boska, M. D., Southwick, S. M., & Neumeister, A. (2021). Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. *Journal of Affective Disorders*, 284*, 88-98.

Bremner, J. D., Krystal, J. H., Putnam, F. W., Southwick, S. M., Marmar, C., Charney, D. S., & Mazure, C. M. (1998). Measurement of dissociative states with the Clinician-Administered Dissociative States Scale (CADSS). *Journal of Traumatic Stress*, 11*(1), 125–136

Caldirolì, A., Schiavone, S., & Serretti, A. (2021). Treatment-resistant Depression: No Longer so Resistant. *Frontiers in Psychiatry*, 12*, 638610. doi:10.3389/fpsy.2021.638610.

Goetzel, R. Z., Pei, X., Tabrizi, M. J., Henke, R. M., Kowlessar, N., Nelson, C. F., & Metz, R. D. (2010). Ten Modifiable Health Risk Factors Are Linked to More than One-Fifth of Employer-Employee Health Care Spending. *Health Affairs*, 31*(11), 2474-2484. doi:10.1377/hlthaff.2010.0870.

Zarate, C. A. Jr., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S., & Manji, H. K. (2006). A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. *Archives of General Psychiatry*, 63*(8), 856-864.

Murrough, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Al Jurdi, R. K., Green, C. E., Perez, A. M., Iqbal, S., Pillemer, S., Foulkes, A., Shah, A., Charney, D. S., & Mathew, S. J. (2013). Antidepressant Efficacy of Ketamine in Treatment-Resistant Major Depression: A Two-site Randomized Controlled Trial. *American Journal of Psychiatry*, 170*(10), 1134-1142.

Pagnin, D., de Queiroz, V., Pini, S., & Cassano, G. B. (2008). Efficacy of ECT in Depression: A Meta-analytic Review. *Focus*, 6*(2), 155-162.

Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (2000). Antidepressant Effects of Ketamine in Depressed Patients. *Biological Psychiatry*, 47*(4), 351-354.

Coyle, C. M., & Laws, K. R. (2015). The Use of Ketamine as an Antidepressant: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 30*(3), 152-163.

Lucchese, R., Sousa, S. S., Veiga, G., Bueno, P. V., & Gonçalves, L. (2021). Efficacy of Subcutaneous Ketamine in Treatment-Resistant Depression: A Retrospective Analysis. **Journal of Clinical Psychiatry*, 82*(4), 36789.

Lopes, R. T., Souza, P. M., & Moreira, R. M. (2024). Subcutaneous Ketamine for Treatment-Resistant Depression: A Review of Recent Studies. **Journal of Affective Disorders*, 312*, 198-207.

Van Den Berg, D. P. G., de Jong, J. T. V. M., de Vries, M. G., Cono, S. J. G., & Snetselaar, H. A. (2022). Psychedelics as Therapeutics: A Re-Emerging Paradigm for Mental Health. **Journal of Psychopharmacology*, 36*(3), 235-247.

Breeksema, J. J., Niemeijer, A. R., Krediet, E., Vermetten, E., & Schoevers, R. A. (2022). Psychedelic-Assisted Psychotherapy: A Qualitative Study on Patients' Experiences with Ketamine. **Journal of Psychopharmacology*, 36*(1), 87-97.

CÓDIGO: SB0229

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 neoplásicas e não neoplásicas

Resumo

Epigenética é uma área emergente da ciência que consegue mostrar como as influências ambientais afetam a expressão dos genes sem alterar a sequência do DNA. Existem vários mecanismos epigenéticos, sendo a metilação a primeira descoberta e consiste na adição covalente de um grupo metil no carbono 5 da citosina. O reteno (RET) é conhecido como um marcador da combustão de biomassa contendo celulose e é o hidrocarboneto policíclico aromático predominante em amostras de partículas em suspensão no ar obtidas de incêndios florestais na região amazônica. Porém, não há estudos mostrando os efeitos do RET na metilação global. Diante dessa lacuna, este trabalho analisou o impacto do RET na metilação global de duas linhagens celulares pulmonares (A549 e BEAS-2B) expostas a 10, 30 e 60 ng/mL em 24h e 72h. A extração de DNA foi realizada utilizando o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit e para a metilação, o 5-mC DNA ELISA Kit, que utiliza um anticorpo monoclonal anti-5-metilcitosina. Nos tempos de 24h, foi visto que o RET reduz acentuadamente a metilação global em todas as doses em A549, e em BEAS-2B houve uma tendência à resposta dose-dependente. Em 72h, houve uma redução ainda mais forte em ambas as linhagens, o que indica persistência do efeito hipometilante ao longo do tempo. Podemos concluir que RET promove hipometilação global significativa em ambas as linhagens celulares sugerindo um potencial epigenotóxico com possíveis implicações para carcinogênese ou disfunções celulares.

Palavras-chave: Epigenética; Metilação; Reteno

TITLE: Reten-induced epigenetic modulation: Evaluation of the global methylation profile in neoplastic and non-neoplastic lung cells

Abstract

Epigenetics is an emerging area of science that can show how environmental influences affect gene expression without changing the DNA sequence. There are several epigenetic mechanisms, methylation being the first discovery and consists of the covalent addition of a methyl group in the carbon 5 of cytosine. Retene (RET) is known as a marker of biomass combustion containing cellulose and is the predominant polycyclic aromatic hydrocarbon in samples of air-suspending particles obtained from forest fires in the Amazon region. However, there are no studies showing the effects of RET on global methylation. Given this

gap, this study analyzed the impact of RET on the global methylation of two pulmonary cell lines (A549 and BEAS-2B) exposed to 10, 30 and 60 ng/mL in 24h and 72h. DNA extraction was performed using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit and for methylation, the 5-mC DNA ELISA Kit, which uses an anti-5-methylcytosine monoclonal antibody. In 24h times, it was seen that RET markedly reduces global methylation at all doses in A549, and in BEAS-2B there was a tendency to dose-dependent response. In 72 hours, there was an even stronger reduction in both strains, which indicates persistence of the hypomethylating effect over time. We can conclude that RET promotes significant global hypomethylation in both cell lines suggesting an epigenotoxic potential with possible implications for carcinogenesis or cellular dysfunctions.

Keywords: Epigenetics; Methylation; Retene

Introdução

Epigenética é uma área emergente de pesquisa científica que mostra como as influências ambientais afetam a expressão dos genes, podendo ser herdada e que não altera a sequência do DNA. A informação genômica de uma célula é bastante estável, enquanto o epigenoma é altamente dinâmico ao longo da vida, sendo governado por uma complexa rede de interação de fatores genéticos e ambientais (Verhoeven et al. 2016, p. 1-3). A epigenética pode explicar como dois genótipos idênticos podem dar origem a fenótipos diferentes. Existem vários mecanismos epigenéticos: Metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas, remodelação da cromatina ou RNAs não codificantes (Bannister & Kouzarides 2011, Holoch & Moazed 2015, Längst & Manelyte 2015, Allis & Jenuwein 2016, Feinberg et al. 2016), sendo a metilação o mais estudado entre eles.

A metilação do DNA foi a primeira modificação epigenética descoberta (Hotchkiss 1948, Holliday & Pugh 1975, Riggs 1975) e consiste na adição covalente de um grupo metil no carbono 5 da base nitrogenada citosina (5mC). Desse modo, a metilação aberrante do DNA é uma característica comum nas doenças humanas, tanto nas doenças não cancerosas como no câncer (Fernandez et al. 2012). Já foi descrito em inúmeros trabalhos da literatura que o epigenoma de uma célula cancerosa e sadia apresentam padrões diferentes de metilação, levando em consideração que tanto a hipometilação quanto a hipermetilação global são características constantes do genoma da célula cancerosa.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são uma classe de compostos com dois ou mais anéis aromáticos fundidos em sua estrutura (Bostrom et al., 2002; Nisbet e LaGoy, 1992). Estes são formados principalmente durante a combustão incompleta natural e antropogênica de combustíveis, como a madeira e, embora existam inúmeras fontes potenciais de HPAs na atmosfera, as atividades humanas são as mais significativas. Mais de 100 HPAs foram identificados, sendo 16 deles classificados como contaminantes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) devido à sua toxicidade (Hagy et al., 2008). Embora os HPAs sejam formados pela combustão incompleta de materiais orgânicos, como tabaco, combustíveis fósseis, madeira, produtos petrolíferos e até mesmo pela preparação de alimentos, eles são poluentes generalizados e elementos importantes da poluição do ar (Kim et al., 2013d). Os HPAs atmosféricos são motivo de grande preocupação em todos os compartimentos ambientais devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Alves et al., 2017; de Oliveira Galvão et al., 2017, 2014; Dreij et al., 2017; IARC, 2010; Mishra et al., 2016), classificados no grupo 1 de potencial carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).

O reteno (1-metil-7-isopropil fenantreno; RET) é um produto da combustão da madeira (Ramdahl, 1983), e também pode ser encontrado em uma variedade de fontes de petróleo (Huang et al., 2017). Além disso, o RET é certamente conhecido como um marcador de queima de biomassa (Al-Naiema et al., 2015; Engling et al., 2014) e é o HPA predominante identificado em amostras de partículas em suspensão no ar (PM) obtidas de incêndios florestais na região amazônica brasileira (de Oliveira Alves et al., 2011, 2014, 2015). Porém, poucos estudos mostraram os efeitos de HPAs presentes em material particulado na metilação global em organismos ou linhagens celulares e nenhum estudo com o reteno, nesta área, foi realizado.

Metodologia

As células de adenocarcinoma de pulmão humano A549 foram cultivadas em placas de 6 poços, a $1,5 \times 10^5$, 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 , usando o meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) contendo vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos (0,1 mg/mL de penicilina). Já as células de epitélio brônquico sadio, imortalizadas por vírus, BEAS-2B foram cultivadas sob as mesmas condições, porém utilizando o meio LCH-9 e 3×10^5 por poço.

Para a extração de DNA, foi utilizado o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit após a exposição contínua das células em 24h e 72h a 10ng/mL, 30ng/mL e 60ng/mL, concentrações de reteno diluídas em meio de cultivo a 0,1% do solvente DMSO. Para o ensaio da metilação global, foi utilizado o kit 5-mC DNA ELISA Kit da ZymoResearch. O kit 5-mC DNA ELISA é uma ferramenta prática e poderosa que permite quantificar com precisão a 5-mC em qualquer amostra de DNA em menos de 3 horas. O kit inclui um anticorpo monoclonal anti-5-metilcitosina que é simultaneamente sensível e específico para 5-mC. O protocolo do kit foi seguido rigorosamente para a realização do ensaio de ELISA indireto.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism®, versão 7.0, pela análise de variância ANOVA OneWay. As diferenças significativas foram consideradas em um nível de confiança 95% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

Observa-se que o controle positivo (PC) apresentou valores próximos a 100% de metilação global, confirmando a eficiência do método ELISA em detectar DNA totalmente metilado. Por outro lado, o controle negativo (NC), constituído por DNA totalmente desmetilado, apresentou valores próximos a 0%, funcionando como referência basal para ausência de metilação.

No tempo de 24h de exposição, observou-se que o reteno reduziu acentuadamente a metilação global do DNA em todas as concentrações testadas (10, 30 e 60 ng/mL) na linhagem neoplásica A549 ($p < 0,0001$), variando de aproximadamente 8% a 12% de queda no parâmetro analisado. Os valores observados situam-se muito próximos ao NC, indicando que mesmo a menor dose foi suficiente para promover intensa hipometilação. Na linhagem Beas-2B, também no tempo de 24h de exposição, verificou-se uma tendência à resposta dose-dependente, ou seja, as maiores concentrações de reteno resultaram em menores níveis de

metilação, pois os valores de metilação global variaram de aproximadamente 35% na menor concentração (10 ng/mL) até cerca de 20% na maior (60 ng/mL), mas também indicando hipometilação do genoma analisado ($p < 0,0001$).

Após 72h de exposição contínua das duas linhagens, a redução da metilação global mostrou-se ainda mais pronunciada em ambas as linhagens celulares, evidenciando um efeito hipometilante persistente ao longo do tempo. Em A549, os níveis de metilação permaneceram baixos (aproximadamente 3% a 6%), evidenciando que não apresenta recuperação significativa ao longo do tempo da metilação basal, independentemente da dose utilizada. Já em Beas-2B houve redução ainda mais pronunciada, com valores próximos de 15% na menor dose e cerca de 5% na maior, aproximando-se dos níveis observados nas linhagem A549 no mesmo tempo experimental. Esse comportamento indica um efeito tempo-dose-dependente, com impacto cumulativo da exposição prolongada.

Conclusão

Os resultados indicam que o reteno promove hipometilação global significativa do DNA tanto em células cancerígenas como não cancerígenas, sendo esse efeito mais intenso na linhagem A549, possivelmente em razão de maior vulnerabilidade epigenética intrínseca pelo fato de ser uma linhagem neoplásica. Na linhagem Beas-2B, embora o efeito seja evidente, apresenta-se de forma mais modulada e dependente da dose e do tempo de exposição. Esses achados sugerem que o reteno possui potencial como agente epigenotóxico, com implicações relevantes para processos de carcinogênese e disfunções celulares relacionados a desregulação epigenética em células normais.

Referências

AL-NAIEMA, Ibrahim et al. Impacts of co-firing biomass on emissions of particulate matter to the atmosphere. *Fuel*, v. 162, p. 111-120, 2015.

BOSTRÖM, Carl-Elis et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental health perspectives*, v. 110, n. suppl 3, p. 451-488, 2002.

DE OLIVEIRA ALVES, Nilmara et al. Biomass burning in the Amazon region: Aerosol source apportionment and associated health risk assessment. *Atmospheric Environment*, v. 120, p. 277-285, 2015.

ENGLING, G. et al. Assessing the regional impact of indonesian biomass burning emissions based on organic molecular tracers and chemical mass balance modeling. *Atmospheric Chemistry and Physics*, v. 14, n. 15, p. 8043-8054, 2014.

FAN, Zhan-Lan et al. Relationships between outdoor and personal exposure of carbonaceous species and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fine particulate matter (PM_{2.5}) at Hong Kong. *Aerosol and Air Quality Research*, v. 17, n. 3, p. 666-679, 2017.

MALLAH, Manthar Ali et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. *Chemosphere*, v. 296, p. 133948, 2022.

KETTUNEN, Johannes et al. Genome-wide study for circulating metabolites identifies 62 loci and reveals novel systemic effects of LPA. *Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 11122, 2016.

PEIXOTO, Milena Simões et al. Oxidative stress, mutagenic effects, and cell death induced by retene. *Chemosphere*, v. 231, p. 518-527, 2019.

WEISSBACH, Arthur. A chronicle of DNA methylation (1948–1975). *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, p. 1-10, 1993.

ZAFON, Carles et al. DNA methylation in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*, v. 26, n. 7, p. R415-R439, 2019.

HERNANDES, Livia Cristina et al. Caffeic acid and chlorogenic acid cytotoxicity, genotoxicity and impact on global DNA methylation in human leukemic cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, v. 43, n. 3, p. e20190347, 2020.

BOSTRÖM, Carl-Elis et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental health perspectives*, v. 110, n. suppl 3, p. 451-488, 2002.

Anexos

Figura 1: Gráficos dos níveis de metilação global das duas linhagens celulares (A549 e Beas-2B) nos tempos de 24h de exposição (azul) e 72h (laranja) de exposição a concentrações de 10, 30 e 60 ng/mL de retene. Controle positivo (branco) e controle negati

CÓDIGO: SB0231

AUTOR: BARBARA ALVES MEDEIROS

ORIENTADOR: RENATA SWANY SOARES DO NASCIMENTO

TÍTULO: Perfil epidemiológico de cardiopatias congênitas no RN

Resumo

Introdução e justificativa: Distúrbios congênitos são responsáveis por grande parte das causas de morte neonatal no Brasil e no mundo. Entre esses distúrbios, os mais prevalentes são as Cardiopatias congênitas responsáveis pela maior quantidade de morbimortalidade entre as anomalias congênitas. Objetivo: Avaliar o perfil epidemiológico desses distúrbios na população do Rio Grande do Norte incluindo informações sobre os fetos, as mães e o município de residência deles. Métodos: O estudo se baseia nas informações do banco de dados DATASUS focando na ocorrência de CC nos neonatais dessa população, bem como suas mães, no período de 2013-2023, e posterior cálculos de incidência. Resultados: No estado do RN foi observado uma incidência de 0,3 :1000 habitantes, com maior ocorrência de CC em crianças nascidas no ano de 2020. Natal possui a maior quantidade de nascimentos com CC mas a maior incidência ocorreu em Olho d'água do Borges (2,53:1000 habitantes), a CC mais frequentemente encontrada foi a CIV, seguida pela Tetralogia de Fallot. O perfil materno revelou que entre as mulheres que possuem filhos com CC são autodeclaradas pardas, com idade entre 20 e 34 anos, com tempo de gestação normal e a maioria realizou mais de 7 consultas pré-natal durante a gravidez. Conclusão: A quantidade de nascidos com CC variou ao longo dos anos, foi evidenciado um grande desafio com relação à coleta de dados no DATASUS que deixou várias lacunas em relação principalmente ao perfil materno.

Palavras-chave: Cardiopatias congênitas, distúrbios congênitos, incidência, DATASUS.

TITLE: Epidemiological profile of congenital heart disease in Rio Grande do Norte

Abstract

Introduction: Congenital disorders are a major cause of neonatal mortality worldwide. Among them, congenital heart defects (CHDs) are the most prevalent, with the highest morbidity and mortality among congenital anomalies. Objective: To assess the epidemiological profile of CHDs in Rio Grande do Norte, Brazil, considering newborn, maternal, and municipality-related data. Methods: Cross-sectional study using DATASUS data on CHD cases in newborns and their mothers from 2013 to 2023, with incidence calculations. Results: The incidence in the state was 0.3 per 1,000 inhabitants, peaking in 2020. Natal recorded the highest number of cases, while Olho d'Água do Borges had the highest incidence (2.53/1,000). Ventricular septal defect was the most frequent CHD, followed by Tetralogy of Fallot. Most mothers self-identified as mixed-race (parda), were aged 20–34 years, had normal gestation, and attended more than seven prenatal visits. Conclusion: CHD occurrence varied over time. Data collection limitations in DATASUS created gaps, especially regarding maternal profile, highlighting the need for improved surveillance.

Keywords: Congenital heart disease, congenital disorders, incidence, DATASUS

Introdução

Os distúrbios congênitos são anormalidades estruturais e funcionais dos sistemas do corpo, os quais, geralmente, afetam a vida dos pacientes que as apresentam. Entre eles, as mais prevalentes são as Cardiopatias Congênitas (CC), responsáveis por 40% dos defeitos congênitos (1), que além de serem as mais presentes na população possuem um alto risco de morbidade e mortalidade após o nascimento já que, enquanto feto, a presença da circulação materna mantém as consequências dos efeitos mais toleráveis (2) porém após o nascimento já foi observado que há maus prognósticos de mortalidade e morbidade desses fetos (5) exemplificando, em 2007, as CCs foram responsáveis por 6% das mortes infantis no Brasil (4). Esses distúrbios podem ter diversas causas, desde mutações cromossômicas até agentes teratogênicos. Apesar disso, a origem desses defeitos congênitos do coração são desconhecidos, sendo, em geral, classificadas como causas multifatoriais (2). Somado às anomalias isoladas também observa-se CCs associadas à síndromes cromossômicas como a síndrome de Down e de Turner (8). Apesar de não está bem estabelecido quando e como ocorre a aparição dessas malformações há uma forte correção de fatores que advém da mãe como o uso de drogas, diabetes gestacional quando ocorrem nos primeiros 2 meses de gestação, momento esse em que está ocorrendo a formação no coração, tem um aumento exponencial no surgimento de malformações. (9) Outro viés importante para a determinação de CC no país é a realidade socioeconômica, um estudo no Maranhão afirmou que 75,79% das crianças cardiopatas viviam em condições socioeconômicas precárias (5) isso também é observado na Colômbia, foram avaliadas 140 famílias com crianças que possuíam CC cerca de 82,8% delas tinham níveis socioeconômicos baixos (9). Embora muito prevalente na população geral, essas anomalias são muitas vezes silenciosas por não serem vistas facilmente no exame físico, sendo necessário a intervenção de exames específicos como o ecocardiograma, eletrocardiograma e radiografia do tórax, exames esses que são realizados apenas em caso de suspeita pelo cardiologista pediátrico, nesses casos, as crianças já apresentam cianose, dispneia e outros sinais e sintomas (6). Essa realidade contribui ainda mais para a dificuldade de diagnóstico e impulsiona os números crescentes de neonatos que vêm a falecer antes do primeiro ano de vida (5). O Rio Grande do Norte é um estado localizado no Nordeste brasileiro com 167 município, possui quatro mesorregiões, sendo elas: Oeste potiguar, central potiguar, agreste potiguar e leste potiguar, com uma área territorial de aproximadamente 52.809 km² ocupando cerca de 0,62% do território nacional. Possui uma população de 3.302.729 habitantes com sua capital Natal abrigando cerca de 751 mil pessoas. Em comparação com outros estados o RN se destaca pelo seu alto IDH, o mais alto da região Nordeste o qual reflete diretamente nas melhores condições socioeconômicas em relação à outros estados nordestinos (24). Com base em tudo que foi ilustrado até agora, este artigo tem como objetivo conhecer o perfil epidemiológico desses defeitos na região do Rio Grande do Norte e, posteriormente, descrevê-las, analisando assim quais municípios são mais afetados por CC, quais são os principais defeitos congênitos do coração, qual o perfil das gestantes associados a esses fetos e posteriormente ser feita uma análise que possa correlacionar a localidade com possíveis fatores relacionados com o desenvolvimento dessas cardiopatias congênitas, assim verificando a importância da vigilância, acompanhamento e diagnóstico precoce das famílias afetadas por essas anomalias.

Metodologia

O objetivo geral deste estudo é conhecer o perfil epidemiológico de cardiopatias congênitas no RN no período de 2013 - 2023.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a incidência das cardiopatias congênitas em neonatos
- Caracterizar a distribuição temporal e espacial das cardiopatias congênitas no RN.
- Identificar as cardiopatias congênitas mais frequentes no RN.
- Identificar fatores de riscos maternos e fetais para as cardiopatias congênitas.

Materiais e métodos

Esse é um estudo epidemiológico descritivo quantitativo realizado a partir da coleta de informações no banco de dados público DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde Pública) com enfoque na população de neonatos nascidos no Rio Grande do Norte, no período de 2013 a 2023 que possuem cardiopatias congênitas. Para a análise de fatores de risco serão coletados os seguintes dados: Identificação do recém nascido (Municípios, ano de nascimento) Tipo de CC, segundo o CID. Identificação do perfil materno (Idade materna, Quantidade de consultas pré-natal, idade gestacional e raça). E a análise dos dados será realizada da seguinte forma: Cálculo de incidência absoluta a partir da proporção entre o número de recém-nascidos com CC e o número de recém nascidos do período. Cálculo de incidência temporal foi realizada por ano de nascimento (número de nascidos totais por ano sobre o número de nascidos com CC naquele mesmo ano). Cálculo de incidência geográfica a partir do número absoluto de neonatos nascidos no município sobre os que nasceram com CC dessas cidades. Todas as incidências consideradas à cada 1.000 habitantes. Serão coletados os dados acerca da quantidade de nativos por município, ano de nascimento e o tipo de cardiopatia congênita segundo o CID (Classificação internacional de doenças). A seleção dessas CCs não tiveram fatores de exclusão, porém nem todas foram detectadas, entre as que aparecem na pesquisa algumas não são específicas quando se trata na identificação da anomalia (Ex: “Outras malformações congênitas das câmaras e comunicações cardíacas”, “Outras malformações congênitas específicas do coração”), dessa forma separamos e organizamos de acordo com as regiões anatômicas dos vasos e coração para facilitar a visualização e entendimento.

Septos cardíacos

Q210 - Comunicação interventricular

Q211 - Comunicação interatrial

Q212 - Comunicação atrioventricular

Q218 - Outras malformações congênitas dos septos cardíacos

Q219 - Malformação congênita não especificada do septo cardíaco

Câmaras cardíacas

Q208 - Outras malformações congênitas das câmaras e comunicações cardíacas

Q244 - Síndrome do coração esquerdo hipoplásico

Q209 - Malformação congênita não especificada das câmaras e comunicações cardíacas

Válvulas cardíacas

Q220 - Atresia da valva pulmonar

Q221 - Estenose congênita da valva pulmonar

Q225 - Anomalia de Ebstein

Q226 - Malformação congênita não especificada da valva tricúspide

Grandes vasos (aorta, artéria pulmonar, tronco comum)

Q200 - Tronco arterial comum

Q251 - Coartação da aorta

Q254 - Outras malformações congênitas da aorta

Q256 - Estenose da artéria pulmonar

Q259 - Malformação congênita não especificada das grandes artérias

Alterações de posicionamento e conexão

Q205 - Comunicação ventrículo-atrial discordante

Q206 - Isomerismo dos apêndices atriais

Q207 - Dextrocardia

Complexas

Q213 - Tetralogia de Fallot

Não especificadas

Q248 - Outras malformações congênitas específicas do coração

Q249 - Malformação não especificada do coração

Os municípios selecionados para a análise foram os de residência da mãe e tiveram como único fator de exclusão apenas possuir o número de crianças com cardiopatias congênitas diferente de zero, ou seja, o município deve apresentar pelo menos uma aparição de CC

Resultados e Discussões

Resultados

4.1 Incidência no RN

No período de 2013 à 2023 nasceram 494.172 crianças no RN. Entre essas, 139 (0,038%) apresentaram cardiopatias congênitas resultando em incidência de aproximadamente 0,3:1000 habitantes.

4.2 Distribuição temporal da incidência de crianças nascidas com cardiopatias congênitas

Considerando o nascimento ao longo desses anos, verifica-se uma distribuição linear no número absoluto de nascimentos de crianças entre os anos de 2013-2023. (Figura 1)

A ocorrência de crianças nascidas com CC ao longo desses anos, mostrou-se irregular, com valor mais baixo em 2014 (n=4) e mais elevado em 2020 (n=21). (figura 2)

Depois do cálculo de Incidência temporal foi observado que em 2022 houve a maior incidência 0,4995:1000 nascimentos daquele ano. Já a menor incidência ocorreu em 2014 com 0,08314:1000 nascimentos naquele ano. Esses dados podem ser observados na figura 3.

4.3 Distribuição geográfica da incidência de crianças nascidas no RN com cardiopatias congênitas

Dentre os 167 municípios do RN, observou-se que apenas 21% (n=36) apresentaram pelo menos 1 caso de CC registrado.

Dos municípios que possuem registro de neonatos com CC foram avaliados os que possuem o maior número absoluto de casos registrados. Devido ao seu maior número populacional e consequentemente maior número de crianças nascidas também, Natal possui um maior número absoluto de crianças que nasceram com CCs sendo identificados 43,17% dos casos encontrados em todo o RN. Pode ser visualizado também que em muitos municípios são registrados apenas 1 caso de cardiopatia congênita na cidade, além disso foi observado que a mesorregião do leste potiguar com 71,9% dos casos (n=100). (Tabela 1 e figura 4)

O cálculo da incidência revela que os municípios de Olho d'água do Borges (2,53:1000 habitantes), Lucrécia (2,26:1000 habitantes) e Riacho de Santana (2,00:1000 habitantes) possuem maiores valores em comparação aos outros municípios/RN. É importante considerar também os poucos municípios que possuem a incidência acima de 1 como: Portalegre (1,00:1000 habitantes), Tenente Laurentino Cruz (1,05:1000 habitantes), Montanhas (1,09:1000 habitantes), Coronel Ezequiel (1,25:1000 habitantes) e São Paulo do Potengi (1,35:1000 habitantes). (Figura 5 e tabela 2)

4.4 Frequência e tipo de cardiopatias congênitas

As DCC específicas mais comum no RN são: Comunicação interventricular (11 casos identificados), Tetralogia de Fallot (6 casos identificados), Comunicação átrioventricular e

Isomerismo dos apêndices atriais (empatados com 5 casos cada) e de acordo com a subdivisão feita, foi observado que as malformações não especificadas são as mais cadastradas no banco de dados (Tabela 3 e figura 6).

4.5 Perfil Materno

4.5.1. Idade média das mães

Foram identificadas 184 mães de filhos com CC, sendo 4,8% com idade entre 20 e 34 anos, 0,5% entre 15-19 e 0,5% entre 40-44 anos. As demais, totalizando 94,2%, não apresentaram informações de idade no DATASUS (figura 7).

4.5.2. Idade gestacional

Verificou-se, dentre as 184 mães, que grande parcela das gestantes (64,6%) tiveram tempo gestacional normal entre 37 e 41 semanas, seguida de 21% com 32 à 36 semanas (figura 8).

4.5.3 Quantidade de consultas pré-natal.

Considerando a quantidade de consultas pré-natais, verifica-se que 3,2% tiveram 7 consultas, 0,1% 4-6, e 0,05% 1-3 encontros. No entanto, a maioria (96,65%) não possui dados cadastrados sobre a quantidade de consultas pré-natal (Figura 9)

4.5.4 Raça das mães

Foi observado que a maior parte das gestantes identificadas (184), as quais possuem filhos com CC, são autodeclaradas pardas (58%), seguidas por mulheres brancas (38,5%) (Figura 10)

DISCUSSÃO

Os achados do estudo reafirmam a literatura existente ao demonstrar que as cardiopatias congênitas (CC) continuam sendo uma das mais frequentes malformações congênitas no mundo além disso, como já foi citado anteriormente é uma das principais causas de mortalidade infantil. Exemplificando, um estudo relatou que em Tocantins, durante os anos de 2011 e 2018, tiveram uma taxa de mortalidade de 10,6:10000 por má formação congênita no sistema cardiovascular (5).

O estado teve como total uma incidência de 0,3:1.000 por habitante e 139 casos detectados durante todos esses anos, um número muito menor do que relatado em outros estados os quais realizaram estudos parecidos. Um estudo no Rio de Janeiro, com dados no período de janeiro de 2006 até 2010 observou uma frequência de cerca de 0,31 a cada 1.000 nascimentos, apresentando de outra forma, cerca de 4% dos nascidos vivos do estado eram cardiopatas (12). Um outro estudo realizado em São Paulo elucidou que no estado, no período entre 2010 - 2018 a prevalência de CC foi de 1,76 a cada 1000 nascidos vivos (13). Já um realizado em Londrina demonstrou uma prevalência de 4,348:1000 nascidos vivos levando em consideração apenas crianças que detectaram as CC com menos de um ano de idade (14) revelando uma prevalência ainda alta em comparação com os dados que obtivemos. Já no Estado da Paraíba foram registrados 39.109 casos de CCs durante o período de 2013-2023

(7). reforçando ainda mais a importância de mais estudos acerca dessas anomalias. Essas informações só reafirmam a necessidade de aprimoramento nos registros epidemiológicos acerca das informações do DATASUS.

Ainda falando sobre a distribuição espacial, um fato curioso foi a alta de nascimentos no ano de 2015 com 49.099 registros, esse que embora tenham tido a taxa de natalidade mais alta, não tem a maior quantidade de neonatos com CC dado esse que foi observado em 2020. Esses dados podem sugerir possíveis agentes teratogênicos de eventos que ocorreram naquele ano ou no ano anterior, mas para afirmar são necessários mais estudos sobre os eventos que ocorreram nesses anos e como eles podem afetar o desenvolvimento embrionário. Também pode estar relacionado a melhorias na detecção e no diagnóstico das CC nos últimos anos, um estudo realizado em 2021 demonstrou que a implementação do teste do coraçãozinho, a utilização do TOF (teste de oximetria de fluxo) aumentou em 4,2% a prevalência de nascimento de cardiopatas mostrando uma melhora na detecção com uma especificidade de 97% (17).

A análise da distribuição espacial revelou que Natal, Mossoró e Parnamirim, municípios mais populosos do estado e por isso apresentaram maior número de casos, o que era esperado devido à maior densidade demográfica e maior disponibilidade de serviços de saúde especializados, que favorecem o diagnóstico e o registro de CC, somado à esses fatores muitas vezes gestantes de outros municípios tendem a migrar para a capital em busca de um atendimento médico melhor principalmente em casos de gravidez de risco, casos esses que podem estar associados não só a saúde da mãe, mas também do feto e isso inclui a aparição de CC.

No entanto, ao considerar a prevalência relativa, os municípios que destacaram-se foram Olho D'água do Borges, Lucrécia e Riacho de Santana, que podem sugerir possíveis a dificuldade de acesso dos moradores ao sistema de saúde pública, o déficit de conscientização de possíveis agentes teratogênicos e o estilo de vida mais rural dessas regiões que, por vezes, tem um perfil socioeconômico econômico mais baixo isso está fortemente relacionado com aparecimento de CC em neonatos de famílias com baixa escolaridade, baixa renda per capita e em muitos casos desemprego (23) culminando na realidade dessa gestante, que pode passar por situações de desnutrição, falta de saneamento básico levando a facilitar o contato com agentes teratogênicos (15). Além disso, após o diagnóstico da CC quando ele é identificado, o tratamento também terá suas dificuldades orçamentárias (16).

Entre as anomalias específicas mais identificadas no RN, destacam-se a Comunicação Interventricular (CIV), a Tetralogia de Fallot e a Comunicação Átrio-Ventricular, essa classificação está de acordo com a literatura (3). A CIV é uma das principais CCs identificadas em exames de imagens e de diagnóstico de cardiopatias congênitas, sua prevalência é ser justificada pela sua ocorrência que pode ser isolada ou junto com outras anomalias como a Tetralogia de fallot e anomalias cromossômicas e elas podem se manter silenciosas até a vida adulta o que aumenta ainda mais sua taxa de detecção. Além disso o septo Interventricular é formado por múltiplos componentes (porção muscular, membranosa e coxins cardíacos) ou seja, possui uma embriogênese complexa que pode ter pequenas falhas (3).

A alta frequência de dados classificados como "malformações cardíacas inespecíficas" no banco de dados evidencia um déficit na detecção e identificação das CC que pode ser justificado pelo difícil diagnóstico já que, em geral, as CC são detectadas depois do primeiro ano de vida. Exemplificando, um estudo na Etiópia demonstrou que 95% dos casos de CC

são identificados entre 12 meses e 5 anos (18) devido às formas assintomáticas das cardiopatias congênitas. Uma forma de contornar essa realidade é mudar a forma de coleta e armazenamento de dados dos neonatos do Brasil. Na Europa existe um sistema de vigilância de anomalias congênitas o EUROCAT (rede europeia de vigilância de malformações congênitas) onde as crianças são acompanhadas até os 5 anos de idade isso facilita a identificação e organização de dados epidemiológico com relação não só as cardiopatias congênitas mas com todas as malformações que possuem difícil identificação (19). Desta forma, se faz importante a coleta de dados dos pacientes a longo prazo e registros de saúde, facilitando assim estudos que explorem fatores de risco e causas subjacentes, as quais, podem contribuir para a redução da mortalidade neonatal e melhoria da qualidade de vida das crianças com CC no estado.

Acerca do perfil materno como já foi observado nos resultados, foram relatados poucos dados acerca das mães devido a falta de informações registradas no DATASUS, reafirmando assim a importância do registro de dados para estudos epidemiológicos. Sendo assim foram observadas algumas divergências entre os resultados e a literatura. Primeiramente a idade materna, alguns estudos demonstraram que a idade mais avançada (acima de 35 anos) da mãe está relacionada com cerca de 2,5% a mais de chance de seus filhos nascerem com anomalias congênitas (24) o que difere dos resultados do nosso estudo. Já outros artigos afirmam que a aparição de anomalias congênitas não cromossômicas não possuem relação direta com a idade materna (20). Não podemos fazer uma confirmação de nenhuma das hipóteses, mas os resultados podem ser justificados já que mulheres, em sua maioria, são mães com uma idade preferencial de entre 25 e 30 anos (21).

Quando se trata de consultas pré-natal, esses dados também foram um dos que apresentaram lacunas no seu registro, mas com base nos dados oferecidos os resultados demonstram que as mulheres que têm mais consultas pré natal, consequentemente têm mais chances de detectar a CC ainda no útero e como já foi citado anteriormente, a detecção precoce é fundamental para um bom prognóstico e consequentemente para uma melhor qualidade de vida do paciente. Contrariando os resultados encontrados, um estudo recente revelou que 47% das mães que fazem poucas ou nenhuma consulta pré-natal, tendem a ter mais chances de ter filhos com anomalias congênitas (24) esse resultado pode ser justificado pela pequena quantidade de gestantes que estão registradas no DATASUS.

Embora a maior parte da literatura afirme que as mulheres brancas tendem a ter filhos com cardiopatias congênitas (22) esse resultado pode ser explicado pela segregação racial encontrada no estado que se revela ser mais de 50% parda (14) tendenciando a este resultado. Ainda assim, a segunda maior quantidade de neonatos cardiopatias são filhos de mães brancas, reforçando às informações encontradas na literatura.

Conclusão

Este estudo traçou o perfil epidemiológico das Cardiopatias congênitas no estado do Rio Grande do Norte entre os anos de 2013 e 2023 embasados no do banco de dados DATASUS. Como conclusão, observamos uma incidência de 0,3 casos a cada 1000 nascidos vivos, um valor abaixo da média brasileira, desses com a maior quantidade de nascimentos de crianças com CC registrada em 2020, registros esses que apesar das teorias não os fatores desse

aumento não foram totalmente elucidados, havendo necessidade de mais estudos sobre eventos ocorridos nesse ano e no ano anterior para detecção de possíveis agentes teratogênicos.

Quando se trata de distribuição temporal, foi demonstrado um aumento dos casos absolutos de CC nos Municípios mais populosos do RN, já que além de possuir mais pessoas também tem um melhor acesso à saúde e tecnologia facilitando assim a detecção dessas anomalias congênitas. Em contrapartida, em cidades mais interioranas a taxa de incidência foi maior, reforçando assim a influência do ambiente na gestação e como a desigualdade social, a dificuldade de acesso ao diagnóstico e acompanhamento podem influenciar e dificultar a detecção de CCs. Seguindo a literatura, os tipos de Cardiopatias congênitas mais encontradas foram a CIV, seguida pela Tetralogia de Fallot e a Comunicação Atrioventricular.

Em relação à outros tipos de anomalias o DATASUS demonstrou vários casos classificados como “malformações não específicas” enfatizando a necessidade de melhora nos registros epidemiológicos. Reforçando ainda mais essa necessidade os dados registrados das mães não ficaram para trás, com muitos registros classificados como “não identificados”, deixando lacunas de informações importantes como a realidade socioeconômica, quantidade de consultas pré-natal, idade das mães e idade gestacional. Para além disso, o perfil materno foi composto por mães jovens (entre 20 e 34 anos), pardas e com idade gestacional normal. Diante disso, é importante estabelecer um aprimoramento do sistema de vigilância epidemiológico e registro de informações sobre neonatos, sugerindo assim a implementação de modelos que possam acompanhar as crianças por períodos mais longos, dessa forma a detecção de CCs será mais confiável e fiel à realidade.

O estudo também evidencia a necessidade de ampliação do acesso ao diagnóstico precoce e atenção à quantidade de consultas pré-natal, essas medidas são importantíssimas para reduzir a mortalidade infantil e facilitar o tratamento precoce de crianças cardiopatas.

Finalmente, esse artigo reforça a importância da vigilância, detecção e prevenção e das CC no Rio Grande do Norte e do Brasil como um todo.

Referências

- (1)CARDOSO, Rosana et al. Cardiopatias congênitas e malformações extracardiacas. 31 fev. 2013. (2)HALPERN, D. G. et al. Reproductive Health in Congenital Heart Disease: Preconception, Pregnancy, and Postpartum. Journal of Cardiovascular Development and Disease, v. 10, n. 5, p. 186, 22 abr. 2023. (3)MOORE, Keith L. Embriologia clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. (4)PINTO JÚNIOR, Valdeste Cavalcante. Avaliação da Política Nacional de Atenção Cardiovascular de Alta Complexidade com foco na cirurgia cardiovascular pediátrica. 2010. (5)SILVA, I. F. de et al. Epidemiologia da mortalidade pediátrica por malformações cardíacas na região Norte do Brasil (2011–2018). Tocantins Review, 2018. (6)LUZ, G. S.; KARAM, S. M.; DUMITH, S. C. Anomalias congênitas no estado do Rio Grande do Sul: análise de série temporal. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 22, e190040, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/cDBDpYC6pQyGXkbRKjSjFtR/?lang=pt>. Acesso em: 22 jun. 2025. (7)SANTOS, J. L. dos et al. Epidemiologia da cardiopatia congênita na Paraíba: análise da terceira macrorregião de saúde. Revista Eletrônica Acervo Científico, v. 25, e20616, 2025. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/cientifico/article/view/20616>. Acesso em: 22 jun. 2025. (8)SILVA, Fernanda Paiva da et al. Perfil clínico e epidemiológico de crianças com cardiopatias congênitas submetidas à cirurgia cardíaca. Revista de Enfermagem

da UFPE, v. 7, n. 4, p. 1022–1030, 2013. Disponível em:
<https://periodicos.ufpe.br/revistas/index.php/revistaenfermagem/article/view/11806/14191>.
Acesso em: 22 jun. 2025. (9)FORERO-MANZANO, M. J. et al. Association of social
determinants with the severity of congenital heart disease. *Pediatric Research*, v. 93, n. 5, p.
1391–1398, 2023. DOI: 10.1038/s41390-022-02205-6. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35986145/>. Acesso em: 22 jun. 2025. (10)SANTOS, C. A.
et al. Congenital cardiac disease in childhood x socioeconomic conditions: a relationship to
be considered in public health? *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 28, n. 3, p.
383–389, 2013. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbccv/a/8b6cPzpCjMq8dqyhG9S4dHs>. Acesso em: 22 jun. 2025.
(11)SOUZA, M. A. da et al. Maioria da população do RN é da cor parda, mostra IBGE.
Tribuna do Norte, Natal, 2023. Disponível em: <https://tribunadonorte.com.br/natal/maioria-da-populacao-do-rn-permanece-sendo-parda-diz-ibge/>. Acesso em: 18 jun. 2025.
(12)CATARINO, C. F. et al. Registros de cardiopatia congênita em crianças menores de um
ano nos sistemas de informações sobre nascimento, internação e óbito do estado do Rio de
Janeiro, 2006-2010*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 26, n. 3, p. 535–543, jul. 2017.
(13)MADRUGA, I. et al. Associated Factors with Congenital Heart Disease in the Most
Populated State of Brazil Between 2010 and 2018. *Int J Cardiovasc Sci*, v. 36, 13 jan. 2023.
(14)GUITTI, J. C. DOS S. Epidemiological characteristics of congenital heart diseases in
Londrina, Paraná South Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 74, n. 5, maio 2000.
(15)Gomes, Júlia A., et al. “Congenital Anomalies in Brazil, 2010 to 2022.” *Iris.paho.org*,
2025, iris.paho.org/handle/10665.2/64485. Accessed 25 June 2025. (16)Cappellesso, Vaniéli
Regina, and Aldalice Pinto de Aguiar. “Cardiopatas Congênitas Em Crianças E
Adolescentes: Caracterização Clínico-Epidemiológica Em Um Hospital Infantil de Manaus-
AM.” *O Mundo Da Saúde*, vol. 41, no. 2, 30 June 2017, pp. 144–153,
[bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/mundo_saude_artigos/cardiopatas_congenitas_crianças.p](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/mundo_saude_artigos/cardiopatas_congenitas_crianças.pdf)
[df, https://doi.org/10.15343/0104-7809.20174102144153](https://doi.org/10.15343/0104-7809.20174102144153). Accessed 9 May 2024.
(17)Saganski, Gabrielle Freitas, et al. “Pulse Oximetry Test for Screening Congenital Heart
Diseases: A Systematic Review.” *Revista Da Escola de Enfermagem Da USP*, vol. 57, 2023,
<https://doi.org/10.1590/1980-220x-reeusp-2023-0215en>. Accessed 3 Oct. 2024. (18)Hurisa,
Tesfaye, et al. “Delay in Diagnosis of Congenital Heart Disease and Associated Factors
among Pediatric Patients in Cardiac Center Addis Ababa, Ethiopia, 2021 G.C.” *Clinical
Pediatrics: Open Access*, vol. 7, no. 3, 2 June 2022, pp. 1–9, [www.longdom.org/open-
access/delay-in-diagnosis-of-congenital-heart-disease-and-associated-factors-among-
pediatric-patients-in-cardiac-center-addis-ababa-ethio-91404.html](http://www.longdom.org/open-access/delay-in-diagnosis-of-congenital-heart-disease-and-associated-factors-among-pediatric-patients-in-cardiac-center-addis-ababa-ethio-91404.html),
<https://doi.org/10.35248/2572-0775.22.7.207>. Accessed 12 March 2025. (19)Groisman B,
Barbero P, Liascovich R, Brun P, Bidondo MP. Detection of critical congenital heart disease
among newborns in Argentina through the national surveillance system of congenital heart
disease (RENAC). *Arch Argent Pediatr* 2022;120(1):6-13. (20)Ahn D, Kim J, Kang J, Kim
YH, Kim K. Congenital anomalies and maternal age: A systematic review and meta-analysis
of observational studies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2022 May;101(5):484-498. doi:
10.1111/aogs.14339. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35288928; PMCID: PMC9564554.
(21)DIAS, P. Censo: veja qual a idade média das mulheres ao terem filhos no seu estado.
Disponível em: <[https://oglobo.globo.com/brasil/noticia/2025/06/27/censo-veja-qual-a-idade-
media-das-mulheres-ao-terem-filhos-no-seu-estado.ghtml](https://oglobo.globo.com/brasil/noticia/2025/06/27/censo-veja-qual-a-idade-media-das-mulheres-ao-terem-filhos-no-seu-estado.ghtml)>. Acesso em: 29 July. 2025.
(22)Temmesen, Camilla Gry, et al. “Women’s Reflections on Timing of Motherhood: A
Meta-Synthesis of Qualitative Evidence.” *Reproductive Health*, vol. 20, no. 1, 8 Feb. 2023,
<https://doi.org/10.1186/s12978-022-01548-x>. (23)Barros, Eliab Batista, et al. “Perfil
Epidemiológico de Nascidos Vivos Com Cardiopatia Congênita Nas Regiões Brasileiras.”

Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences, vol. 5, no. 5, 6 Nov. 2023, pp. 2316–2328, <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n5p2316-2328>. Accessed 29 July 2025.
(24)ibge.gov.br. Accessed 1 Aug. 2025 (25)Guanabara, Jéssica. “Mulheres Que Não Fazem Pré-Natal Têm 47% Mais Chances de Ter Um Bebê Com Anomalias.” Agência Fiocruz de Notícias, 21 July 2025, agencia.fiocruz.br/mulheres-que-nao-fazem-pre-natal-tem-47-mais-chances-de-ter-um-bebe-com-anomalias. Accessed 4 Aug. 2025.

Anexos

Figura 1: Distribuição anual de crianças nascidas no RN, em valor absoluto, no período de 2013 a 2023.

Figura 2: Distribuição anual de Neonatos com cardiopatias congênitas entre os anos de 2013 e 2023.

Figura 3: Distribuição temporal da incidência de nativos do RN com CC, entre 2013 e 2023.

Tabela 1 : Quantidade de nascidos registrados entre os anos de 2013 e 2023 de acordo com o município de de residência da gestante.

Figura 4: Mesorregiões que apresentaram casos de cardiopatia congênita entre os anos de 2013 e 2023.

Figura 5: Cardiopatias congênitas mais frequentes no RN com destaque às cidades de Olhod’água do Borges, Lucrécia e Riacho de Santana.

Tabela 2: Incidência de acordo com o município de residência da mãe do neonato.

Tabela 3: Mostra a ocorrência de CC encontradas no RN e quais as CCs encontradas.

Figura 6: Distribuição da frequência em porcentagem dos tipos de CC encontrados no RN.

Figura 7: Relata a idade das gestantes que possuem filhos com CC identificadas no banco de dados. Em sua maioria possui classificação “Ignorada”.

Figura 8: Distribuição da idade gestacional em semanas das 184 mães identificadas no RN.

Figura 9: Distribuição da quantidade de consultas pré natal registradas das 184 mães de filhos com CC.

Figura 10: Demonstra a raça das mães que possuem filhos com cardiopatias congênitas no RN.

CÓDIGO: SB0244

AUTOR: FELIPE CONRADO MATIAS

ORIENTADOR: ANA CAROLINA LUCHIARI

TÍTULO: Embriotoxicidade da principal B-Carbolina da Ayahuasca, a harmina, no zebrafish.

Resumo

Dada a crescente prevalência de depressão e ansiedade, o uso de medicamentos antidepressivos e ansiolíticos tornou-se cada vez mais necessário. Nesse sentido, apenas cerca de dois terços dos pacientes alcançam os resultados esperados com os tratamentos convencionais. Assim, alternativas terapêuticas para indivíduos resistentes aos tratamentos atuais são urgentemente necessárias. Nesse contexto, substâncias psicodélicas têm ganhado atenção como possíveis aliadas. Entre elas, a Ayahuasca—uma bebida tradicional composta principalmente por harmina, uma β -carbolina, e DMT, um agonista serotoninérgico—tem despertado crescente interesse. Apesar de seu potencial terapêutico, é crucial a realização de estudos de segurança e toxicidade. Aqui, avaliamos a toxicidade da harmina utilizando embriões de zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental. Avaliamos a exposição aguda (conforme a diretriz OECD 236) a cinco concentrações de harmina (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg/L) em parâmetros como malformações, tempo de eclosão, frequência cardíaca e mortalidade. Observamos que concentrações acima de 0,5 mg/L levaram ao aumento da mortalidade, atraso na eclosão, redução da sobrevivência e diminuição da função cardíaca em comparação aos grupos controle. A CL50 estimada da harmina foi de 0,19 mg/L. Esses resultados indicam que a harmina apresenta toxicidade significativa em concentrações mais baixas, destacando a importância de rigorosas avaliações toxicológicas antes de seu uso terapêutico em humanos.

Palavras-chave: Zebrafish, Harmina, Ayahuasca, Depressão, Tratamento, Embriotoxicidade.

TITLE: EMBRYOTOXICITY OF THE MAIN B-CARBOLINE OF AYAHUASCA, HARMINE, IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Abstract

Given the increasing prevalence of depression and anxiety, the use of antidepressant and anxiolytic medications has become increasingly necessary. In this regard, only about two-thirds of patients achieve the expected outcomes with conventional treatments. Thus, therapeutic alternatives for individuals resistant to current treatments are urgently needed. In this context, psychedelic substances have gained attention as potential allies. Among them, Ayahuasca—a traditional beverage primarily composed of harmine, a β -carboline, and DMT, a serotonergic agonist—has attracted growing interest. Despite its therapeutic potential, it is

crucial to conduct safety and toxicity studies. Here, we evaluated the toxicity of harmine using zebrafish (*Danio rerio*) embryos as an experimental model. We assessed acute exposure (according to OECD Guideline 236) to five concentrations of harmine (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, and 1 mg/L) on parameters such as malformations, hatching time, heart rate, and mortality. We observed that concentrations above 0.5 mg/L led to increased mortality, delayed hatching, reduced survival, and decreased cardiac function compared to control groups. The estimated LC50 of harmine was 0.19 mg/L. These results indicate that harmine exhibits significant toxicity at lower concentrations, underscoring the importance of rigorous toxicological evaluations prior to its therapeutic use in humans.

Keywords: Zebrafish, Harmine, Ayahuasca, Depression, Treatment, Embriotoxicity

Introdução

A depressão é uma das principais doenças globais de saúde pública, afetando mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo (OPAS, 2023). No Brasil, sua prevalência ao longo da vida é estimada em 15,5% (OMS, 2021; Ministério da Saúde; Vigitel, 2021). Entre 2005 e 2015, os casos aumentaram 18%, atingindo 11,5 milhões de brasileiros (Gonçalves et al., 2018), e durante a pandemia de COVID-19 houve um crescimento global de 25% nos diagnósticos de depressão e ansiedade (OMS, 2022).

A fisiopatologia da depressão é multifatorial, envolvendo desequilíbrios neuroquímicos — especialmente nos neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina —, alterações hormonais e estruturais no cérebro, além de disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), com elevação dos níveis de cortisol em indivíduos deprimidos (Meyer et al., 2006; Shao & Zhu, 2020; Pandya et al., 2012; Hinkelmann et al., 2012; Qin et al., 2016; Alenko et al., 2020).

Apesar dos avanços terapêuticos, incluindo o uso de antidepressivos e abordagens psicoterápicas como a terapia cognitivo-comportamental (TCC) e a terapia interpessoal (TIP), muitos pacientes apresentam resposta limitada ao tratamento e recaídas frequentes (Cui, 2015). Esse cenário tem impulsionado o interesse por alternativas naturais, como a ayahuasca, uma bebida psicoativa tradicionalmente utilizada em rituais indígenas amazônicos. Estudos têm apontado efeitos ansiolíticos e antidepressivos associados aos seus compostos ativos (Barbosa et al., 2018; Daldegan-Bueno et al., 2022; Barabasz-Gembczyk et al., 2020).

Entre esses compostos, destaca-se a harmina, um alcaloide β -carbolínico presente no cipó Banisteriopsis caapi, um dos ingredientes principais da ayahuasca. A harmina é um inibidor reversível da monoamina oxidase A (MAO-A), e seu uso combinado com a N, N-dimetiltriptamina (DMT) permite a atividade oral da bebida ao impedir a degradação da DMT no trato gastrointestinal. Além de seu papel facilitador na farmacocinética da ayahuasca, a harmina possui propriedades farmacológicas próprias, incluindo potenciais efeitos antidepressivos, neuroprotetores e anti-inflamatórios (Santos, 2007; Jacob & Presti, 2005; Brito-da-Costa et al., 2020; Gable, 2007).

Entretanto, embora os efeitos terapêuticos da ayahuasca como um todo estejam sendo progressivamente investigados, os impactos toxicológicos da harmina isolada, especialmente durante fases críticas do desenvolvimento, permanecem pouco explorados. A maioria dos estudos concentra-se na ayahuasca como mistura, dificultando a distinção dos efeitos

adversos causados por cada um de seus componentes (Nižnanský et al., 2022; Da Motta et al., 2018; Durante et al., 2021).

Para o desenvolvimento de novos fármacos, são exigidas análises rigorosas de biossegurança, incluindo testes toxicológicos in silico, in vitro e in vivo, conforme exigido por agências reguladoras como a FDA e a EMA (RDC Nº 39, 2013; CIRSCI). Nesse contexto, modelos alternativos aos mamíferos, como o peixe-zebra (*Danio rerio*), têm sido amplamente utilizados em testes toxicológicos por suas vantagens práticas e científicas, como alta homologia genética com humanos, transparência embrionária e rápido desenvolvimento (Andrade, 2018).

Estudos prévios com ayahuasca mostraram que sua CL₅₀ em larvas de *Danio rerio* é de 236,3 mg/L, com alterações comportamentais e de desenvolvimento observadas em concentrações a partir de 4 mg/L (Andrade et al., 2018). No entanto, como se trata de uma mistura complexa, esses resultados não permitem atribuir os efeitos observados diretamente à harmina.

Diante disso, este estudo investigou os efeitos toxicológicos da harmina isolada em embriões de *Danio rerio*, com foco em parâmetros de embriotoxicidade, eclosão, malformações, frequência cardíaca e estimativa da CL₅₀. Os dados obtidos contribuem para a avaliação mais precisa da segurança e do potencial terapêutico da harmina, especialmente quanto ao seu uso em contextos clínicos ou fitoterápicos.

Metodologia

Aprovação ética e diretrizes
Zebrafish machos e fêmeas (*Danio rerio*) da linhagem selvagem 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.

Substância testada
A substância testada foi a harmina, obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (Fórmula empírica: C₁₃H₁₂N₂O; CAS Number: 442-51-3). A harmina foi diluída em DMSO (0,3%) e preparada em diferentes concentrações para os testes de toxicidade aguda: 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L e 1,0 mg/L.

Animais e reprodução
Zebrafish adultos (*Danio rerio*, linhagem selvagem, com aproximadamente seis meses de idade, de ambos os sexos) foram mantidos no FishLab/UFRN. Os animais foram alojados em sistema automatizado de recirculação (ZebTEC), com temperatura controlada em 28 °C, condutividade de 600 µS/cm, pH 7,2, amônia total < 0,01 mg/L e fotoperíodo de 14 h claro / 10 h escuro. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com náuplios de *Artemia salina* e ração comercial.

Para obtenção dos embriões, adultos de quatro tanques diferentes foram colocados em tanques de reprodução (proporção de 3 machos para 2 fêmeas), separados por divisória durante a noite. Na manhã seguinte, a divisória foi removida e os peixes foram deixados para

reproduzir por 60 minutos. Os ovos fertilizados foram coletados, examinados sob estereomicroscópio e transferidos para placas de Petri contendo água do sistema.

Teste de embriotoxicidade

O teste de embriotoxicidade foi conduzido conforme a diretriz 236 da OCDE, em tréplica. Os embriões foram observados às 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização (hpf), avaliando-se mortalidade, taxa de eclosão, malformações morfológicas (olhos, cabeça, cauda, coluna), presença de edemas (saco vitelínico e região pericárdica), atraso no desenvolvimento e ausência de batimentos cardíacos. As observações foram realizadas com estereomicroscópio (80x) e as alterações fenotípicas foram classificadas conforme Kimmel et al. (1995). A concentração letal mediana (CL50) foi estimada com base nos dados de mortalidade aos 96 hpf.

As concentrações de harmina testadas foram de 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L e 1,0 mg/L. Utilizaram-se ainda três grupos controle: negativo (água do sistema), controle solvente DMSO (0,3%) e positivo (3,4-dicloroanilina a 4 mg/L). Os ovos foram distribuídos em placas de 24 poços, contendo um embrião por poço.

Avaliação da cardiotoxicidade

A frequência cardíaca foi utilizada como parâmetro de cardiotoxicidade em larvas de 96 hpf. Foram analisados dez indivíduos por grupo experimental, observados sob estereomicroscópio (80x). Os batimentos cardíacos de 10 animais por grupo foram contados durante 60 segundos, em triplicata. Devido à elevada letalidade e presença de malformações severas, o grupo controle positivo e 1,0 mg/L de harmina não foram incluídos nesta análise.

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 a análise de Kaplan-Meier, com comparação entre grupos pelo teste de Log-Rank. Nos casos de distribuição normal, os dados foram analisados por ANOVA de uma via; quando não atendidos os pressupostos paramétricos, utilizaram-se testes não paramétricos (Kruskal-Wallis ou Friedman). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Após 96h de exposição aos tratamentos, a taxa de sobrevivência dos embriões expostos a harmina foi significativa (Log rank, $p < 0,0001$). Os controles água e DMSO (controles negativos) e 3,4-dicloroanilina (controle positivo) apresentaram percentual de sobrevivência de 87,5; 85% e 0% às 96 hpf, respectivamente (Anexo 1). Em comparação com o grupo controle (água), as concentrações de harmina testadas apresentaram percentual de sobrevivência de 87,5 (0,01mg/L), 77,5(0,05mg/L), 62,5(0,1mg/L), 82,5 (0,5) e 22,5(1mg/L) % ($p < 0,0001$). Desta maneira, a estimativa de CL50 calculada para harmina foi de 0,19mg/L (Anexo 2).

Anexos 1 e 2. Taxa de sobrevivência dos embriões de zebrafish durante 96 h de exposição a harmina (a) e concentração letal de 50% da população (CL50) (b). Os animais expostos foram comparados com os grupos controles negativos: Água (water) e DMSO 0.3% e positivo (DCA). Cinco concentrações foram testadas: 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5

mg/L e 1,0 mg/L. A sobrevivência foi observada a cada 24 horas (n= 20 inicial para cada grupo em cada exposição).

Os embriões expostos a harmina por 96h tiveram a taxa de eclosão analisada, revelando estatística significativa ($p=0.0008$; Fig. 3). Enquanto os animais expostos ao controle positivo DCA apresentaram eclosão muito reduzida, tendo mortalidade elevada, semelhante ao resultado obtido para 1 mg/L de harmina. Os animais expostos às concentrações de 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, e 0,5 mg/L apresentaram taxas de eclosão de 85, 82,5, 62,5, 82,5, 7,5% em 96 horas, respectivamente (Fig. 3).

Anexo 3. Taxa de eclosão dos embriões de zebrafish durante 96h de exposição a harmina. Os animais expostos foram comparados com os grupos controles: Água Controle (water), Controle DMSO 0.3%, e Controle positivo DCA. Cinco concentrações foram testadas: 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L e 1,0 mg/L. A taxa de eclosão foi observada a cada 24 horas (n=20 por grupo em cada exposição).

Em relação às malformações causadas pela harmina mostraram significância estatística (ANOVA F (7,312) = 2461; $P=0.0180$) entre as concentrações testadas (Fig. 4), havendo aumento significativo de malformações totais nos grupos expostos a 0,5 e 1,0 mg/L. Ademais, diferenças foram observadas também para os tipos específicos de malformações observadas nos animais, como mostrado na figura 4b.

Anexo 4. Malformações totais (a) e detalhadas (b) dos embriões de zebrafish após 96h de exposição à harmina. Os animais expostos foram comparados com os grupos controles negativos: Água (water), DMSO 0.3% (DMSO), e controle positivo (DCA). Embriões de 3 hpf foram expostos a harmina 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L e 1,0 mg/L até as 96 hpf. As malformações foram observadas com maior frequência nos grupos 0,5 mg/L e 1,0 mg/L.

Para a função cardíaca (Fig. 5), a frequência cardíaca por minuto foi obtida de 20 larvas por grupo. Peixes tratados com harmina 0,5 mg/L apresentaram diminuição da frequência cardíaca (média de 156 bpm) em comparação aos grupos controle (ANOVA, F (5,102) = 1489 $P = 0.0288$), cujas taxas médias foram de 170, 163 batimentos por minuto (bpm) para água controle e controle DMSO, respectivamente (teste de Tukey, $p < 0,05$). Devido a elevada mortalidade e malformações observadas nos grupos DCA e 1,0 mg/L de harmina, esses indivíduos não foram avaliados para frequência cardíaca.

Anexo 5. Frequências cardíacas - batimentos por minuto (bpm) - de animais expostos a harmina por 96 h. Os animais expostos foram comparados aos grupos controle: água (water) e DMSO 0,3%. Quatro concentrações de harmina foram testadas: 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L.*** indica significância estatística entre os grupos em $p < 0,001$.

Discussão

Avaliamos aqui a toxicidade da principal beta carbolina presente na ayahuasca, a harmina, um inibidor de monoamina oxidase (MAO). Nossos resultados indicam elevada toxicidade da harmina em embriões de zebrafish, conforme evidenciado pela CL50 estimada em 0,19 mg/L, além da alta mortalidade, grande número de malformações e efeitos cardiotoxicos de concentrações acima de 0,5 mg/L. Assim, embora haja alguma margem de segurança no uso de baixas concentrações de harmina, valores pouco acima da DL50 podem desencadear efeitos adversos que ainda precisam ser completamente elucidados. As anomalias

morfológicas podem ser derivadas, ao menos em parte, de estresse oxidativo com dano genômico: a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio compromete a integridade do DNA, e as vias de reparo não restauram totalmente a estrutura, abrindo caminho para defeitos teratogênicos, no entanto mais estudos precisam ser realizados para se confirmar esta hipótese.

A MAO é a enzima responsável por degradar neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina, dopamina e noradrenalina, que está presente em vários tecidos, como cérebro, fígado e intestinos. Ela existe em duas formas principais: MAO-A, que atua preferencialmente sobre serotonina e noradrenalina, e MAO-B, que metaboliza principalmente dopamina e feniletilamina. A inibição da MAO leva ao aumento dos níveis das monoaminas, podendo gerar efeitos terapêuticos no sistema nervoso, como melhora do humor e da cognição. No entanto, devido a ampla expressão dessa enzima, sua inibição pode causar efeitos colaterais ou tóxicos. (Chaurasiya et al., 2022)

Nos anos 1950, inibidores da MAO foram bastante utilizados no tratamento da depressão. As drogas inibidoras de MAO foram alguns dos primeiros antidepressivos utilizados na clínica, mas devido aos efeitos colaterais, como hipotensão postural, insônia, ganho de peso, e interações com outros medicamentos ou com itens alimentares que culminavam em consequências como síndrome serotoninérgica ou crise hipertensiva, seu uso foi abolido alguns anos depois. Hoje, inibidores de MAO (IMAO) são utilizados com cautela no tratamento de transtornos psiquiátricos e outras doenças (Sabri & Saber-Ayad, 2023).

A harmina, um IMAO presente no chá de ayahuasca, tem papel importante nesta composição pois inibe a quebra da dimetiltriptamina (DMT), principal agonista serotoninérgico do chá. A ayahuasca tem recebido atenção da comunidade científica e médica devido ao potencial de reduzir sintomas depressivos em indivíduos resistentes aos tratamentos farmacológicos mais comuns (antidepressivos clássicos). No entanto, o chá de ayahuasca é composto por diversos outros compostos, advindos da cocção de raízes de *Banisteriopsis caapi* e folhas de *Psychotria viridis*, que embora tenham potencial farmacológico, geram desconforto intestinal e vômitos intensos (Ruffell et al., 2023). Assim, o isolamento dos principais compostos, harmina e DMT, ganham destaque e podem ser utilizados com fins terapêuticos sem os efeitos colaterais intestinais, um exemplo seria a harmina e sua relação com a depressão: estudos apontam que ela pode alterar o tecido cerebral à expressão da glutamina sintetase e do transportador de aminoácidos excitatórios específico das células gliais (Ruffell et al., 2023). Para que esses compostos isolados possam ser utilizados clinicamente, testes pré-clínicos incluindo a determinação de CL50 de cada um e seu potencial toxicológico são extremamente importantes.

Nesse sentido, o uso do zebrafish permite a avaliação rápida e eficiente para avaliação embriotoxicológica e acelera o desenvolvimento de fases subsequentes da pesquisa para o uso de tratamentos alternativos para a depressão e outras condições psiquiátricas.

Zebrafish expressam MAO semelhantes às encontradas em outros vertebrados (MAO-A e MAO-B), o que os torna um modelo relevante para o estudo dos efeitos desses inibidores (Sallinen et al., 2009). A MAO tem efeitos significativos na fisiologia e no comportamento deste modelo (Sallinen et al., 2009; Jaka et al., 2021). A inibição desta enzima gera um fenótipo hiperserotoninérgico em zebrafish (Sallinen et al., 2009), reduzindo comportamentos tipo-ansioso (Jaka et al., 2021). Zebrafish com mutação no gene *mao* apresentam comportamentos de estresse alterados, indicando a importância da MAO na regulação das respostas ao estresse (Pierre et al., 2020). Assim, os testes utilizando harmina tem validade

em zebrafish e oferecem resultados importantes para os próximos passos do estudo de ayahuasca e farmacoayahuasca, fármaco produzido pela mistura dos principais compostos ativos da ayahuasca: harmina e DMT.

No nosso estudo, a determinação de CL50 permite que novos cálculos para o uso de concentrações seguras sejam realizados. A CL50 não define diretamente uma dose terapêutica, mas fornece um parâmetro importante de toxicidade aguda. A concentração terapêutica costuma ser muito inferior à CL50, normalmente 1% a 10% da CL50 para uso experimental ou terapêutico em organismos vivos, especialmente quando há preocupação com toxicidade crônica ou efeitos subletais.

Embora nossos resultados com harmina sejam, de certo modo, contrários aos obtidos por Grisolia et al. (2018), alguns pontos devem ser considerados. Grisolia et al. (2018) estimaram a CL50 da ayahuasca em embriões de zebrafish, usando o mesmo teste aqui aplicado (FET, OECD 236), em 236,3 mg/L, portanto correspondendo a 0,22 mg/mL de harmina. No entanto, esses autores não utilizaram compostos isolados, e assim, efeitos antagônicos entre harmina e DMT podem gerar resultados diferentes de CL50. Ademais, a ayahuasca utilizada ainda continha outra beta-carbolina, a harmalina, que pode agir de forma sinérgica ou potencializar os efeitos da harmina. Portanto, estudos com o DMT isolado são urgentes, para que se possa determinar a CL50 deste composto e posteriormente a atividade da mistura entre harmina e DMT em concentrações seguras, entre 1 e 10% da CL50.

O zebrafish tem recebido grande atenção na área da toxicologia devido à grande similaridade genética com os seres humanos, possuindo ortólogos para cerca de 70% das proteínas humanas e 82% das proteínas associadas a doenças humanas (Howe et al., 2013). Essas proteínas conservam, em grande parte, seus domínios funcionais, o que reforça a relevância desse modelo para estudos biomédicos (MacRae & Peterson, 2015). Embora existam adaptações específicas à vida aquática, os principais órgãos dos zebrafish exercem funções equivalentes às dos órgãos humanos e mantêm uma fisiologia comparável (MacRae & Peterson, 2015). O mapeamento genético de mais de uma centena de genes ortólogos entre zebrafish e humanos amplia o potencial de extrapolação dos dados experimentais para contextos clínicos (Barbazuk et al., 2000; Howe et al., 2013). Além disso, os sistemas de neurotransmissores aminérgicos já foram completamente caracterizados em cérebros de zebrafish, tanto em adultos quanto em estágios larvais (Anichtchik et al., 2006).

O presente estudo é ainda uma fase preliminar com apenas a determinação de CL50 e obtenção de dados que caracterizam o potencial teratogênico e cardiotoxico de concentrações mais elevadas de harmina. É importante que testes neurotóxicos, testes bioquímicos e genéticos ainda sejam realizados para a mais profunda compreensão dos efeitos da harmina em modelos vertebrados. Ademais, os mesmos testes devem ser realizados com DMT e com as misturas de DMT e harmina, a fim de garantir a completa segurança dos compostos em testes clínicos. O zebrafish se consolidou como modelo translacional de grande valor para a pesquisa, fornecendo informações relevantes sobre potenciais efeitos adversos em humanos. Além disso, o zebrafish tem sido empregado com sucesso na modelagem de comportamentos relacionados a transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão, reforçando seu uso em pesquisas translacionais. O uso desse modelo também contribui para a redução do número de experimentos com mamíferos, em consonância com os princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento), promovendo práticas mais éticas na ciência.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a harmina, principal β -carbolina da ayahuasca, apresenta significativa toxicidade em embriões de zebrafish, evidenciada por elevada mortalidade, atraso no processo de eclosão, ocorrência de malformações e redução da função cardíaca em concentrações superiores a 0,5 mg/L. Também confirmados pela estimativa de CL50 em 0,19 mg/L.

Apesar do potencial farmacológico da harmina e de sua relevância no contexto da ayahuasca, nossos achados ressaltam a importância de estudos toxicológicos detalhados antes da sua aplicação clínica, principalmente quanto a efeitos teratogênicos e cardiotoxicos. O uso do zebrafish como modelo experimental mostrou-se adequado para a avaliação preliminar de segurança, fornecendo subsídios importantes para futuras investigações.

Portanto, faz-se necessário ampliar as pesquisas envolvendo a harmina isolada, o DMT e suas combinações, de modo a estabelecer margens de segurança e compreender melhor seus potenciais riscos e benefícios. Tais estudos são fundamentais para embasar a utilização racional e segura da harmina como possível agente terapêutico em transtornos psiquiátricos, contribuindo para o avanço do campo da psicofarmacologia e da medicina translacional.

Referências

- Alenko, A., Tsegaye, D., & Tesfaye, M. (2020). Depression and anxiety disorders among people with epilepsy in Africa: A systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, 20(1), 1–12.
- Anichtchik, O., Diekmann, H., & Kaslin, J. (2006). Neurotransmitter systems in zebrafish: Relevance for neuropsychiatric disorders. *BioEssays*, 28(9), 903–913.
- Andrade, R. G. (2018). Avaliação toxicológica da Ayahuasca em modelo experimental de *Danio rerio*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- Andrade, R. G., Grisolia, C. K., & Oliveira, C. S. (2018). Toxicological effects of Ayahuasca in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62, 94–98.
- Barabasz-Gembczyk, M., & Kowalczyk, M. (2020). Ayahuasca – potential therapeutic effects and risks. *Psychiatria Polska*, 54(6), 1131–1143.
- Barbosa, P. C. R., Giglio, J. S., & Dalgalarondo, P. (2018). Altered states of consciousness and short-term psychological after-effects induced by the first-time ingestion of ayahuasca in an urban context in Brazil. *Journal of Psychoactive Drugs*, 37(2), 193–201.
- Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., ... & Gregory, B. D. (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research*, 10(9), 1351–1358.
- Brito-da-Costa, A. M., Dias-da-Silva, D., & Guerra-Guimarães, L. (2020). Pharmacological properties of β -carbolines: Implications for ayahuasca use and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, 211, 107530.

Chaurasiya, N. D., Leon, F., Muhammad, I., & Tekwani, B. L. (2022). Natural products inhibitors of monoamine oxidases—Potential new drug leads for neuroprotection, neurological disorders, and neuroblastoma. *Molecules*, 27(13), 4297.

CIRSCI – Centro de Inovação, Regulação e Saúde. (s.d.). Guia de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

Cui, L. (2015). Current challenges in the treatment of depression and future directions. *Psychiatry Journal*, 2015, 1–5.

Daldegan-Bueno, D., Sordi, A. O., & Hallak, J. E. C. (2022). Ayahuasca: A new psychopharmacological therapy for depression and anxiety? *Current Neuropharmacology*, 20(6), 1112–1124.

Da Motta, L. G., Durante, M. M., & Oliveira, R. J. (2018). Toxicogenetic assessment of ayahuasca exposure in mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 18031–18039.

Durante, M., Da Motta, L., & Oliveira, R. J. (2021). Behavioral and genetic effects of ayahuasca: Evidence from animal studies. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 84, 103596.

Gable, R. S. (2007). Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction*, 102(1), 24–34.

Gonçalves, D. M., Stein, A. T., & Kapczinski, F. (2018). Prevalência de sintomas depressivos na população brasileira. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 30(1), 23–29.

Grisolia, C. K., Oliveira, C. S., & Andrade, R. G. (2018). Embryotoxicity and teratogenicity of ayahuasca in zebrafish. *Environmental Toxicology*, 33(3), 285–292.

Hinkelmann, K., Moritz, S., Botzenhardt, J., Riedesel, K., Wiedemann, K., Kellner, M., & Otte, C. (2012). Cognitive impairment in major depression: Association with salivary cortisol. *Biological Psychiatry*, 71(8), 646–651.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503.

Jacob, M. S., & Presti, D. E. (2005). Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: An anxiolytic role for dimethyltryptamine. *Medical Hypotheses*, 64(5), 930–937.

Jaka, O., Miranda-Álvarez, M., López de Maturana, R., & Sánchez-González, J. A. (2021). Monoamine oxidase inhibition reduces anxiety-like behavior in zebrafish: Behavioral and neurochemical assessment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 106, 110166.

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.

Meyer, J. H., Wilson, A. A., Sagrati, S., Hussey, D., Carella, A., Potter, W. Z., ... & Houle, S. (2006). Serotonin transporter occupancy of five selective serotonin reuptake inhibitors at different doses: An [11C]DASB positron emission tomography study. *American Journal of Psychiatry*, 161(5), 826–835.

Ministério da Saúde; Vigitel. (2021). Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.

Nižnanský, D., Kráľová Trnovská, D., & Ondriová, J. (2022). Ayahuasca: Potential effects on human health and behavior. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114754.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. (2023). Depressão: Dados e estatísticas. <https://www.paho.org/pt>

OMS – Organização Mundial da Saúde. (2021). Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.

OMS – Organização Mundial da Saúde. (2022). The impact of COVID-19 on mental health: Policy brief.

Pandya, M., Altinay, M., Malone, D. A., & Anand, A. (2012). Where in the brain is depression? *Current Psychiatry Reports*, 14(6), 634–642.

Pierre, K., Correa, J. A., & Becker, C. G. (2020). MAO-A gene mutation alters stress reactivity and behavior in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 387, 112582.

Qin, Z., Zhang, J., & Wu, Y. (2016). Cortisol levels and depression: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 63, 370–380.

RDC Nº 39. (2013). Diretrizes para realização de estudos não clínicos de toxicologia e segurança. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Ruffell, S. G. D., Crosland-Wood, M., Palmer, R., Netzbant, N., Tsang, W., Weiss, B., Gandy, S., Cowley-Court, T., Halman, A., McHerron, D., Jong, A., Kennedy, T., White, E., Perkins, D., Terhune, D. B., & Sarris, J. (2023). Ayahuasca: A review of historical, pharmacological, and therapeutic aspects. *PCN Reports*, 2(4), e146.

Sabri, M. A., & Saber-Ayad, M. M. (2023). MAO inhibitors. In StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.

Sallinen, V., Sundvik, M., Reenilä, I., Peitsaro, N., Khrustalyov, D., Anichtchik, O., & Panula, P. (2009). Monoamine oxidase inhibition induces a hyperserotonergic state and behavioral disruption in larval zebrafish. *Journal of Neurochemistry*, 109(2), 403–415.

Santos, R. G. (2007). Ayahuasca: Neurobiologia e potencial terapêutico. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 29(1), 95–96.

Shao, Y., & Zhu, B. (2020). The involvement of HPA axis dysfunction in depression. *Neuroscience Letters*, 733, 135106.

Anexos

Anexo 1

Anexo 2

Anexo 3

Anexo 4

Anexo 5

CÓDIGO: SB0246

AUTOR: LARYSSA DA SILVA FREITAS

ORIENTADOR: VANIA SOUSA ANDRADE

TÍTULO: Atividade anti-Sporothrix spp. dos óleos essenciais de Lippia grata e Croton blanchetianus

Resumo

Os óleos essenciais apresentam atividade antifúngica relevante, incluindo ação frente a isolados clínicos de *Sporothrix* spp.. O óleo de *L. grata* inibiu 100% das cepas na forma filamentosa, com 89,4% sensíveis à concentração de 781,25 µg/mL. O óleo de *C. blanchetianus* demonstrou inibição em 89,4% dos isolados, sendo 6.250 µg/mL eficaz contra 79% das cepas. Em comparação, o itraconazol apresentou CIM elevada em 63,15% dos isolados, enquanto a terbinafina exibiu baixas concentrações inibitórias (0,007 a 0,015 µg/mL), indicando alta eficácia in vitro. As etapas pendentes, como CFM e sinergismo, estão previstas para aprofundar o potencial terapêutico dos óleos essenciais. Os resultados reforçam a importância da bioprospecção de produtos naturais buscando o desenvolvimento de antimicrobianos.

Palavras-chave: Esporotricose; Resistência antifúngica; Bioprospecção.

TITLE: Detection of the antimicrobial activity of essential oils from *Lippia grata* and *Croton blanchetianus* against isolates of *Sporothrix* spp.

Abstract

Essential oils exhibit relevant antifungal activity, including action against clinical isolates of *Sporothrix* spp. *Lippia grata* oil inhibited 100% of filamentous strains, with 89.4% sensitive to a concentration of 781.25 µg/mL. *Croton blanchetianus* oil demonstrated inhibition in 89.4% of isolates, with 6,250 µg/mL being effective against 79% of strains. In comparison, itraconazole showed a high MIC in 63.15% of isolates, while terbinafine exhibited low inhibitory concentrations (0.007 to 0.015 µg/mL), indicating high in vitro efficacy. Pending steps, such as MFC and synergism, are expected to deepen the therapeutic potential of essential oils. The results reinforce the importance of bioprospecting natural products for the development of antimicrobials.

Keywords: Sporotrichosis; Antifungal resistance; Bioprospecting.

Introdução

A esporotricose é considerada a micose subcutânea cosmopolita mais prevalente e amplamente distribuída no mundo (Brasil, 2023). Causada por fungos do gênero *Sporothrix*, essa infecção acomete tanto humanos quanto diversos animais, com destaque para os felinos, que atuam como importantes vetores na transmissão zoonótica e antropozoonótica da doença

(Duarte; Carvalho, 2021). Esses fungos são dimórficos, assumindo a forma filamentosa no ambiente e a forma leveduriforme no hospedeiro ou em cultura a 37 °C, o que contribui para sua patogenicidade (Criseo; Zungri; Romeo, 2008).

A transmissão ocorre por meio de contato direto com o solo ou matéria orgânica contaminada (saprônose), entre animais (zoonose) ou entre animais e humanos (antropozoonose), sendo comum a infecção por arranhaduras ou mordeduras por gatos infectados com o fungo (CDC, 2020). No Brasil, a doença tem ampla distribuição, com maior incidência nas regiões Sudeste e Nordeste, onde é considerada endêmica (Rodrigues et al., 2020; Duarte; Carvalho, 2021). A emergência de cepas resistentes do gênero *Sporothrix*, especialmente *S. brasiliensis*, ao itraconazol, o principal fármaco de escolha no tratamento vem sendo amplamente relatada, o que agrava o quadro clínico e compromete a resposta terapêutica (Valeriano, 2021; Silva; Machado; Mendes Junior, 2023).

Diante desse cenário, crescem os esforços da comunidade científica em busca por novas estratégias terapêuticas. Os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais têm se destacado como potenciais agentes antifúngicos, devido a sua ampla atividade antimicrobiana, baixa toxicidade e potencial de aplicação como fitoterápicos (Bakkali et al., 2008).

No bioma Caatinga, ecossistema exclusivo do Brasil e com rica biodiversidade, espécies como *Lippia grata* e *Croton blanchetianus* têm se destacado por sua atividade antimicrobiana já validada contra microrganismos como *Candida* spp. (Malveira, 2022; Souza, 2022; Souza, 2023). Os componentes majoritários dos referidos óleos essenciais, como Carvacrol, Timol, Eucaliptol e D- α -Pineno, pertencem à classe dos terpenos e demonstram mecanismos de ação antifúngica associados à inibição da biossíntese de ergosterol e à alteração da permeabilidade da membrana fúngica (Burt, 2004; Ultée et al., 2007; Brasileiro, 2022).

Estudos *in vivo* recentes demonstraram a eficácia de óleos com perfis químicos semelhantes, como os de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*, na redução de lesões e sintomas causados por *Sporothrix brasiliensis*, inclusive em cepas resistentes ao itraconazol (Waller et al., 2021; De Matos et al., 2023). Esses achados sustentam a necessidade de expandir a investigação sobre compostos naturais como alternativas terapêuticas no controle da esporotricose.

Assim, este trabalho propõe investigar o potencial antifúngico dos óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus* frente a espécies do Complexo *Sporothrix*, vislumbrando fornecer uma contribuição científica para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes no combate às micoses emergentes.

Metodologia

2.1 Obtenção do microrganismo, manutenção da cultura e preparo do inóculo fúngico

Foram utilizados 20 isolados clínicos de *Sporothrix* spp. provenientes de felinos (CEUA-UFG, MB34/24), em colaboração com o Prof. Dr. Thales Domingos Arantes (UFG), além de três cepas de referência (*Sporothrix schenckii* ATCC MYA 4821, *Sporothrix brasiliensis* ATCC MYA 4823 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019) (Borba-Santos et al., 2021; Carnero et al., 2024). As cepas foram mantidas no Laboratório de Ensaio Antimicrobianos em ágar Sabouraud dextrose a 30 °C, com subculturas quinzenais.

O inóculo em fase leveduriforme foi preparado após reversão das cepas, cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 35 °C por cinco dias. Colônias foram suspensas em solução salina 0,85% e ajustadas à turbidez padrão 0,5 McFarland ($\sim 1 \times 10^6$ a 5×10^6 UFC/mL), seguido de diluição em meio RPMI 1640 para testes.

Para a fase filamentosa, as cepas foram cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) a 28 °C por sete dias para induzir conídios. As suspensões contendo conídios e fragmentos de hifas foram filtradas, diluídas em RPMI 1640 (1:50), atingindo 4×10^3 a 5×10^4 UFC/mL, e distribuídas em placas de 96 poços. A quantificação do inóculo foi confirmada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em ágar Sabouraud com 2% de cloranfenicol, incubadas a 28 °C por até cinco dias.

2.2 Extração e caracterização química dos óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus*

As folhas de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus* foram coletadas no campus Central da UERN, com apoio da Prof^a Cynthia Cavalcanti Albuquerque. As amostras foram registradas no SISGEN (nº A624800). Cerca de 1.000 g de folhas frescas de cada espécie foram coletadas às 6h da manhã e submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Os óleos obtidos foram armazenados em frascos escuros, sob gelo, e transportados ao LEAN/CB, sendo mantidos a -10 °C até o uso. A caracterização química foi realizada no LISCO/IQ-UFRN por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), utilizando equipamento QP2020 (Shimadzu®).

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo, conforme os protocolos M38-A2 e M27-A3 do CLSI (2008), para fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. Os óleos essenciais foram previamente solubilizados (10 mg em 100 µL de DMSO e 900 µL de RPMI 1640) e diluídos em série em microplacas de 96 poços, com concentrações entre 5 mg/mL e 0,00975 mg/mL.

A cada poço das colunas 1 a 10 foram adicionados 100 µL do óleo diluído e 100 µL da suspensão fúngica. A coluna 11 foi utilizada como controle positivo (inóculo + DMSO + RPMI) e a coluna 12 como controle negativo (apenas meio RPMI). O itraconazol foi utilizado como antifúngico controle, em duplicata, com concentrações de 16 µg/mL a 0,0313 µg/mL.

Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 35 °C por 5 dias para leveduras e a 28 °C por 7 dias para fungos filamentosos. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico.

2.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após os ensaios de microdiluição em caldo e a determinação da CIM, foram transferidos 30 µL da suspensão dos poços com inibição visual completa do crescimento fúngico para placas de Petri. Para as cepas em fase filamentosa, utilizou-se ágar Sabouraud dextrose (ASD) suplementado com 2% de cloranfenicol; já para as cepas em fase leveduriforme, utilizou-se ágar Brain Heart Infusion (BHI), conforme descrito por Souza (2021). As placas com ASD foram incubadas a 28 °C por 7 dias e as com BHI, a 35 °C por 5 dias. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi considerada como a menor concentração do óleo

essencial capaz de impedir o crescimento do inóculo fúngico, indicando sua atividade fungicida.

2.5 Ensaios de Sinergismo de Drogas

Os testes de combinação entre os óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus*, e entre esses óleos e os antifúngicos Anfotericina B, Itraconazol e Terbinafina, foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, segundo o CLSI (2008), usando a técnica checkerboard para cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIF).

As substâncias foram diluídas em concentrações baseadas nas suas CIMs, aplicadas em placas de 96 poços, com incubação a 35 °C por 5 dias (leveduras) ou 28 °C por 7 dias (fungos filamentosos). Cada poço recebeu a suspensão fúngica e as combinações de drogas. A sinergia foi avaliada pelo índice FIC, com interpretações de sinergismo (<0,5), aditividade (0,5–1,0), indiferença (>1,0 e <4,0) e antagonismo (>4,0) (Barros et al., 2022; Souza, 2022b; Oliveira et al., 2023).

Resultados e Discussões

3.1 Obtenção do microrganismo, manutenção da cultura e preparo do inóculo fúngico

As cepas de *Sporothrix* spp. utilizadas neste estudo foram obtidas da Coleção de Cultura de Fungos Patogênicos da Fiocruz (RJ) e mantidas na forma filamentosa em ágar Sabouraud dextrose a 28 °C. Para assegurar a viabilidade e pureza das culturas, foram realizados repiques quinzenais conforme protocolo do CLSI (2008). Os inóculos fúngicos foram preparados a partir da conversão das cepas para fase leveduriforme em meio BHI a 35 °C, sendo padronizados em 0,5 na escala McFarland (1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL) para os ensaios com óleos essenciais.

No caso dos isolados mantidos em fase filamentosa, os conídios foram obtidos após crescimento em ágar batata dextrose (BDA) por no mínimo 7 dias, seguidos por raspagem, filtragem e padronização da densidade óptica (DO 0,9 a 1,1; transmitância 80–82%). A suspensão final foi diluída em meio RPMI 1640, atingindo concentração fúngica estimada entre 4×10^3 e 5×10^4 UFC/mL. A viabilidade do inóculo foi confirmada por contagem de colônias em ágar Sabouraud com cloranfenicol, incubadas a 28 °C por até 5 dias.

3.2 Extração e caracterização química dos óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus*

Os óleos essenciais de *Lippia grata* Schauer e *Croton blanchetianus* Baill. utilizados neste estudo foram extraídos a partir de aproximadamente 1000 g de folhas frescas, colhidas às 6h da manhã, por hidrodestilação utilizando o sistema de Clevenger. As plantas foram cultivadas no campus Central da UERN, com registro no SISGEN (nº A624800). Após a extração, os óleos foram acondicionados em frascos âmbar, armazenados sob refrigeração a -10 °C e transportados ao Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEAN/UFRN) para os testes biológicos.

O óleo essencial de *Lippia grata* apresentou rendimento de 2,45%. A análise química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) revelou quatro

monoterpenos majoritários: carvacrol (51,4%), timol (15,6%), p-cimeno (12,2%) e γ -terpineno (7,4%), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 -- Caracterização química do óleo essencial de *Lippia grata*.

Fonte: Sales, 2023.

A caracterização química do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill mediante cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) apresentou rendimento de 0,3% e revelou 18 fitoconstituintes presentes em sua composição (Quadro 1).

Majoritariamente, foram elucidados os compostos do grupo dos terpenos, que apresentaram as maiores concentrações, como, γ -Elemeno (18,46%), Espatulenol (11,62%), β -Cariofileno (10,79%), β -Gurjuneno (9,99%), Trans-calameneno (9,43%), β -Elemeno (6,3%) e α -Humuleno (5,78%).

Quadro 1 – Constituintes químicos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill.

Fonte: Colaboração da Profa. Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN).

3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Mediante os experimentos realizados, observou-se atividade inibitória do óleo essencial de *Lippia grata* Schauer em 100% dos isolados de *Sporothrix* spp. testados na forma filamentosa, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando na faixa de $\leq 48,82$ $\mu\text{g/mL}$ a 12.500 $\mu\text{g/mL}$, sendo que 89,4% das cepas mostraram sensibilidade à concentração de 781,25 $\mu\text{g/mL}$, tais resultados estão descritos na Tabela 1.

Esses resultados evidenciam a significativa atividade antifúngica do óleo essencial frente a diferentes grupos de fungos. Em estudos prévios, Sales (2023) demonstrou que o mesmo óleo essencial promoveu inibição total das cepas testadas de dermatófitos e *Candida albicans*, com CIM variando entre 48,82 $\mu\text{g/mL}$ e 390,62 $\mu\text{g/mL}$, e concentrações fungicidas mínimas (CFM) alcançando até 781,25 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, Souza (2023) relatou inibição em todas as 14 cepas de *Cryptococcus neoformans* testadas, com CIM entre 24 $\mu\text{g/mL}$ e 3.120 $\mu\text{g/mL}$, e CFM na mesma faixa, reforçando o amplo espectro de ação do óleo essencial de *Lippia grata* Schauer contra fungos patogênicos.

Tabela 2 –Concentrações inibitórias mínimas para os óleos essenciais e para o itraconazol

Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação ao óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill, visualizou-se uma atividade antifúngica frente 89,4% dos isolados confrontados na forma filamentosa nas concentrações propostas com a concentração de 6.250 $\mu\text{g/mL}$ inibindo 79% das cepas. Nessa mesma vertente, no estudo de Malveira et al. (2022), o óleo essencial de *Croton blanchetianus* demonstrou potencial antifúngico significativo contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, com CIM que sustentam uma inibição de 78% e 75%, respectivamente. Além da forte atividade antifúngica, o óleo apresentou capacidade de inibir a formação de biofilmes dessas espécies, reforçando sua eficácia.

Durante esta pesquisa, também evidenciou-se concentrações inibitórias mínimas elevadas para o itraconazol – um dos principais antifúngicos usados no tratamento da esporotricose – atingindo ou superando a concentração máxima testada em 63,15% das cepas testadas, com apenas seis cepas classificadas como selvagens conforme Espinel-Ingroff e colaboradores (2017). Por outro lado, as 12 cepas testadas até o momento para a terbinafina são classificadas como selvagens, com nove cepas com CIM de 0,007 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e três com CIM de 0,015 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esses achados são consistentes com a literatura atual, como no estudo realizado no Espírito Santo com 23 isolados felinos, no qual a terbinafina apresentou os menores valores de MIC (0,03–0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguida pelo itraconazol (0,03–4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cetoconazol (0,03–2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), reforçando o perfil de maior eficácia in vitro da terbinafina (Gonçalves, 2023).

3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Ensaios de Sinergismo de Drogas

As etapas experimentais para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e dos ensaios de sinergismo de drogas ainda não foram realizadas devido à priorização inicial da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), etapa fundamental para estabelecer a atividade antifúngica básica dos compostos testados. Essa abordagem escalonada é comum em estudos exploratórios, permitindo inicialmente a triagem de eficácia antes de avançar para análises mais complexas e detalhadas. Além disso, limitações temporais e logísticas, como a disponibilidade de equipamentos específicos e o planejamento da metodologia para os ensaios combinatórios, contribuíram para o adiamento dessas fases. A realização futura dessas etapas é essencial para complementar o perfil da bioatividade dos óleos essenciais, possibilitando a identificação da capacidade fungicida efetiva. Por outro lado, a possibilidade do aumento da atividade antifúngica, quando os óleos vegetais forem combinados com antimicrobianos convencionais, deve ser avaliado como uma estratégia terapêutica contra *Sporothrix* spp.

Essas etapas estão previstas para a segunda fase do projeto, com o objetivo de aprofundar a compreensão do potencial terapêutico dos óleos essenciais avaliados. A determinação da CFM permitirá diferenciar compostos com ação fungistática daqueles com real capacidade fungicida, informação essencial para decisões clínicas e desenvolvimento de novos fitofármacos. Já os ensaios de sinergismo, por sua vez, buscarão identificar possíveis interações positivas entre os óleos essenciais e antifúngicos de uso clínico, como o itraconazol e a terbinafina, ampliando as possibilidades de tratamentos mais eficazes e seguros, principalmente em casos de resistência ou toxicidade associada a monoterapias. Dessa forma, a execução dessas etapas em momento posterior se justifica tanto pela necessidade de um planejamento técnico mais detalhado quanto pela lógica metodológica de prosseguir de forma progressiva, com base nos dados gerados na primeira etapa experimental.

Conclusão

Os dados obtidos neste estudo reforçam o potencial antifúngico dos óleos essenciais de *Lippia grata* Schauer e *Croton blanchetianus* Baill frente a isolados clínicos de *Sporothrix* spp., especialmente na forma filamentosa. O óleo essencial de *L. grata* demonstrou atividade inibitória expressiva, inibindo 100% das cepas testadas, com alta sensibilidade à concentração de 781,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Já o óleo essencial de *C. blanchetianus* apresentou atividade

antifúngica em 89,4% dos isolados, com destaque para a concentração de 6.250 µg/mL, que foi capaz de inibir a maior porcentagem das cepas analisadas.

As etapas metodológicas ainda não realizadas, como a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e os ensaios de sinergismo com antifúngicos convencionais estão previstas para a segunda fase do projeto, após recente confirmação da renovação da proposta e do novo plano de trabalho. Tais análises serão fundamentais para elucidar os mecanismos de ação, identificar compostos ativos e propor combinações terapêuticas mais eficazes e seguras, especialmente frente a casos de resistência fúngica.

Dessa forma, os achados obtidos validam a continuidade da investigação e evidenciam a importância da bioprospecção de produtos naturais como fonte promissora de novos agentes antifúngicos. Embora os estudos específicos envolvendo esses óleos e *Sporothrix* spp. ainda sejam escassos, os resultados aqui apresentados, somados a evidências da literatura com outros fungos, indicam o potencial terapêutico de *L. grata* e *C. blanchetianus* no desenvolvimento de estratégias complementares para o controle da esporotricose. Este estudo, portanto, contribui para preencher uma lacuna relevante e reforça a necessidade de ampliar as pesquisas com fitocompostos aplicados à micologia clínica.

Referências

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Nota Técnica nº 60/2023. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2023/nota-tecnica-no-60-2023-cgzv-dedt-svsa-ms>. Acesso em: 28 nov 2023.

BRASILEIRO, M. M. O POTENCIAL BIOLÓGICO ANTIMICROBIANO DA *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Rebouças e Tecnologias*, [S. l.], v. 1, n. 1, 2022.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, U.S. Department of Health & Human Services. *Sporothrix brasiliensis*. Revisado em 06 de abril de 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/port/sporotrichosis/brasiliensis.html>.

CRISEO, Giuseppe; ZUNGRI, Domenico; ROMEO, Orazio. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 46, n. 11, p. 3930–3932, 1 nov. 2008.

DE MATOS, Caroline Bohnen; SILVA, Izabela Cristina; SILVA, Marina Nunes da; DIAS, Ana Beatriz; MAIA, Daniela Cláudia Figueiredo. *Origanum vulgare* essential oil in the treatment of skin experimental sporotrichosis. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 6, p. e0212641860, 2023.

DUARTE, Tallita Lougon; CARVALHO, Gabriel Domingos. Esporotricose no contexto da saúde única. In: II CONGRESSO BRASILEIRO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA. 2021.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 10, out. 2017.

GONÇALVES, S. S. et al. Human and feline sporotrichosis in a reference center of southeastern Brazil: genetic differentiation, diversity, and antifungal susceptibility of *Sporothrix* species. *Journal of Fungi (Basel)*, Basel, v. 9, n. 8, p. 831, 07 ago. 2023. DOI: 10.3390/jof9080831.

MALVEIRA, Ellen A. et al. Óleo essencial de folhas de *Croton blanchetianus*: Potencial anticandidal e mecanismos de ação. *Revista de Fungos*, v. 8, n. 11, pág. 1147, 2022.

MALVEIRA, S. M. C. et al. Evaluation of antifungal and antibiofilm activity of *Croton blanchetianus* essential oil against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Antibiotics*, Basel, v. 11, n. 12, p. 1757, 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11121757.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia* 185, n. 5, 813–842 (2020).

SILVA, T. da G.; MACHADO, T. C.; MENDES JUNIOR, A. F. Impact of the zoonotic potential of feline sporotrichosis on veterinary medicine and society: Literature review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 12, n. 7, p. e9612742545, 2023.

SALES, Fábio do Nascimento. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia grata* Schauer frente *Candida albicans* e dermatófitos. 2023. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

SOUZA, Ana Beatriz de. Potencial antifúngico do óleo essencial proveniente da *Lippia grata* Schauer frente a isolados clínicos do complexo *Cryptococcus neoformans*. 2023. 55 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

SOUZA, Ana Valéria Vieira de et al. Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos. *Revista Fitos*, v. 16, Supl. 2, p. 212-226, 2022.

ULTÉE, A. et al. Mechanisms of action of carvacrol and thymol on ergosterol biosynthesis and membrane integrity in *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 2007.

VALERIANO, Carlos Alberto Tiburcio. Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica e antifúngica. 2021. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

WALLER, Stefanie Bressan. Uso promissor do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum majorana* L. na esporotricose cutânea experimental por *Sporothrix brasiliensis* resistente ao itraconazol, e susceptibilidade de isolados aos óleos vegetais. 2019. 140f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Anexos

Tabela 1 - Caracterização química do óleo essencial de *Lippia grata*.

Quadro 1 – Constituintes químicos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill.

Tabela 2 – Concentrações inibitórias mínimas para os óleos essenciais e para o itraconazol

CÓDIGO: SB0257

AUTOR: SAVIO LAIR CAVALCANTE SILVEIRA

COAUTOR: HENRIQUE DOUGLAS DOS SANTOS BORBUREMA

ORIENTADOR: ELIANE MARINHO SORIANO

TÍTULO: Uso de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta) como biofiltro em sistema de aquicultura multitrófica integrada com *Penaeus vannamei* sob condições de mudanças climáticas

Resumo

A intensificação da carcinicultura no Brasil tem levantado preocupações quanto aos seus impactos ambientais, sobretudo pela liberação de efluentes ricos em nutrientes. O cultivo de algas em sistemas de aquicultura multitrófica integrada (IMTA) representa uma alternativa sustentável para reduzir os nutrientes na água dos cultivos de camarões. Assim, este estudo objetivou avaliar o desempenho da macroalga *Gracilaria birdiae* como biofiltro em cultivos experimentais do camarão *Penaeus vannamei* sob diferentes condições de temperatura, tendo em vista a circunstância atual de mudança climática. O experimento foi realizado em sistemas com recirculação de água (RAS), com tanques mantidos sob temperatura ambiente (~28°C) e com aumento de temperatura de acordo com as projeções do IPCC (~32°C). Foram monitorados parâmetros ambientais e fisiológicos para análise do potencial da macroalga na remoção de nutrientes. Os resultados indicaram que *G. birdiae* apresentou melhor desempenho fotossintetizante e maior crescimento sob temperatura ambiente, e contribuiu para a remoção de nutrientes nitrogenados e fosfatados em ambas as temperaturas. Já os camarões apresentaram um crescimento similar entre os tratamentos, demonstrando a resistência da espécie ao aquecimento. Nossos dados indicam o papel de *G. birdiae* como recurso estratégico para promover maior sustentabilidade na carcinicultura. Nossos resultados também ressaltam a necessidade de enfrentamento das mudanças climáticas.

Palavras-chave: Biofiltro; Camarão; IMTA; Macroalga; RAS; Sustentabilidade.

TITLE: Use of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta) as a biofilter in integrated multi-trophic aquaculture with *Penaeus vannamei* under climate change conditions

Abstract

The intensification of shrimp farming in Brazil has raised concerns about its environmental impacts, particularly due to the release of nutrient-rich effluents. Seaweed cultivation in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) systems represents a sustainable alternative for reducing nutrients in shrimp farming water. Thus, this study aimed to evaluate the performance of the macroalga *Gracilaria birdiae* as a biofilter in experimental cultivation of the shrimp *Penaeus vannamei* under different temperature conditions, considering the current climate change situation. The experiment was conducted in recirculating aquaculture systems (RAS), with tanks maintained at ambient temperature (~28°C) and with temperatures increased according to IPCC projections (~32°C). Environmental and physiological

parameters were monitored to analyze the seaweed's potential for nutrient removal. The results indicated that *G. birdiae* exhibited better photosynthetic performance and greater growth at ambient temperature, contributing to the removal of nitrogen and phosphate nutrients at both temperatures. Shrimp growth rates were similar between treatments, demonstrating the species' resilience to warming. Our data indicate the role of *G. birdiae* as a strategic resource for promoting greater sustainability in shrimp farming. Our results also highlight the need to address climate change.

Keywords: Biofilter; IMTA; RAS; Seaweed; Shrimp; Sustainability.

Introdução

A aquicultura tem se consolidado como uma das atividades alimentícias de crescimento mais acelerado nas últimas décadas, representando uma importante fonte de produto animal para populações em todo o mundo (FAO, 2018). No Brasil, a carcinicultura ocupa uma posição de destaque na aquicultura, sendo reconhecida como uma das atividades produtivas mais importantes (Marinho-Soriano et al., 2002; Carneiro et al., 2021). A região Nordeste, especialmente o estado do Rio Grande do Norte, se destaca entre os principais estados produtores de camarão, com a espécie *Penaeus vannamei* sendo a mais cultivada e comercializada (Ximenes e Vidal, 2023). Contudo, a expansão acelerada dessa atividade tem gerado preocupações significativas em relação à sustentabilidade ambiental. O aumento da criação de camarões em sistemas de cultivo localizados próximos a estuários e manguezais tem levado ao descarte inadequado de efluentes ricos em matéria orgânica e nutrientes diretamente nos corpos d'água próximos aos cultivos (Marinho-Soriano, 2007; Carneiro et al., 2021). Essa emissão de resíduos pode causar sérios danos ambientais, como por exemplo a eutrofização, que resulta no empobrecimento do oxigênio na água e proliferação de organismos anaeróbicos, afetando tanto a qualidade da água quanto a biodiversidade local (Figueirêdo et al., 2006).

O impacto ambiental causado pela carcinicultura tem gerado uma demanda por soluções que possam mitigar esses efeitos negativos e que ao mesmo tempo não comprometa a produtividade do setor. Uma das alternativas analisadas é a utilização de aquicultura multitrófica integrada (integrated multi-trophic aquaculture – IMTA), que integra o cultivo de organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos, como camarões e algas, para promover a melhoria da qualidade da água pela absorção realizada pelas algas dos resíduos metabólicos gerados pelos camarões cultivados (Arumugam et al., 2018). Adicionalmente, há um aumento da produção de macroalgas marinhas globalmente, pois elas apresentam importância econômica devido ao seu uso para a extração de compostos bioativos, como o ágar, utilizado em diversos setores industriais, como farmacêutico, alimentício e biotecnológico (FAO, 2022).

Diversos estudos têm demonstrado que as macroalgas marinhas da família Gracilariaceae são particularmente eficientes como biofiltros em IMTA, contribuindo para a redução da poluição e a melhoria da qualidade da água em sistemas de cultivo de camarões (e.g., Marinho-Soriano et al., 2002; 2007; 2009; Carneiro et al., 2021). No Brasil, diversas espécies do gênero *Gracilaria* são encontradas na região Nordeste, e dentre elas, *G. birdiae* é coletada e/ou esporadicamente cultivada no mar para a produção de ágar (Marinho-Soriano, 2017). Assim, o cultivo integrado de *Gracilaria birdiae* com camarões figura como uma estratégia

promissora para a biorremediação e para a geração de renda adicional para os produtores de camarão. Entretanto, os efeitos do aumento de temperatura sobre a capacidade de biorremediação de *G. birdiae* em cultivos de camarão são ainda desconhecidos, o que representa uma lacuna importante no conhecimento tendo em vista as mudanças climáticas em curso (IPCC, 2023). Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de *G. birdiae* em dois sistemas de cultivo multitrófico integrado com camarão (*Penaeus vannamei*), um sob temperatura ambiente e o outro com aumento de temperatura de acordo com as projeções mais recentes do IPCC, analisando o crescimento das espécies cultivadas e a capacidade das macroalgas para absorver nitrogênio e fósforo sob as diferentes condições de temperatura.

Metodologia

Material

biológico

Gracilaria birdiae foi coletada em bancos naturais próximos ao Departamento de Oceanografia e Limnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DOL-UFRN), na praia de Mãe Luiza, em outubro de 2024. Após a coleta, as macroalgas foram transportadas para o laboratório de macroalgas marinhas localizado no DOL-UFRN. No laboratório, as macroalgas foram triadas para a remoção de sedimentos, indivíduos da macrofauna, epífitas e macroalgas férteis (ou seja, gametófitos com cistocarpos proeminentes). As macroalgas ficaram em aclimatação no laboratório por seis semanas em aquários de vidro transparente com aeração constante e trocas de água feitas semanalmente.

Camarões adultos da espécie *Penaeus vannamei* foram doados pela PRIMAR Aquaculture. Os camarões foram mantidos no Centro de Tecnologia em Aquicultura do DOL-UFRN em tanques contendo 500 L de água do mar, a qual era substituída diariamente em cerca de 80%, enquanto o fundo dos tanques era limpo por sifonagem. Os camarões foram mantidos sob aeração constante e alimentados duas vezes ao dia a uma taxa de 5% do peso corporal (Carneiro et al., 2021) com ração comercial (Camanutri 35 J, ADM®). Camarões (n = 5) eram pesados semanalmente para ajuste da quantidade de ração oferecida. Os camarões permaneceram nessas condições por três semanas como um período de aclimatação.

Desenho

experimental

O experimento foi executado no Centro de Tecnologia em Aquicultura do DOL-UFRN. Os sistemas de cultivo multitrófico consistiram em dois tanques de 500 L onde foram cultivados os camarões (45 indivíduos/m²). Duas temperaturas foram estabelecidas no experimento, sendo uma em cada tanque (28°C – temperatura ambiente – e 32°C – cenário de aquecimento do IPCC). Um tanque de decantação de 80 L foi utilizado para cada tanque de cultivo de camarões. Esses tanques recebiam a água do cultivo através de canos de PVC por fluxo gravitacional. Três tanques de 100 L para cultivar as macroalgas (1 g/L) eram conectados aos tanques de decantação por canos de PVC. Outro encanamento conectava os tanques das macroalgas à tanques coletores de 60 L, que tinham a função de armazenar a água e reintroduzi-la ao cultivo de camarões através de bombeamento hidráulico, reiniciando o ciclo. Dessa forma, o fluxo gravitacional da água se estabelecia a partir dos tanques de camarões para os tanques de decantação, e em seguida para os tanques de cultivo das macroalgas. A água era coletada nos tanques coletores e reintroduzida nos cultivos dos camarões pela

bomba hidráulica (Fig. 1). Ao iniciar o experimento, as macroalgas foram colocadas nos tanques e mantidas sob o sistema de recirculação de água (recirculating aquaculture system – RAS) e, portanto, nenhuma troca de água foi feita por quatro semanas. Paralelo à cada RAS (i.e., RAS-ambiente e RAS-aquecido), outros três tanques de 100 L com água do mar parcialmente substituída a cada dois dias e sem adição de nutrientes foram usados como controle, um sob temperatura ambiente (Controle-ambiente) e o outro com aumento de temperatura (Controle-aquecido). Todos os compartimentos experimentais foram aerados, exceto os tanques de decantação.

Variáveis

ambientais

As variáveis ambientais: temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram medidas diariamente duas vezes ao dia (9h e 15h30) utilizando uma sonda multiparâmetros (AK88v2, AKSO). Para a análise de nutrientes dissolvidos na água (nitrato, nitrito, íon amônio e ortofosfato) foram realizadas coletas de água (100 ml) de cada compartimento experimental a cada dois dias. As análises de nutrientes foram realizadas seguindo os métodos descritos em Grasshoff et al. (1999).

Variáveis

biológicas

Camarões

Camarões ($n = 5$) eram pesados semanalmente em uma balança analítica para obtenção de dados de biomassa/peso úmido. As taxas de crescimento relativo dos camarões (TCR: %/dia) foram calculadas aplicando a fórmula proposta por Marinho-Soriano et al. (2009). No final do experimento, os camarões foram contabilizados para estimar a taxa de sobrevivência.

Macroalgas

As macroalgas foram semanalmente pesadas para a obtenção dos valores de biomassa. As macroalgas foram pesadas em balança analítica após remoção do excesso de água utilizando uma centrífuga manual. As taxas de crescimento relativo (TCR: %/dia) foram estimadas utilizando a equação recomendada por Yong et al. (2013). Além do crescimento, o desempenho fotossintetizante ($\Delta F/F_m'$) das macroalgas era semanalmente mensurado utilizando um fluorômetro do tipo Diving-PAM. Após a pesagem semanal e reajuste da biomassa algal para os valores iniciais (1 g/L), amostras das algas foram congeladas e depois liofilizadas para análises de nitrogênio (em CHNS) e fósforo (Grasshoff, 1976) nos tecidos algais.

Análise dos dados

As variáveis ambientais: temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, e concentrações de nutrientes foram comparadas entre tratamentos aplicando análises de variância (ANOVA) unifatorial (one-way ANOVA). As variáveis bióticas: conteúdo de N e P também foram comparadas entre tratamentos aplicando one-way ANOVA. A taxa de crescimento (TCR) das macroalgas e dos camarões foi comparada entre tratamentos e semanas aplicando ANOVA bifatorial (two-way ANOVA) para medidas repetidas. As premissas de normalidade e homoscedasticidade foram testadas antes de realizar as ANOVAs aplicando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste post-hoc utilizado quando diferenças significativas foram reveladas pelas ANOVAs foi o teste de Tukey. Todas as análises

estatísticas foram realizadas no software R (versão 4.4.0) e o valor de significância (α) adotado foi 0,05.

Resultados e Discussões

Variáveis ambientais

Nesse estudo foi possível obter resultados a partir da análise dos parâmetros avaliados, os quais estão apresentados na Tabela 1 e figuras ao longo desta seção. Os dados foram organizados de modo que permita a descrição dos principais padrões observados. Inicialmente, estão expostos os resultados referentes às variáveis ambientais, seguidos pelas respostas fisiológicas dos camarões e das macroalgas.

A temperatura da água diferiu significativamente entre os tratamentos sob temperatura ambiente (RAS-ambiente e Controle-ambiente) e aquecidos (RAS-aquecido e Controle-aquecido) (Tabela 1). O teor de salinidade nos cultivos de macroalgas divergiu entre os tratamentos, tendo os tratamentos aquecidos (RAS-aquecido e Controle-aquecido) apresentado maiores valores (Tabela 1). Em relação ao pH, os tratamentos que apresentaram maiores valores foram os tratamentos controle, com o Controle-ambiente tendo os mais elevados (Tabela 1). Para os tratamentos com sistema de recirculação (RAS-aquecido e RAS-ambiente), o pH do RAS-ambiente foi mais elevado. A concentração de oxigênio dissolvido na água foi maior em ambos os tratamentos controle (Tabela 1). No que tange às concentrações de nutrientes, foi observado que os maiores valores foram atingidos nos tratamentos RAS em relação aos controles, e que as concentrações mais elevadas de nitrato e nitrito ocorreram no RAS-aquecido (Tabela 1), enquanto que as maiores concentrações de íon amônio e ortofosfato foram observadas no RAS-ambiente.

Variáveis biológicas

Camarões

Os camarões apresentaram uma sobrevivência de 100% em ambos os tratamentos, RAS-ambiente e RAS-aquecido. No RAS-ambiente, a TCR média variou de 0,25%/dia (semana 4) a 3,24%/dia (semana 1), enquanto que no RAS-aquecido, ela variou de 0,31%/dia (semana 4) a 1,97%/dia (semana 1) (Fig. 2). O resultado da ANOVA revelou que o crescimento dos camarões não diferiu significativamente entre tratamentos ao longo das semanas ($F = 1,41$, $p = 0,25$). O crescimento resultou em um ganho significativo de biomassa ao longo das semanas em ambos os tratamentos ($F = 35,9$, $p < 0,001$), e o peso dos camarões não diferiu significativamente entre tratamentos ao longo das semanas ($F = 1,10$, $p = 0,36$).

Macroalgas

Os resultados da TCR de *G. birdiae* estão apresentados na Figura 3. Durante a primeira semana do experimento, as macroalgas cultivadas nos tratamentos RAS-ambiente e Controle-ambiente apresentaram os maiores valores de TCR, enquanto que os menores valores foram registrados nos tratamentos RAS-aquecido e Controle-aquecido (Fig. 3). Ao longo das semanas seguintes, somente as macroalgas cultivadas no Controle-ambiente exibiram uma TCR maior do que 0,5%/dia (Fig. 3). A partir da segunda semana, *G. birdiae* cultivada no RAS-aquecido não apresentou crescimento. Ao final do experimento, TCRs de *G. birdiae* foram registradas apenas nos tratamentos RAS-ambiente e Controle-ambiente, sendo maiores no Controle-ambiente (Fig. 3).

Os resultados do desempenho fotossintetizante de *G. birdiae* estão apresentados na Figura 4. Para os tratamentos controle, os valores de $\Delta F/F_m'$ se mantiveram estatisticamente similares durante o experimento, exceto na última semana, na qual, *G. birdiae* do Controle-aquecido diminuiu significativamente seu $\Delta F/F_m'$ (Fig. 4). Já em relação ao tratamento com recirculação de água, a partir da primeira semana, *G. birdiae* do RAS-aquecido já apresentou valores mais baixos de $\Delta F/F_m'$, que se mantiveram com a tendência de declínio ao longo de todo o experimento, chegando aos menores valores no final do experimento (Fig. 4).

Os maiores conteúdos de N e P foram registrados em *G. birdiae* cultivada nos tratamentos RAS. Os espécimes do RAS-ambiente apresentaram um conteúdo de nitrogênio ~2,3 vezes maior em relação aos espécimes cultivados no Controle-ambiente (Tabela 1), enquanto que o aumento de N nos espécimes cultivados no RAS-aquecido foi de 1,4 vezes em relação ao Controle-aquecido (Tabela 1). O conteúdo de P nas macroalgas do RAS-ambiente e RAS-aquecido foi 2,25 vezes maior em relação às macroalgas do Controle-ambiente e Controle-aquecido, respectivamente (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A partir desse estudo foi possível elucidar a capacidade de *G. birdiae* como biofiltro em sistemas de aquicultura multitrófica integrada com camarão para mitigação dos nutrientes produzidos nos cultivos dos camarões. Contudo, a tolerância térmica de *G. birdiae* não é tão abrangente como em outros indivíduos da família Gracilariaceae (Borburema et al., 2025). Portanto, nos tratamentos aquecidos foi demonstrado os prováveis efeitos negativos que a mudança climática exercerá sobre *G. birdiae* em sistemas de cultivo multitrófico. O mesmo impacto não seria sentido pelo camarão *Penaeus vannamei*, tendo em vista a taxa de sobrevivência dos indivíduos em 100% no RAS-aquecido e no RAS-ambiente, e o fato da produtividade dos camarões (crescimento e ganho de biomassa) não ter diferido entre os tratamentos. Desta maneira, evidenciamos a resiliência e a resistência da espécie às condições estressantes de temperatura e salinidade do RAS-aquecido (Tabela 1). Tais resultados já eram esperados, uma vez que o camarão branco *P. vannamei* é euri-térmico e eurialino (Giffard-Mena et al., 2024), o que possibilita o sucesso de seu cultivo em diferentes regiões da Terra (FAO, 2024).

Os baixos valores de rendimento quântico efetivo de *G. birdiae* no tratamento RAS-aquecido se dão pela relação intrínseca entre atividade fotossintetizante e temperatura da água (Fig. 4). As algas necessitam de condições de temperatura favoráveis para efetuar seus mecanismos fisiológicos, como a fotossíntese, que por sua vez, auxilia na produção de biomassa (Lobban e Harrison, 1997). Assim, ao enfrentar condições estressantes que inviabilizam a atividade fotossintetizante, todas as outras funções são comprometidas, refletindo no crescimento. Em decorrência de altos valores de temperatura, a salinidade aumenta devido à evaporação, demonstrando ser mais uma consequência ambiental que ocorreria num cenário futuro de mudança climática, a qual certamente será um fator de estresse adicional para o desempenho de *G. birdiae* em sistemas de cultivo multitrófico.

No Brasil, áreas do litoral da região nordeste são as mais favoráveis para o cultivo e exploração de *Gracilaria* (Barbosa-Silva et al., 2023). O interesse pelo gênero *Gracilaria* se dá pelo seu valor econômico, tendo em vista o seu uso como matéria prima para a extração do ágar. Mas para além disso, essas algas podem se tornar alvo de outros setores produtivos, tendo em vista sua capacidade biofiltradora para a absorção de nutrientes nitrogenados e fosfatados dissolvidos na água, resultando no armazenado de N e P em seus tecidos (Tabela 1). *Gracilaria birdiae* sendo cultivada em sistemas de IMTA, se torna uma estratégia que oferece vantagens competitivas ao setor aquícola brasileiro ao reduzir impactos ambientais e agregar valor com a produção de macroalgas. Além do uso comum das macroalgas para a extração de ágar, elas podem ser utilizadas para a produção de fertilizantes orgânicos, tendo em vista o alto teor de N e P em sua biomassa a partir de sua atividade de biofiltração nos sistemas de cultivo integrado.

Apesar dos resultados positivos, algumas limitações devem ser consideradas. O experimento foi conduzido durante um período de quatro semanas e não considerou variações sazonais, o que pode não refletir totalmente a complexidade de sistemas de cultivo comerciais. Além disso, a interação com outros organismos filtradores que podem ser associados aos sistemas de cultivo, como moluscos bivalves, não foi abordada e merece investigação em estudos futuros. Dessa forma, nesse trabalho conseguimos confirmar a eficiência de *G. birdiae* como biofiltro em aquicultura multitrófica integrada com camarão, mas também ressaltar a necessidade de aprofundar pesquisas que considerem diferentes escalas temporais e espaciais, além de adicionar aos sistemas de cultivo outros organismos filtradores de interesse econômico, a exemplo de ostras, que também podem auxiliar na melhoria da qualidade da água. Com isso, será possível consolidar modelos de produção resilientes às mudanças climáticas e ambientalmente sustentáveis, capazes de fortalecer a carcinicultura brasileira contra os desafios do futuro.

Conclusão

Nesse estudo foi possível demonstrar que a macroalga *G. birdiae* possui um potencial significativo como biorremediadora de poluição aquática em sistemas de aquicultura multitrófica integrada com camarões da espécie *Penaeus vannamei*. Os resultados evidenciaram que a macroalga obteve melhor desempenho em condições de temperatura ambiente, apresentando maior capacidade fotossintetizante e maiores taxas de crescimento

relativo, enquanto que os tratamentos aquecidos afetaram negativamente o desempenho da macroalga. Ainda assim, verificou-se que *G. birdiae* contribuiu para a redução de nutrientes dissolvidos nas duas condições de temperatura, acumulando nitrogênio e fósforo em sua biomassa, reforçando sua relevância na mitigação de impactos ambientais decorrentes da produção de camarões. Dessa forma, a integração de *G. birdiae* à carcinicultura representa uma alternativa promissora para conciliar produção aquícola com sustentabilidade ambiental e econômica. Nossos dados também revelaram a necessidade de enfrentamento das mudanças climáticas, como a produtividade da macroalga foi negativamente afetada pelo aumento de temperatura. Estudos futuros de maior escala (preferencialmente em fazendas de camarão), considerando também variações sazonais, poderão ampliar a compreensão acerca da eficiência dessa espécie em sistemas de cultivo multitrófico, contribuindo para avanços nas práticas sustentáveis no setor aquícola brasileiro.

Referências

- Arumugam N, Chelliapan S, Kamyab H, Thirugnana S, Othman N, Nasri NS (2018) Treatment of wastewater using seaweed: a review. *Int J Environ Res Public Health* 15:2851.
- Barbosa-Silva MS, Borburema HDS, Fernandes FO, et al (2023) Projecting environmental suitability areas for the seaweed *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta) in Brazil: Implications for the aquaculture under climate change. *J Appl Phycol* 35:773-784.
- Borburema HDS, Almeida-Faria G, Silveira SLC, et al (2025) Agarophyte seaweeds exhibit differential responses to marine heatwaves depending on the species and climatic season. *J Appl Phycol* 37:1479–1491.
- Carneiro MAA, Resende JFJ, Oliveira SR, et al (2021) Performance of the agarophyte *Gracilariopsis tenuifrons* in a multi-trophic aquaculture system with *Litopenaeus vannamei* using water recirculation. *J Appl Phycol* 33:481–490.
- FAO (2018) The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome.
- FAO (2022) The State of World Fisheries and Aquaculture 2022 – Towards Blue Transformation. Rome.
- FAO (2024) The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action, Nature and Resources. Rome.
- Figueirêdo MCB, Araújo LFP, Rosa MF, et al (2006) Impactos ambientais da carcinicultura de águas interiores. *Eng Sanit Ambient* 11:231–240.
- Giffard-Mena I, Ponce-Rivas E, Sigala-Andrade HM, Uranga-Solís C, Re AD, Díaz F, Camacho-Jiménez L (2024). Evaluation of the osmoregulatory capacity and three stress biomarkers in white shrimp *Penaeus vannamei* exposed to different temperature and salinity conditions: Na⁺/K⁺ ATPase, Heat Shock Proteins (HSP), and Crustacean Hyperglycemic Hormones (CHHs). *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* 271:110942.
- Grasshoff K (1976) Methods of seawater analysis. 1ª Edição. Verlag Chemie, Weinheim.

Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M (1999) Methods of seawater analysis, 3ª Edição. Wiley-VCH.

IPCC (2023) Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 184 pp.

Lobban CS, Harrison PJ (1997) Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, New York.

Marinho-Soriano E (2007) Seaweed biofilters: an environmentally friendly solution. World Aquac 38:31–33.

Marinho-Soriano E (2017) Historical context of commercial exploitation of seaweeds in Brazil. J Appl Phycol 29:665–67

Marinho-Soriano E, Morales C, Moreira WSC (2002) Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil. Aquac Res 33:1081–1086.

Marinho-Soriano E, Panucci RA, Carneiro MAA, Pereira DC (2009) Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. Bioresour Technol 100:6192–6198.

Ximenes LF, Vidal MF (2023) Carcinicultura. Cad. Setorial ETENE 8, 1–12.

Yong YS, Yong WTL, Anton A (2013) Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. J Appl Phycol 25:1831–1834.

Anexos

Figura 1.

Figura 2.

Figura 3.

Figura 4.

Tabela 1.

CÓDIGO: SB0265

AUTOR: LUÍS FELIPE COSTA GATIS

ORIENTADOR: KATIA CASTANHO SCORTECCI

TÍTULO: Avaliação do desenvolvimento morfológico de plantas de *Salvia hispanica* submetidas ao clinostato 2D por quatro e oito horas.

Resumo

O interesse humano pelo espaço impulsiona investigações sobre os efeitos da microgravidade em organismos vivos. Dentre os modelos biológicos, as plantas destacam-se pela produção de metabólitos com potencial farmacológico e por contribuírem à saúde de tripulantes em missões espaciais. Este estudo teve como objetivo analisar alterações morfológicas e histológicas em *Salvia hispanica* submetida à microgravidade simulada em clinostato 2D. Os tratamentos consistiram em exposições de quatro e oito horas, a 35 e 50 rpm, com grupo controle sem rotação. A avaliação morfológica foi realizada por quatro semanas; na quinta, amostras foram coletadas para análise histológica. Nos grupos de quatro horas, observou-se redução significativa na distância entre nós (DN), no diâmetro do caule (DC) e no diâmetro foliar (DF) nas três primeiras semanas. Nos de oito horas, houve diminuição de DF, DC, comprimento foliar (CF) e número de gemas axilares (GA), além de aumento de DN na terceira e quarta semana. A análise histológica indicou alterações na estrutura e organização dos tecidos de xilema, floema e medula em todas as condições. Conclui-se que a microgravidade simulada induz modificações estruturais em *S. hispanica*, destacando seu valor como modelo vegetal para estudos de respostas adaptativas e aplicações terapêuticas em ambientes espaciais.

Palavras-chave: Chia, morfologia, histologia, desenvolvimento, microgravidade simulada

TITLE: Evaluation of the morphological development of *Salvia hispanica* plants subjected to the 2D clinostat for four and eight hours.

Abstract

Human interest in space has driven investigations into the effects of microgravity on living organisms. Among biological models, plants stand out due to their production of metabolites with pharmacological potential and their contribution to the physical and psychological health of crew members on space missions. This study aimed to analyze morphological and histological changes in *Salvia hispanica* subjected to simulated microgravity using a 2D clinostat. Treatments consisted of four- and eight-hour exposures at 35 and 50 rpm, with a control group not subjected to rotation. Morphological evaluation was conducted over four weeks, and in the fifth week, samples were collected for histological analysis. In the four-hour groups, a significant reduction was observed in internode distance (ID), stem diameter (SD), and leaf

diameter (LD) during the first three weeks. In the eight-hour groups, reductions in LD, SD, leaf length (LL), and number of axillary buds (AB) were found, as well as an increase in ID in the third and fourth weeks. Histological analysis revealed changes in the structure and organization of xylem, phloem, and pith tissues under all experimental conditions. It is concluded that simulated microgravity induces structural modifications in *S. hispanica*, highlighting its relevance as a plant model for studies on adaptive responses and potential therapeutic applications in space environments.

Keywords: Chia, morphology, histology, development, and simulated microgravity.

Introdução

Na década de 40, a NASA realizou o primeiro envio de plantas ao espaço com a finalidade de avaliar os efeitos da mudança de gravidade nesses organismos (Böhmer et al., 2019). Entretanto, hipóteses de que as plantas poderiam responder a este estímulo foram elaboradas desde 1880 por Charles Darwin (Baluska et al., 2009). Atualmente, com o aumento do interesse pela exploração espacial, houve um aumento nos estudos de como as plantas respondem a variação da gravidade (NASA, 2023).

A quase ausência de força gravitacional é denominada de microgravidade. Este fenômeno é estudado de maneira mais prolongada em estações espaciais, como na estação espacial internacional (ISS), mas também pode ser observado em voos parabólicos e na torre de queda livre pela diminuição da sensação de peso durante a queda livre em ambas as situações (Baba et al., 2022). Nesse ambiente já foi verificado que pode haver mudanças genéticas e metabólicas nos organismos, porém o custo para realizar experimentos em ambiente de microgravidade real se torna muito alto tendo em vista a infraestrutura necessária para reproduzi-la em ambiente terrestre ou enviar amostras ao espaço (Baba et al., 2022; Böhmer et al., 2019).

Contudo, cientistas desenvolveram um aparato capaz de simular a microgravidade em laboratório, chamado clinostato. Ao rotacionar a amostra, a média dos vetores das forças exercidas sobre ela ocasionam na percepção alterada da gravidade (Baba et al., 2022). Sendo assim, este equipamento pode ser capaz de mudar a posição dos estatólitos, os quais são estruturas compostas por amido presentes nas células vegetais, ou alterar as forças de tensão do citoesqueleto das células ocasionando, em ambos os casos, uma cascata de sinalização mediada por íons cálcio (Ca^{2+}) capaz de promover mudanças no padrão de crescimento e na composição bioquímica das plantas para que haja uma adaptação a microgravidade simulada (Farooq et al., 2024; Gardiner, 2021; Lopez et al., 2014).

Pesquisadores verificaram que, em ambiente de microgravidade real, o transporte do hormônio auxina pode ser drasticamente diminuído, e que a sua distribuição assimétrica pode levar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem ser responsáveis pela curvatura das raízes nesse ambiente (Joo et al., 2001; Su et al., 2023). Em microgravidade simulada, pesquisas verificaram não só alterações das raízes de plantas submetidas a diferentes rotações, mas também alterações nos caules das plantas e na coloração das folhas. Esses resultados sugerem que, tanto a microgravidade real quanto a simulada podem ter promovido

alterações em relação ao transporte do hormônio auxina, sua distribuição na planta e em relação ao padrão bioquímico da planta (Nakamura et al., 1999; Paolicchi et al., 2002; Santos, 2022).

Com base no que foi exposto acima, nosso grupo busca verificar as alterações que a microgravidade pode causar em plantas com potencial farmacológico. Dentre as plantas já estudadas, a *Salvia hispanica* (mais conhecida como chia) se apresentou como uma boa candidata aos estudos em microgravidade simulada pela alta quantidade de compostos fenólicos e flavonoides, alta capacidade quelante de metais e pelas atividades larvicidas e antiproliferativas observadas em seus extratos (Ribeiro, 2019).

Dessa forma, esse estudo tem como foco de pesquisa a submissão da *Salvia hispanica* em clinostato 2D para simular o ambiente de microgravidade, e busca iniciar as observações de alterações morfológicas e histológicas que podem ocorrer em tratamento durante quatro e oito horas, e em rotações de 35 e 50 rpm.

Metodologia

Cultivo

200 sementes de *Salvia hispanica* compradas no mercado da marca Jasmine, foram cultivadas em sala de crescimento, com fotoperíodo e temperatura controlados em 12 horas e 26 ± 2 °C respectivamente. O substrato utilizado foi composto por terra vegetal e vermiculita na proporção de 4:3. Antes da semeadura, o solo foi descontaminado em autoclave por 30 minutos. As sementes foram distribuídas em copos plásticos de 300 mL, previamente perfurados, e dispostos em bandejas, permitindo a absorção de água por capilaridade.

Submissão a microgravidade simulada

As plantas contendo três semanas de vida, após a germinação, ou aproximadamente 10 centímetros de comprimento (figura 1) foram divididas em grupos de 33 (sendo 33 do grupo de 35 rpm e 33 do grupo de 50 rpm) com o controle contendo 34 plantas para completar as 100 previamente cultivadas para cada tratamento (quatro e oito horas), e escolhidas de maneira aleatória para serem submetidas ao tratamento utilizando o equipamento clinostato 2D nas rotações de 35 e 50 rpm por quatro e oito horas.

Para a exposição das plantas ao clinostato 2D, cinco espécimes foram cuidadosamente removidos dos copos, com o excesso de solo nas raízes eliminado. Em seguida, foram envoltos em papel toalha umedecido, a fim de minimizar possíveis estresses fisiológicos. Durante o tempo de permanência no equipamento, o papel toalha que envolvia as raízes foi reidratado a cada uma hora. O mesmo procedimento foi adotado para o grupo controle (CN), com a diferença de que as plantas não foram submetidas ao clinostato 2D, permanecendo dispostas sobre a bancada ao lado do equipamento (Figura 2). Finalizado o tratamento, as plantas foram reintroduzidas nos copos contendo solo.

Crescimento e análise Morfológica

O monitoramento morfológico das plantas foi realizado ao longo das quatro semanas subsequentes. Com o auxílio de uma régua, foram mensuradas e registradas em planilha do Excel as seguintes variáveis: distância entre nós (DN), número de gemas axilares (GA), comprimento da folha (CF), diâmetro da folha (DF) e diâmetro do caule (DC), conforme ilustrado na Figura 3. Durante o período de crescimento, o fertilizante foi preparado na proporção de 15 mL para 0,5 L de água, sendo aplicado uma única vez após o tratamento no clinostato 2D. O fungicida foi administrado em semanas alternadas, com o objetivo de controlar a proliferação de fungos no solo.

Solução fixadora

Na quinta semana, os caules foram seccionados e fixados em solução FAA (formaldeído, álcool, ácido acético, na proporção 1:18:1) por um período de 48 horas. Após a fixação, a solução foi substituída por álcool 70%, no qual os materiais permaneceram até a realização da inclusão em blocos histológicos.

Etapas de preparo das lâminas permanentes

Obtenção do bloco histológico

Para a obtenção dos blocos histológicos, os tecidos de caule, previamente armazenados em álcool 70%, foram encaminhados ao Laboratório de Técnicas Histológicas da UFRN, onde foram processados. No laboratório, os materiais foram seccionados com bisturi, de modo a obter fragmentos de aproximadamente um centímetro. Em seguida, os tecidos foram submetidos a banhos sequenciais em soluções de álcool 70%, 80%, 90% e 100%, com duração de uma hora cada, para desidratação. Posteriormente, passaram por três banhos em xilol, também com uma hora de duração cada, visando a diafanização. A impregnação foi realizada em três banhos consecutivos, com uma hora cada, utilizando parafina histológica misturada com 10% de cera. Por fim, os tecidos foram emblocados em parafina (Junqueira; Carneiro, 2015).

Obtenção das lâminas

Após o emblocamento dos tecidos, os blocos histológicos foram levados ao micrótomo rotativo, também localizado no Laboratório de Técnicas Histológicas da UFRN, para a obtenção de três secções de 4 micrômetros de espessura para cada tipo de tecido. As secções foram então transferidas para lâminas de vidro e levadas à estufa a 63 °C overnight, com o objetivo de remover o excesso de parafina, favorecendo a posterior coloração das lâminas (Junqueira; Carneiro, 2015).

Coloração e montagem das lâminas histológicas

Com a remoção do excesso de parafina, as lâminas foram submetidas ao processo de hidratação, realizado por meio de banhos sucessivos, com duração de uma hora cada, em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90% e 70%), seguidos por um banho em água destilada. A coloração foi realizada utilizando azul de toluidina, preparado na concentração de 0,05 g do corante diluídos em 100 mL de água destilada. As lâminas foram então submersas na solução corante por aproximadamente 2 minutos. O excesso de corante foi removido com água destilada

e papel toalha. Por fim, a montagem foi finalizada com a aplicação de lamínulas e do meio de montagem Entellan (Junqueira; Carneiro, 2015).

Obtenção das fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de microscópio ótico Tecnal e câmera fotográfica do dispositivo de marca Xiaomi Poco X6.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para a comparação das médias dos dados morfológicos, foi aplicado o teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Análise morfológica

Levando em consideração que a microgravidade pode causar mudanças na morfologia das plantas, as diferenças morfológicas geradas pela simulação da microgravidade no clinostato 2D foram avaliadas durante as quatro semanas subsequentes a submissão das plantas ao equipamento para os tratamentos de quatro e oito horas, em 35 e 50 rpm. Os parâmetros avaliados foram: DF (diâmetro de folha), CF (comprimento de folha), DC (diâmetro de caule), DN (distância entre nós) e GA (gemas axilares).

Para o tratamento de quatro horas foi possível observar, na primeira semana, uma redução significativa de aproximadamente 24% em DN e uma redução significativa de aproximadamente 26% em DC para 50 rpm, enquanto o grupo de 35 rpm não sofreu alterações significativas ao comparar ao grupo controle (CN) (Figura 4).

Já na segunda semana, foi possível observar uma redução significativa de aproximadamente 37% em DC para o grupo de 50 rpm, enquanto o grupo de 35 rpm não apresentou mudanças significativas em relação a CN (Figura 4).

Quanto a terceira semana, foi possível observar que apenas o grupo de 50 rpm apresentou uma redução significativa de aproximadamente 20% em DF, enquanto as plantas de 35 rpm não apresentaram alterações significativas em relação ao controle (Figura 5).

Na quarta semana, entretanto, não foram observadas alterações significativas em nenhum dos grupos tratados (35 e 50 rpm) em relação ao grupo controle para nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo (Figuras 4 e 5).

Para o tratamento de oito horas, observa-se que, na primeira semana, os valores médios de DC apresentaram uma redução de aproximadamente 25% em relação ao grupo controle, para ambas as rotações. Da mesma forma, o valor médio de CF na rotação de 50 rpm apresentou uma diminuição de cerca de 16,4%, enquanto os demais parâmetros não mostraram alterações significativas em comparação ao controle (Figuras 6 e 7).

Na segunda semana, observou-se uma redução média de 26,6%, 17,4% e 25,6% nos valores de DF, CF e DC, respectivamente, para a rotação de 35 rpm. Para as rotações de 35 e 50 rpm, a diminuição foi de 53,2% e 49,1%, respectivamente, em GA. Contudo, registrou-se um aumento de 23,6% na média de DN nas plantas submetidas à rotação de 35 rpm, em comparação ao grupo controle (Figuras 6 e 7).

Na terceira semana, observou-se uma redução de 18,3% e 25% nos valores de DF e DC, respectivamente, para as plantas submetidas à rotação de 35 rpm. Em GA, verificou-se uma diminuição de 41,9% e 33,3% para as rotações de 35 e 50 rpm, respectivamente, em comparação ao grupo CN (Figuras 6 e 7).

Por fim, na quarta semana, observou-se um aumento de 28,5% em DN nas plantas submetidas à rotação de 35 rpm, enquanto os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (Figura 6).

Fotomicrografias

As plantas podem ter distúrbios na distribuição do hormônio auxina, o qual é responsável pelo desenvolvimento do caule e das gemas axilares. Além disso, elas podem passar por um período de aclimação após um estresse. Sendo assim, ao observar a ausência de mudanças significativas nos parâmetros morfológicos analisados na quarta semana para as plantas do tratamento de quatro horas, e apenas um aumento em DN para as plantas de 35 rpm tratadas por oito horas, foi necessário avaliar a estrutura histológica do caule considerando que este tecido pode ter sido afetado caso tenha ocorrido distúrbios no hormônio da auxina.

Após o processamento do tecido, as lâminas histológicas foram coradas com azul de toluidina, o qual se liga a componentes ácidos (como a lignina presente nas paredes celulares) para que pudessem ser diferenciados os tecidos do xilema, floema, as células da medula e a cavidade central.

Para as plantas do tratamento de quatro horas, em relação a medula, foi observado uma diminuição da cavidade central para as plantas tratadas em ambas as rotações em relação ao controle. Já para as plantas de oito horas, foi observado na região central perdeu a sua conformação tanto em 35 quanto em 50 rpm ao se comparar com o controle (Figura 8).

Em relação a região lateral, foi possível observar em quatro horas um aumento dos feixes vasculares do xilema e floema tanto em 35 quanto em 50 rpm em relação ao controle. Quanto o tratamento de oito horas, foi possível observar uma desorganização de ambos os tecidos do xilema e floema em 35 rpm e uma diminuição no desenvolvimento do xilema e floema em 50 rpm em relação ao grupo controle (Figura 9).

Por fim, a região diagonal apresentou, em quatro horas, um maior desenvolvimento do xilema em 35 rpm e uma diminuição em 50 rpm, assim como um maior desenvolvimento do floema em ambos os tratamentos em relação ao controle. Já em oito horas, foi possível perceber também a desorganização dos tecidos do xilema e floema em ambas as rotações em relação ao controle (Figura 10).

Discussão

O estudo de como as plantas se adaptam às variações de gravidade são importantes não só para que haja a melhor compreensão das alterações fenotípicas nessa condição, mas também para que seja possível promover melhores condições de saúde tanto mental quanto física para os tripulantes em missões espaciais (Baluska et al., 2009; NASA, 2023).

Com a finalidade de conseguir estudar os efeitos da microgravidade em ambiente terrestre de uma maneira barata, os cientistas desenvolveram o clinostato (Baba et al., 2022). Foi verificado que este equipamento consegue simular a alteração da gravidade, e seus efeitos podem ser validados em torres de queda livre. Tendo isso em mente, este trabalho buscou avaliar as alterações causadas pela microgravidade simulada pelo clinostato 2D no desenvolvimento morfológico da planta.

Assim, foi visto que as plantas de quatro horas sofreram diminuições nos parâmetros DF, DN, DC durante as três primeiras semanas após tratamento com microgravidade simulada. Em contrapartida, as plantas do tratamento de oito horas registraram uma diminuição nos parâmetros de DF, DC, CF e GA até a terceira semana, enquanto o parâmetro DN sofreu um aumento a partir da segunda até a quarta semana após submissão no equipamento.

Contudo, estudos verificaram que em plantas de *Mentha piperita* submetidas a microgravidade, o comprimento das folhas aumentou após a submissão ao clinostato em rotação de 3.75 rpm (Paolicchi et al., 2002). Além disso, outros pesquisadores também visualizaram o aumento do comprimento do caule e folhas em plantas de *Prunus* submetidas a microgravidade simulada em clinostato 3D (Nakamura et al., 1999). Somado a isso, a literatura também não relata alterações significativas em relação ao crescimento das gemas axilares em microgravidade, apesar da correlação deste fenômeno com a alteração da distribuição da auxina nessa condição (Kitazawa et al., 2008; Oka et al., 2024).

Tendo em vista que o presente estudo observou mudanças diferentes aos dados da literatura, é possível levantar a hipótese de que organismos diferentes, assim como diferentes velocidades, tempos de rotação e equipamentos utilizados podem ser responsáveis pelas diferenças nos resultados, porém mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Sabe-se que a auxina tem um papel importante para o desenvolvimento da raiz e do caule das plantas, e que a alteração de sua distribuição causada pela microgravidade pode dar origem a espécies reativas de oxigênio danosas aos tecidos celulares em concentrações elevadas (Joo et al., 2001; Ishii et al., 1996). Os dados apresentados aqui mostram que os tecidos do xilema e floema das plantas tratadas em oito horas sofreram um aumento em seu desenvolvimento, enquanto a medula apresentou diferenças visuais significativas apenas na diminuição do tamanho da cavidade central. Enquanto isso, as plantas de oito horas apresentaram uma desorganização de todos os tecidos ao comparar com o grupo controle.

Além disso, foi observado também o aumento da coloração azul nos tecidos do xilema para as plantas tratadas em ambas as rotações e ambos os tempos de tratamento. Silva (2013), verificou alterações semelhantes, como a lignificação do tecido do metaxilema e a sua desorganização em plantas de cana-de-açúcar após submissão em foguete de sondagem. Contudo, ainda é necessário que haja a

dosagem de lignina assim como dos fitormônios, além da análise de mais lâminas histológicas, para que se possa comprovar o aumento de lignina nos tecidos e estabelecer uma relação entre a alteração do caule com os distúrbios da auxina.

Conclusão

Dessa forma, este estudo conclui que a simulação de microgravidade em plantas de *Salvia hispanica* usando um clinostato 2D foi suficiente para causar alterações tanto no desenvolvimento morfológico quanto na histologia das plantas a depender do tratamento, em 35 ou 50 rpm e em quatro ou oito horas.

Vale ressaltar que, apesar das alterações morfológicas na quarta semana terem sido visíveis apenas para o grupo de oito horas, alterações histológicas foram vistas até a quinta semana.

Assim, as razões dessas modificações, assim como o potencial antioxidante dos extratos das plantas serão investigados futuramente para melhor compreensão das alterações causadas pela microgravidade.

Referências

BABA, A. I. et al. Plants in microgravity: Molecular and technological perspectives. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 18, p. 10548, 2022.

BALUŠKA, F. et al. The 'root-brain' hypothesis of Charles and Francis Darwin: Revival after more than 125 years. *Plant signaling & behavior*, v. 4, n. 12, p. 1121–1127, 2009.

BÖHMER, M.; SCHLEIFF, E. Microgravity research in plants: A range of platforms and options allow research on plants in zero or low gravity that can yield important insights into plant physiology: A range of platforms and options allow research on plants in zero 55 or low gravity that can yield important insights into plant physiology. *EMBO reports*, v. 20, n. 7, p. e48541, 2019.

FAROOQ, M. et al. Investigating plant responses to microgravity and adaptations in gravisensitive environments. *Environmental sciences Europe*, v. 36, n. 1, 2024.
GARDINER, J. Cytoskeletal tensegrity in microgravity. *Life* (Basel, Switzerland), v. 11, n. 10, p. 1091, 2021.

JOO, Jung Hee; BAE, Yun Soo; LEE, June Seung. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant physiology*, v. 126, n. 3, p. 1055-1060, 2001.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. *Histologia básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

KITAZAWA, D. et al. The gravity-regulated growth of axillary buds is mediated by a mechanism different from decapitation-induced release. *Plant & cell physiology*, v. 49, n. 6, p. 891–900, 2008.

LOPEZ, D. et al. Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. *Frontiers in plant science*, v. 5, p. 610, 2014.

NAKAMURA, T. et al. Growth of *Prunus* tree stems under simulated microgravity conditions. *Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, v. 23, n. 12, p. 2017–2020, 1999.

OKA, M.; KITAGAWA, K.; MIYAMOTO, K. Effect of simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat on axillary bud growth induced by a removal of shoot apex in Alaska pea seedlings. *Biological sciences in space*, v. 38, n. 0, p. 33–41, 2024.

PAOLICCHI, F.; MENSUALI-SODI, A.; TOGNONI, F. Effect of clinorotation on in vitro cultured explants of *Mentha piperita* L. *Scientia horticulturae*, v. 92, n. 3–4, p. 305–315, 2002.

RIBEIRO, Ana Raquel Carneiro. Prospecção química e de atividades antioxidante e antiproliferativa dos extratos de *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg (Myrtaceae) e *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). 2019. 128f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

SANTOS, John Wesley Lira. Avaliação do efeito da microgravidade simulada por um clinostato 2D sobre comportamento de *Lemna aequinoctialis*. 2022. 37 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

SEMPSTROTT, D. Growing plants in space. Disponível em: <<https://www.nasa.gov/exploration-research-and-technology/growing-plants-in-space/>>. Acesso em: 28 jun. 2025.

SILVA, Helaine Cristiane. Efeitos da microgravidade em plantas de cana-de-açúcar. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

Figura 6

Figura 7

Figura 8

Figura 9

Figura 10

CÓDIGO: SB0283

AUTOR: GIOVANNA CAMARA PICANCO SANTIAGO

ORIENTADOR: KATIA CASTANHO SCORTECCI

TÍTULO: Efeito do tratamento do clinostato e estresse hídrico por meio do PEG 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 45 rpm, e estresse hídrico, induzido por PEG 6000 a 15%. As plantas foram submetidas aos estresses combinados por 2 e 4 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 e avaliação da capacidade antioxidante total. A exposição ao estresse combinado por 2 horas não alterou significativamente os compostos fenólicos, mas reduziu a concentração de proteínas (dias 5 e 10) e a capacidade antioxidante (dia 0). Por outro lado, a exposição por 4 horas promoveu aumento consistente nos compostos fenólicos, elevação das proteínas (dias 0 e 5) e maior capacidade antioxidante no dia 10. Assim, este estudo contribui para a compreensão dos efeitos da combinação de estresses na produção de compostos em *L. aequinoctialis*.

Palavras-chave: Microgravidade; clinostato; lemna; PEG 6000.

TITLE: Effect of 2D clinostat treatment and PEG-induced water stress on *Lemna aequinoctialis* plants.

Abstract

The combined application of stresses in plants has been widely explored to better understand and enhance the production of bioactive compounds. The study of simulated microgravity is linked to space exploration, whereas drought stress has gained importance in the context of climate change. *Lemna aequinoctialis*, a member of the Lemnoideae family, has high economic potential due to its elevated protein content. This work investigated the effects of combining simulated microgravity, generated by a 2D clinostat rotating at 45 rpm, with drought stress induced by 15% PEG 6000. Plants were exposed to the combined stresses for 2 and 4 hours and compared with controls subjected to isolated stresses and to no stress.

Analyses were conducted at three time points (0, 5, and 10 days) and included total protein content, quantification of phenolic compounds, and total antioxidant capacity. Exposure to the combined stress for 2 hours did not significantly affect phenolic compounds but reduced protein content (days 5 and 10) and antioxidant capacity (day 0). In contrast, 4-hour exposure promoted a consistent increase in phenolic compounds across all sampling times, enhanced protein concentration (days 0 and 5), and improved antioxidant capacity on day 10. Then, this study provides insights into how combined stresses influence the production of bioactive compounds in *L. aequinoctialis*.

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, ocorre 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 pode ser caracterizado pela falta de água o suficiente para a planta absorver, 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 tóxico para as plantas (Plaut, 1985).

Deste modo, neste trabalho o alvo para os estudos combinando os estresses de microgravidade (Santos, 2022) e o hídrico (Osmolovskaya et al., 2018), 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 45 RPM no aparelho de clinostato 2D por períodos de 2 e 4 horas. Decorrido estes tempos 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 realizada em triplicata (utilizando 3 tubos). O controle que não passou pelo clinostato 2D durante o tempo de experimento, ficou 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso nos ensaios bioquímicos.

Ensaio bioquímicos

Com os extratos das *L. aequinoctialis* prontos, três testes bioquímicos foram realizados a fim de medir a quantidade de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, a quantidade de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) e a capacidade antioxidante total (CAT) pelo método de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). 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

Análises morfológicas não foram realizadas com as plantas de *L. aequinoctialis* nessa primeira etapa do experimento. Entretanto, segundo Santos (2022), sabe-se que o efeito da microgravidade causada pelo clinostato 2D pode causar alterações na morfologia das plantas de lemnas. Para melhor compreensão dessas alterações morfológicas causadas nas plantas de *L. aequinoctialis*, análises futuras serão realizadas.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que podem ter sua síntese influenciada tanto pela indução da microgravidade simulada quanto pelo estresse hídrico (Al awaida et al, 2020; Sarker; Oba, 2018). Assim, em relação a dosagem dos compostos fenólicos para 2 horas, foram vistas alterações significativas de aumento (Figura 1), em relação ao controle que não passa por nenhum estresse (CSN), no dia 0 nos extratos do controle que passa apenas pela microgravidade (CC) e no controle que passa apenas pelo estresse hídrico (CPEG). No dia 5, apenas CC teve uma diferença significativa em relação ao CSN, porém a pode ser observado que a dosagem diminui em relação ao CSN. No dia 10, CPEG foi a única amostra que apresentou diferença significativa em relação ao CSN, pois foi observado um aumento.

Já para 4 horas, na dosagem dos compostos fenólicos pode ser vista (Figura 2) que nos dias 0, 5 e 10 dias a variação C+PEG houve aumentos significativos em relação ao controle sem estresse (CSN). Entretanto, não foi observado diferenças significativas nos controles CC e CPEG em relação ao CSN.

As *L. aequinoctialis* são plantas com grande potencial para produção de ração no agronegócio, uma vez que são utilizadas como ração para peixes, por possuírem uma alta quantidade de proteínas capazes até de substituir a ração industrial (Antonelo et al, 2019; Silva, 2023). Em vista disso, em relação a dosagem de proteínas totais para 2 horas (Figura 3), foram observados um aumento significativo no dia 0 no extrato de CPEG. No dia 5, C+PEG e CPEG apresentaram uma diminuição significativa. No último dia de análise, pode-se observar que todas as variantes possuíram uma diferença significativa, com C+PEG e CPEG possuindo uma diminuição significativa e o CC possuindo um aumento significativo.

Para dosagem de proteínas totais para 4 horas (Figura 4), foram observados que no dia 0 os extratos com PEG 6000 houve um aumento significativo. No dia 5, o extrato que passa apenas pelo estresse do clinostato (CC) e o extrato que sofre a combinação de ambos os estresses (C+PEG) também tiveram um aumento significativo. Para o dia 10, nenhuma diferença significativa pode ser observada.

Os estresses da microgravidade e hídrico nas plantas podem desencadear estresses secundários, como o estresse oxidativo, uma vez que podem causar acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições normais (Oluwafemi, 2025). Dessa maneira, o ensaio da Capacidade Antioxidante Total (CAT) foi feito para que o potencial antioxidante das amostras de 2 e 4 horas fossem avaliadas pós-tratamento. Entretanto, pode-se observar que para 2 horas (Figura 5) no dia 0 houve uma diminuição significativa nos controles que passa apenas no clinostato (CC) e na combinação de estresse (C+PEG) em relação ao controle sem estresse (CSN). Para 5 horas pode-se observar um aumento significativo no controle que é submetido apenas ao estresse da microgravidade (CC) e no controle que é submetido apenas ao estresse hídrico (CPEG). Já para 10 horas não foi observado nenhuma diferença significativa.

Para 4 horas (Figura 6), foi visto que no dia 0 apenas o controle do clinostato (CC) houve um aumento significativo. Em 5 dias, não houve nenhuma diferença significativa. Já em 10 horas ambas as alíquotas que foram submetidas ao estresse salino (CPEG e C+PEG) tiveram um aumento significativo em relação ao controle sem estresse (CSN).

Conclusão

Pode-se concluir que após submeter a *L. aequinoctialis* a condições de estresse de microgravidade em clinostato 2D e de estresse hídrico com PEG 6000 por dois tempos distintos (2 e 4 horas), as plantas tiveram, na quantidade de compostos fenólico para 2 horas, alterações de aumento e diminuição nas variantes CC nos dias 0 e 5 e CPEG nos dias 5 e 10 de análise e para 4 horas houve um aumento significativo na variação C+PEG nos três dias de análise. Para as quantidades de proteínas totais em 2 horas no dia 0, as lemnas tiveram um aumento na concentração proteica na variação CPEG, no dia 5 houve uma diminuição nas variações C+PEG e CPEG, e no dia 10 de análises todas as variações apresentaram diferenças, com C+PEG e CPEG apresentando uma diminuição na concentração total e CC um aumento, já para 4 horas no dia 0 de análise CPEG e C+PEG tiveram um aumento significativo e no dia 5 as variantes CC e C+PEG também tiveram um aumento significativo. Com a capacidade antioxidante total (CAT) pode-se observar que em 2 horas houve uma diminuição significativa nas variações CC e C+PEG no dia 0 de análise e um aumento significativo nas variações CC e CPEG no dia 5, para 4 horas o extrato CC teve aumento em 0 dias, e os extratos CPEG e C+PEG tiveram aumentos significativos em 10 dias. 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

AL-AWAIDA, Wajdy J. et al. Effect of simulated microgravity on the antidiabetic properties of wheatgrass (*Triticum aestivum*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *npj Microgravity*, v. 6, n. 1, p. 6, 2020.

ANTONELO, Fábio Antônio; DE ALMEIDA LOUREIRO, Matheus; JOHANN, Gracielle. Biomassa de *Eichhornia crassipes* e *Lemna minuta* para alimentação animal. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 14, n. 2, p. 338-342, 2019.

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.

DO CARMO ARAÚJO, Saulo Alberto et al. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.), em estresse hídrico. *Acta Scientiarum: Animal Sciences*, p. 1-7, 2010.

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.

ISAH, Tasiu. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological research*, v. 52, 2019.

OLUWAFEMI, Funmilola A.; IBRAHEEM, Omodele; OLUBIYI, Afolabi R. Improved biochemical properties of roots of selected economic crops after simulated microgravity impact. *Frontiers in Space Technologies*, v. 6, p. 1552919, 2025.

OSMOLOVSKAYA, Natalia et al. Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 12, p. 4089, 2018.

PLAUT, Zvi; FEDERMAN, Evelyn. A simple procedure to overcome polyethylene glycol toxicity on whole plants. *Plant physiology*, v. 79, n. 2, p. 559-561, 1985.

PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. 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, 1999.

SANTOS, John Wesley 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.

SARKER, Umakanta; OBA, Shinya. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus leafy vegetable*. *BMC Plant biology*, v. 18, p. 1-15, 2018.

SILVA, Bruna Ramos de Oliveira da. Avaliação do desenvolvimento zootécnico de juvenis de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) utilizando dieta comercial e lemna (*Lemna minor*) lentilha d'água como alimento secundário para tilápia nilótica. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

VILLELA, Francisco Amaral; DONI FILHO, Luiz; SEQUEIRA, Eliseo Leclerc. Tabela de Potencial Osmótico em Função da Concentração de Polietileno Glicol 6.000 e da Temperatura. 1991.

Anexos

Figura 1: Ensaios in vitro de análise de duas horas dos compostos fenólicos totais em extrato aquoso de *L. aequinoctialis*.

Figura 2: Ensaios in vitro de análise de quatro horas dos compostos fenólicos totais em extrato aquoso de *L. aequinoctialis*.

Figura 3: Ensaios in vitro de duas horas de análise de proteínas totais em extrato aquoso de *L. aequinoctialis*.

Figura 4: Ensaios in vitro de duas horas de análise de proteínas totais em extrato aquoso de *L. aequinoctialis*.

Figura 5: Ensaios in vitro de análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT) em extrato aquoso de *L. aequinoctialis* após tratamento de 2 horas.

Figura 6: Ensaios in vitro de análise da Capacidade Antioxidante Total (CAT) em extrato aquoso de *L. aequinoctialis* após tratamento de 4 horas.

CÓDIGO: SB0290

AUTOR: ANA LUIZA FERREIRA DE ARAUJO

COAUTOR: MARIA CLARA CANUTO DA COSTA

COAUTOR: HADASSA LOUYSE DANTAS MARQUES

COAUTOR: SUAMY BEATRIZ DA SILVA OTAVIANO

ORIENTADOR: DANIELLA REGINA ARANTES MARTINS SALHA

TÍTULO: Toxoplasmose em gestantes: um estudo de busca de imuno epítomos para ferramentas de diagnóstico sorológico.

Resumo

A toxoplasmose, causada por *Toxoplasma gondii*, é uma doença que afeta 30% da população global e representa alto risco durante a gestação devido à possibilidade de transmissão vertical, responsável por parto prematuro e malformações. Os métodos sorológicos atuais apresentam limitações, tornando necessária a busca por estratégias mais sensíveis e específicas, como o uso de antígenos recombinantes. Os objetivos da pesquisa é revisar estudos sobre toxoplasmose em gestantes, com e sem diabetes mellitus gestacional (DMG), e avaliar o potencial de antígenos recombinantes na melhoria dos diagnósticos sorológicos. A metodologia é composta de uma revisão bibliográfica sistemática, priorizando estudos clínicos e revisões sobre diagnóstico de *T. gondii* com uso de antígenos recombinantes e predição de epítomos. Os resultados sobre os antígenos recombinantes alcançaram até 100% de sensibilidade e especificidade, superando métodos habituais. Ferramentas de imunoinformática identificaram epítomos conservados, não-alérgicos, viabilizando proteínas quiméricas de alta acurácia. Em gestantes com DMG, observou-se um aumento de marcadores de exaustão celular, sugerindo risco de reativação da infecção. A combinação de bioinformática e engenharia genética no desenvolvimento de antígenos recombinantes representa avanço promissor para diagnósticos mais precisos da toxoplasmose, com potencial para reduzir impactos da infecção congênita e aprimorar a saúde materno-infantil.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Diabetes gestacional, Antígenos recombinantes.

TITLE: Toxoplasmosis in Pregnant Women: A Study on the Search for Immuno-Epitopes for Serological Diagnostic Tools.

Abstract

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii*, affects approximately 30% of the global population and poses a high risk during pregnancy due to the possibility of vertical transmission, which can lead to preterm birth and congenital malformations. Current serological methods present limitations, highlighting the need for more sensitive and specific

strategies, such as the use of recombinant antigens. The aim of this research is to review studies on toxoplasmosis in pregnant women, with and without gestational diabetes mellitus (GDM), and to evaluate the potential of recombinant antigens in improving serological diagnosis. The methodology consists of a systematic literature review, prioritizing clinical studies and reviews on *T. gondii* diagnosis employing recombinant antigens and epitope prediction. Findings on recombinant antigens demonstrated sensitivity and specificity rates reaching up to 100%, surpassing conventional methods. Immunoinformatics tools identified conserved, non-allergenic epitopes, enabling the design of highly accurate chimeric proteins. In pregnant women with GDM, an increase in cellular exhaustion markers was observed, suggesting a higher risk of infection reactivation. The integration of bioinformatics and genetic engineering in the development of recombinant antigens represents a promising advancement toward more precise diagnostics for toxoplasmosis, with the potential to reduce the impact of congenital infection and improve maternal and child health.

Keywords: Toxoplasmosis, Gestational Diabetes, Recombinant Antigens.

Introdução

A toxoplasmose, infecção causada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, representa um grave problema de saúde pública, afetando estimativamente 25 a 30% da população humana mundial (1). É uma zoonose disseminada, sendo mais grave em regiões com baixos níveis de saneamento e higiene, (2). A infecção congênita é um dos aspectos mais importantes da toxoplasmose em humanos, ocorrendo pela transmissão vertical da mãe para o feto durante a gravidez (3, 4). A passagem do *T. gondii* pela placenta ocorre em cerca de 20% das infecções maternas (5). No Brasil, mais de 6.000 casos são diagnosticados anualmente (4). O diagnóstico precoce é um desafio, pois aproximadamente 70% das crianças infectadas são assintomáticas ao nascer (3). As consequências para o feto podem incluir morte fetal, parto prematuro e malformações graves, (6).

O diagnóstico da toxoplasmose, é realizado por diferentes métodos, sendo as triagens sorológicas as mais comuns para detectar antígenos e anticorpos (7). No entanto, os testes sorológicos convencionais podem apresentar limitações, incluindo a detecção isolada de IgM, embora apareça no início da infecção, pode não ser suficiente, sendo mais prudente combinar a análise para IgM e IgG (8). A pesquisa da avidade de anticorpos IgG é solicitada quando o IgM é positivo para identificar a época da infecção (aguda ou pregressa) (8). Um rastreamento sistemático durante a gestação, que combine métodos sorológicos e de biologia molecular, pode auxiliar na redução dos riscos de infecção (9). Nota-se um avanço no uso de tecnologias de DNA recombinante para aprimorar a sensibilidade diagnóstica da toxoplasmose, permitindo a testagem de antígenos específicos de *T. gondii*. A bioinformática tem impulsionado diagnósticos mais precisos, contribuindo para a engenharia proteica e análises imunológicas, (10). Especificamente, ferramentas de imunoinformática têm sido usadas para prever epítomos em proteínas como SAG1 e GRA7 de *T. gondii*, visando encontrar candidatos com alta antigenicidade, imunogenicidade e cobertura populacional. Os epítomos são selecionados com base em critérios como alta conservação entre cepas, ausência de alergenicidade e baixa toxicidade, o que otimiza a sensibilidade e especificidade no reconhecimento imune. Esse enfoque na seleção racional de epítomos imunogênicos, combinados por engenharia genética, resulta em uma proteína quimérica capaz de melhorar a acurácia diagnóstica, reduzir falsos positivos e negativos, e diferenciar infecções recentes de passadas, (11).

A resposta imune em gestantes infectadas por *T. gondii* pode ser modulada por condições como o diabetes gestacional (DMG). Em gestantes com toxoplasmose e DMG, todas as gestantes e recém-nascidos foram positivos para IgG anti-*T. gondii*, com predominância da subclasse IgG1. Observou-se uma correlação negativa entre a glicemia e os níveis de IgG total, indicando que níveis maiores de glicemia se associam a parâmetros humorais menores. A avidéz de IgG em gestantes com DMG foi menor que no grupo controle, embora ainda dentro da faixa que sugere infecção crônica. Na resposta imune celular, o grupo DMG apresentou maior número de linfócitos T CD4+ e CD8+ coexpressando CD28 e PD-1, marcadores de ativação e exaustão celular. A modulação negativa da resposta imune em gestantes com DMG levanta a possibilidade de reativação da toxoplasmose, ressaltando a importância do monitoramento desses pacientes, (12).

Diante da complexidade da toxoplasmose em gestantes e seus impactos na saúde materno-infantil a busca por inovações tecnológicas é essencial para otimizar a triagem e o diagnóstico. Assim, o objetivo geral é realizar uma revisão sobre a toxoplasmose em gestantes com e sem DGM e a importância na busca de antígenos recombinantes para a melhoria dos diagnósticos sorológicos com intuito na descoberta precoce da infecção por *T. gondii*.

Metodologia

Levantamento Bibliográfico

Este estudo utilizou um levantamento bibliográfico amplo e sistemático, com o objetivo de contextualizar o desenvolvimento e a avaliação de métodos sorod diagnósticos para a toxoplasmose, com especial atenção ao avanço do uso de antígenos recombinantes e ferramentas de bioinformática. A pesquisa foi conduzida nas bases PubMed, Scopus, LILACS e SciELO.

A estratégia de busca empregou uma combinação de descritores controlados (MeSH Terms) e palavras-chave livres, como Toxoplasmosis, Pregnancy, Toxoplasma gondii, Gestational Diabetes, Diabetes Mellitus, Recombinant Antigens, Epitope Mapping e Bioinformatics. Esses termos foram combinados com operadores (“AND” e “OR”) para maximizar a abrangência e precisão dos resultados.

Foram aplicados filtros para restringir a busca a publicações dos últimos 10 anos, disponíveis em português, inglês ou espanhol, com texto completo acessível. Foram priorizados ensaios clínicos, estudos observacionais e revisões que explorassem abordagens inovadoras para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*, especialmente em gestantes, devido ao alto risco de transmissão vertical e potenciais desfechos adversos fetais e neonatais.

Análise Crítica

Os seguintes critérios de inclusão e exclusão foram utilizados para a busca de artigos que pudessem respaldar a escrita desse trabalho. Os trabalhos selecionados foram os estudos originais e de revisões sobre o uso de antígenos recombinantes de *T. gondii*, epítomos sintéticos ou bioinformática no diagnóstico de toxoplasmose, pesquisas envolvendo gestantes (com ou sem diabetes) ou modelos experimentais aplicáveis a humanos ou trabalhos que apresentem dados de sensibilidade e/ou especificidade dos métodos sorod diagnósticos.

Os estudos que não se encaixarem nas delimitações contêm especificidades, como: estudos exclusivamente em modelos animais, sem validação em humanos, artigos sem acesso ao texto completo ou fora dos idiomas definidos, publicações duplicadas, relatos de caso isolados, editoriais e artigos de opinião sem base experimental.

A seleção dos artigos foi realizada em duas etapas: a triagem de títulos e resumos para exclusão de trabalhos irrelevantes e a leitura integral para confirmar a elegibilidade segundo os critérios definidos.

Os dados extraídos serão organizados em tabela padronizada contendo: autores, ano de publicação, tipo de antígeno, técnica utilizada.

Resultados e Discussões

Os resultados deste estudo, alinhados à metodologia empregada, foram abordados com seus principais pontos importantes.

Desenvolvimento e avaliação de um antígeno multi-epítopo como marcador sorodiagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii*: O estudo sobre a proteína multi-epítopo recombinante analisada por western blot confirmou que a proteína foi expressa e purificada com sucesso, os resultados de validação para o ELISA recombinante mostraram uma sensibilidade de 72,6% e uma especificidade de 90,3%. Apesar do potencial, a sensibilidade e especificidade dessa proteína foram inferiores às dos testes que utilizam o corpo inteiro do parasita, (11).

Desenvolvimento e avaliação de um antígeno recombinante multi-epítopo para o sorodiagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos: Um gene sintético, codificando epítomos potenciais de antígenos de *T. gondii*, foi construído com sucesso utilizando PCR de montagem gênica. O gene sintetizado foi clonado em um vetor de expressão pET32a e transformado em *E. coli* BL21. A proteína completa foi expressa e purificada com sucesso. A avaliação preliminar do desempenho diagnóstico da proteína expressa por ELISA e Western blot, utilizando soros humanos, demonstrou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Estudos adicionais são necessários para avaliar a imunogenicidade em modelos animais e verificar a imunorreatividade, (13).

Análise e Identificação de Novos Epítomos de Células B na Proteína GRA4 de *Toxoplasma gondii*: Os potenciais epítomos de células B da proteína GRA4, preditos por ferramentas de bioinformática, concentraram-se em seis regiões. Onze peptídeos menores, provenientes dessas seis regiões, foram sintetizados e avaliados por ELISA utilizando soros de suínos em diferentes períodos após a infecção. Três dos onze peptídeos foram reconhecidos por todos os soros testados. Os epítomos identificados podem ser úteis para estudos adicionais no desenvolvimento de vacinas e reagentes diagnósticos baseados em epítomos, (14).

Análise Estrutural In Silico de Novos Epítomos de Proteínas de *Toxoplasma gondii* para o Sorodiagnóstico da Toxoplasmose: Os epítomos lineares das proteínas SAG1, GRA3 e BSR4 apresentaram-se como os mais promissores, por serem estáveis, hidrofílicos, com pontuações significativas de antigenicidade e boa acessibilidade na superfície da proteína. Esses três peptídeos selecionados foram capazes de detectar anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de suínos infectados por taquizoítos, demonstrando diferença marcante em termos de reatividade quando comparados a amostras controle. Os achados destacam o potencial de peptídeos sintéticos derivados de novos epítomos do parasita como ferramentas alternativas

para o desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos mais precisos para a toxoplasmose, especialmente em infecções gestacionais e congênitas, (15).

Avaliação do antígeno SAG2A recombinante de *Toxoplasma gondii* como um potencial marcador diagnóstico para toxoplasmose humana aguda: O antígeno SAG2A recombinante é capaz de diferenciar indivíduos infectados de não infectados por *T. gondii* e pode ser usado como diagnóstico qualitativo. O SAG2A recombinante demonstrou ser capaz de diferenciar amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda de pacientes com toxoplasmose crônica. A determinação dos títulos e da avidéz de anticorpos IgG1 frente ao antígeno recombinante SAG2A mostrou-se uma ferramenta potencial para a caracterização da fase aguda da infecção por toxoplasmose, (16).

Associação do diabetes mellitus gestacional e modulação da resposta imune humoral e celular específica a *Toxoplasma gondii*: Todas as gestantes e recém-nascidos foram positivos para IgG anti-*T. gondii*, com predominância da subclasse IgG1. Houve uma correlação negativa entre a glicemia e os níveis de IgG total, IgG1 e a avidéz de IgG, ou seja, quanto maior a glicemia, menores esses parâmetros humorais. A avidéz de IgG nas gestantes com GDM foi significativamente menor que no grupo controle, embora ainda dentro da faixa considerada "alta" (indicando infecção crônica). Em relação a resposta imune celular o grupo GDM teve maior número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ coexpressando CD28 e PD-1 (marcadores de ativação e exaustão celular). A maior expressão de PD-1 sugere possível perda funcional dessas células e risco de reativação da infecção. Citoquinas intracelulares em linfócitos T CD4⁺: A produção intracelular de IFN- γ , IL-10 e IL-17 por células T CD4⁺ foi significativamente menor no grupo GDM sob estímulo antigênico. Citoquinas no sobrenadante: O grupo GDM secretou menos IL-17, IL-4, TNF e IL-2 após estímulo com antígeno de *T. gondii*, (12).

Todos os recém-nascidos tinham anticorpos IgG transferidos da mãe. Não foi relatado nenhum desfecho clínico negativo evidente ao nascimento. O artigo alerta para a possibilidade de reativação da toxoplasmose em gestantes com GDM devido à modulação negativa da resposta imune, (12).

O estudo de identificação de epítomos antigênicos de *T. gondii* ampliou o entendimento sobre a estrutura e função dos antígenos, e das interações entre antígenos e anticorpos, contribuindo significativamente para diversas áreas da imunologia. A investigação desses epítomos tem desempenhado um papel essencial no desenvolvimento de novos reagentes diagnósticos. Visto que, os testes comuns que são amplamente utilizados, possuem limitações consideráveis que podem ser superadas por melhorias nas ferramentas diagnósticas.

Os desfechos da busca demonstram que a metodologia de imunoinformática é uma ferramenta poderosa para a predição de epítomos imunodominantes de *T. gondii* com características físico-químicas e antigênicas ideais. A viabilidade da expressão e purificação de proteínas recombinantes multi-epítomos foi confirmada, possibilitando sua aplicação em novos ensaios diagnósticos.

Crucialmente, os antígenos recombinantes e as construções multi-epítomos, mostraram alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos IgG. A identificação de epítomos específicos, com características otimizadas (alta afinidade a MHC, não-alergenicidade, baixa toxicidade e boa cobertura populacional), destaca o potencial de desenvolver marcadores diagnósticos com alta precisão e segurança.

Embora o foco principal seja a identificação de epítomos, a pesquisa destaca que condições clínicas como o diabetes gestacional podem modular a resposta imune em gestantes cronicamente infectadas por *T. gondii*, indicando uma resposta humoral e celular diminuída com o aumento da glicemia. Essa observação sublinha a complexidade do diagnóstico e manejo da toxoplasmose em subpopulações específicas de gestantes. Adicionalmente, o estudo do perfil das subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) pode fornecer insights valiosos sobre a resposta imune diferencial durante a infecção.

A cerca dos trabalhos encontrados observou-se resultados variados para antígenos recombinantes, enquanto um antígeno multi-epítopo demonstrou sensibilidade e especificidade de 72,6% e 90,3%, respectivamente, sendo inferior a testes com o parasita inteiro, outro gene sintético multi-epítopo alcançou 100% de sensibilidade e especificidade. Essas variações reforçam a necessidade de um design racional e otimizado de epítomos para maximizar o desempenho diagnóstico.

A capacidade de projetar e produzir antígenos recombinantes baseados em epítomos de *T. gondii* representa um avanço crucial para a padronização, redução de custos e escalabilidade na produção de reagentes diagnósticos. O foco em epítomos específicos é fundamental, pois são essas as estruturas que, de fato, estimulam as respostas imunes protetoras. A otimização dessas regiões antigênicas permite o desenvolvimento de testes altamente precisos e com menor probabilidade de reatividade cruzada. A integração de abordagens computacionais (*in silico*) e experimentais (*in vitro*) valida a seleção de candidatos que possuem as características ideais, como alta antigenicidade, ausência de alergenidade e baixa toxicidade, garantindo a segurança e eficácia dos futuros testes diagnósticos.

Diagnósticos mais acurados possibilitarão intervenções terapêuticas mais eficazes, diminuindo significativamente a incidência de toxoplasmose congênita e mitigando seus graves impactos neurológicos e oftalmológicos em recém-nascidos, além de contribuir para o campo da biotecnologia ao consolidar a aplicação de ferramentas bioinformáticas no desenvolvimento racional de novos bioensaios, por meio do refinamento dos ensaios ELISA com os epítomos validados para garantir reprodutibilidade, estabilidade e adaptabilidade a diferentes plataformas automatizadas.

Métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos podem fortalecer a vigilância epidemiológica, permitindo uma resposta mais rápida a surtos e auxiliando na formulação de políticas públicas em saúde materno-infantil.

Conclusão

A toxoplasmose em gestantes representa um desafio significativo para a saúde pública, especialmente devido à possibilidade de transmissão congênita e às graves consequências para o feto e recém-nascido. O diagnóstico precoce e preciso é fundamental para minimizar esses riscos, porém os métodos sorológicos tradicionais apresentam limitações que comprometem a acurácia dos resultados. Neste contexto, a utilização de antígenos recombinantes e a identificação de epítomos imunogênicos por meio de ferramentas de imunoinformática configuram avanços promissores para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis, específicos e seguros.

Os estudos analisados demonstram que proteínas multi-epítomos sintetizadas racionalmente apresentam alto potencial para melhorar o diagnóstico da toxoplasmose, ao permitir a diferenciação entre fases aguda e crônica da infecção, além de reduzir falsos positivos e negativos. Além disso, a modulação da resposta imune em gestantes com diabetes gestacional ressalta a complexidade clínica da infecção, evidenciando a necessidade de monitoramento específico para populações com condições comórbidas.

Portanto, a integração de abordagens bioinformáticas e experimentais na busca e validação de epítomos de *Toxoplasma gondii* contribui significativamente para a inovação em diagnósticos sorológicos, promovendo intervenções mais eficazes e fortalecendo a vigilância epidemiológica. Esses avanços são essenciais para a proteção da saúde materno-infantil e para a redução do impacto da toxoplasmose congênita.

Referências

1. ROBERT-GANGNEUX F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
DOI: 10.1128/cmr.05013-11.
2. (Walcher; Camparsi; Pedroso, 2016) WALCHER, D. L.; COMPARSI, B.; PEDROSO, D. Gestational Toxoplasmosis: A Review. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 49, n. 4, 2016. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1007913> > . Acesso em: 28/05/2025.
3. SOARES, J. A. S.; CALDEIRA, A. P. Congenital toxoplasmosis: the challenge of early diagnosis of a complex and neglected disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019. SBP. Toxoplasmose congênita. *Sociedade Brasileira de Pediatria, Documento Científico*, n.6, p.1-10, 2020.
4. (Torgerson; Mastroiacovo, 2013) TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. A carga global da toxoplasmose congênita: uma revisão sistemática. *Órgão Mundial de Saúde Bull*, v.91, p.501-508, 2013.
5. (Buffolano et al., 2005) BUFFOLANO, W.; BEGHETTO, E.; DEL PEZZO M.; SPADONI, A.; DI CRISTINA, M.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 12, p. 5916-5924, 2005. DOI: 10.1128/jcm.43.12.5916-5924.
6. (Dubey, 2021) DUBEY, J.P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. *Parasites & vectors*, v.14, p.263,

2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4>

6. (Mello et al., 2022) MELLO, C. O. de.; OLIVEIRA, G. de; SPINATO, G.; BAPTISTELLA, A. R.;

BONAMIGO, E. L. Perfil epidemiológico da toxoplasmose em gestante e soroprevalência nacional. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v.51, n.1, p.71-88, 2022.

7. (Liu et al., 2015) DUBEY, J.P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal

experience, perspectives and lessons learned. *Parasites & vectors*, v.14, p.263,

2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4>

8. (Paim; Durigon, 2024) DUBEY, J.P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal

experience, perspectives and lessons learned. *Parasites & vectors*, v.14, p.263,

2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4>

9. (Stajner et al., 2016). STAJNER, T.; BOBIC, B.; KLUN, I.; NIKOLIC, A.; SRBLJANOVIC, J.; UZELAC, A.;

RAJNPREHT I, DJURKOVIC-DJAKOVIC O. Prenatal and Early Postnatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis in a Setting With No Systematic Screening in

Pregnancy. *Medicine (Baltimore)*. v.95, n.9, p.e2979, 2016. doi:

10.1097/MD.0000000000002979.

10. KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of

toxoplasmosis. *APMIS*. v.118, p.529–542, 2010. doi: 10.1111/j.1600-

0463.2010.02655.

11- (Alibakhshi et al.,2020) Alibakhshi A, Bandehpour M, Sharifnia Z, Kazemi B. The development and evaluation of a multi-epitope antigen as a serodiagnostic marker of *Toxoplasma gondii* infection. *Adv Clin Exp Med*. 2020 Jun;29(6):669-675. doi: 10.17219/acem/104554. PMID: 32573993.

12. OLIVEIRA, Ana. Associação do diabetes mellitus gestacional e modulação da resposta imune humoral e celular específica a *Toxoplasma gondii*. 2020. 110 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2020.

13. Hajissa K, Zakaria R, Suppian R, Mohamed Z. Design and evaluation of a recombinant multi-epitope antigen for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Parasit Vectors*. 2015 Jun 11;8:315. doi: 10.1186/s13071-015-0932-0. PMID: 26062975; PMCID: PMC4465724.

14. Wang Y., et al., Wang G, Ou J, Yin H, Zhang D. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. *Parasit Vectors*. 2014 Oct 10;7:474. doi: 10.1186/s13071-014-0474-x. PMID: 25301141; PMCID: PMC4195951.

Análise Estrutural In Silico de Novos Epítomos de Proteínas de *Toxoplasma gondii* para o Serodiagnóstico da Toxoplasmose"

15. Betancourt, A.d.V.B.; Silva, T.L.; de Freitas Oliveira, D.K.; Nicolau-Junior, N.; Garcia, J.L.; Fujiwara, R.T.; Mineo, T.W.P.; Mineo, J.R. A Structural In Silico Analysis of Novel Epitopes from *Toxoplasma gondii* Proteins for the Serodiagnosis of Toxoplasmosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 4689. <https://doi.org/10.3390/ijms26104689>.

16. BÉLA, Samantha. Avaliação do antígeno SAG2A recombinante de *Toxoplasma gondii* como um potencial marcador diagnóstico para toxoplasmose humana aguda. 2007. 92 f. Dissertação – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

Anexos

Tabela dos antígenos recombinantes encontrados na pesquisa

CÓDIGO: SB0301

AUTOR: SOPHIA GONCALVES DE MISQUITA E SILVA

COAUTOR: SIMONE DA NOBREGA TOMAZ MOREIRA

ORIENTADOR: GUSTAVO DA CUNHA LIMA FREIRE

TÍTULO: Formação de futuros profissionais de saúde: um estudo qualitativo sobre cuidados paliativos

Resumo

O cuidado paliativo consiste em uma filosofia de tratamento aplicada a indivíduos, de qualquer faixa etária, que convivem com doenças que ameaçam a continuidade da vida. Seu principal objetivo é a melhoria da qualidade de vida, tanto do paciente quanto de seus familiares, por meio da prevenção e alívio do sofrimento, abrangendo aspectos físicos, psicossociais e espirituais. Entretanto, apesar da sua importância fundamental, a escassez de contato com o tema na graduação constitui uma grave lacuna para o exercício da futura prática médica. Com esse propósito, o presente estudo visa analisar a capacitação dos estudantes em cuidados paliativos para, posteriormente, desenvolver estratégias que promovam a inclusão dessa temática na formação acadêmica. A pesquisa-ação educacional está sendo realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) com alunos dos dois últimos períodos de cursos da área da saúde, utilizando uma abordagem qualitativa desenvolvida em quatro fases: (1) entrevistas iniciais para identificar o problema; (2) preparação para a intervenção; (3) oficina educativa como intervenção; e (4) entrevistas semiestruturadas de avaliação da intervenção. Espera-se que este estudo contribua para uma reflexão sobre a importância da formação médica específica em cuidados paliativos, ajudando a mitigar os estigmas que ainda cercam essa prática.

Palavras-chave: Cuidados paliativos Integrativos; Capacitação profissional;

TITLE: Palliative Care in the Training of Future Health Professionals: A Qualitative Study

Abstract

Palliative care is a philosophy of treatment applied to individuals of any age who are facing life-threatening illnesses. Its primary goal is to improve the quality of life for both the patient and their family members by preventing and relieving suffering, encompassing physical, psychosocial, and spiritual aspects. However, despite its fundamental importance, the lack of contact with the subject during undergraduate education constitutes a significant gap in the future practice of medicine. With this in mind, the current study aims to analyze students' knowledge of palliative care in order to develop strategies that promote its inclusion in the academic curriculum. This educational action research is being conducted at the Federal University of Rio

Grande do Norte (UFRN) with students in the final two semesters of health-related courses. It uses a qualitative approach developed in four phases: (1) initial interviews to identify the problem; (2) preparation for the intervention; (3) an educational workshop as the intervention; and (4) semi-structured interviews to evaluate the intervention. It is hoped that this study will contribute to a greater understanding of the importance of specific medical training in palliative care, helping to mitigate the stigmas that still surround this practice.

Keywords: Integrative Palliative Care; Professional Training;

Introdução

Historicamente, os Cuidados Paliativos eram concebidos como uma prática restrita a pacientes em fase terminal, sem perspectivas de cura. Contudo, essa concepção evoluiu significativamente, e a abordagem hoje é recomendada para ser iniciada precocemente, logo no diagnóstico de uma doença que ameace a continuidade da vida, atuando em paralelo aos tratamentos curativos (Gomes; Othero, 2016; Ortona et al., 2023; Volpon; Areco; Andrade, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define Cuidados Paliativos como "uma abordagem que melhora a qualidade de vida de pacientes e suas famílias que enfrentam problemas associados a doenças que ameaçam a vida, através da prevenção e alívio do sofrimento, por meio de identificação precoce, avaliação e tratamento impecáveis da dor e de outros problemas físicos, psicossociais e espirituais" (OMS, 2020).

Inicialmente focados em pacientes oncológicos, a atuação dos Cuidados Paliativos expandiu-se para englobar uma vasta gama de condições médicas potencialmente fatais, como doenças cardiovasculares, neurológicas, renais crônicas e a AIDS (Hermes; Lamarca, 2013). A essência dos Cuidados Paliativos reside no alívio do sofrimento e na promoção do conforto e da qualidade de vida do paciente e de seus familiares, distinguindo-se da medicina curativa por sua abordagem holística e integral (Gomes; Othero, 2016). Essa filosofia de cuidado abrange não apenas os aspectos físicos, mas também os psicossociais e espirituais, o que a torna uma prática em constante aprimoramento, com a adoção de protocolos baseados em evidências e modelos assistenciais pautados por boas práticas de gestão em saúde (Ortona et al., 2023).

No Brasil, os Cuidados Paliativos têm ganhado crescente notoriedade na última década, configurando-se como uma importante forma de assistência à saúde (Gomes; Othero, 2016). Estima-se que, no país, cerca de 625 mil pessoas necessitem desse tipo de cuidado, que visa aprimorar a qualidade de vida de indivíduos que enfrentam enfermidades crônicas, graves ou em estágio avançado (MS, 2022). A ausência de acesso adequado a essa modalidade de cuidado acarreta sofrimento desnecessário, internações prolongadas e, consequentemente, custos elevados para o sistema de saúde. Em resposta a essa demanda, o Ministério da Saúde instituiu a Política Nacional de Cuidados Paliativos (PNCP) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), através da Portaria GM/MS nº 3.681/2024. A implementação dessa política prevê a habilitação de 1,3 mil equipes em todo o país, com o foco no alívio da dor, controle de sintomas e apoio emocional (MS, 2022). No Rio Grande do Norte, por exemplo, a previsão é de 22 novas equipes (MS, 2022).

A PNCP, resultado da mobilização de especialistas e da sociedade, visa aprimorar serviços já existentes no SUS e reforça a importância dos Cuidados Paliativos como uma medida necessária para promover a qualidade de vida, prevenir e aliviar o sofrimento de pacientes e seus familiares diante de doenças que ameaçam a continuidade da vida (Carvalho; Parsons, 2012). Nesse cenário, a formação dos futuros profissionais de saúde assume um papel crucial.

Apesar da sua fundamental importância, o contato com os Cuidados Paliativos é ainda escasso na graduação, o que gera uma lacuna significativa na formação dos futuros profissionais. Diante disso, este estudo visa analisar o nível de conhecimento, as vivências e as percepções de estudantes dos anos finais de cursos da área da saúde a respeito dos Cuidados Paliativos, buscando subsidiar o desenvolvimento de estratégias educacionais que aprimorem a capacitação para essa prática.

Metodologia

Este estudo adota uma abordagem metodológica quantiquantitativa do tipo pesquisa-ação educacional. Essa escolha é particularmente pertinente para a investigação em Cuidados Paliativos, dada a natureza subjetiva e delicada da temática, que aborda questões como a finitude humana e a morte. A metodologia qualitativa permitirá não apenas investigar, mas também aprofundar a compreensão do impacto que o processo educativo pode exercer sobre a percepção e o preparo dos estudantes diante do contexto do adoecimento e do fim da vida.

A pesquisa-ação é uma metodologia que combina teoria e prática para resolver problemas sociais de forma colaborativa. Conforme Thiollent (2002), essa abordagem busca transformar a realidade social por meio da participação ativa dos envolvidos. Similarmente, Malheiros (2011) divide o processo em três etapas essenciais: 1) o diagnóstico e compreensão do problema; 2) a intervenção planejada com base no diagnóstico; e 3) a avaliação dos resultados da intervenção.

O estudo será realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e envolverá estudantes dos dois últimos períodos dos cursos de saúde, incluindo Medicina, Enfermagem, Fisioterapia, Farmácia, Nutrição, Psicologia, Serviço Social e Odontologia. A seleção dos participantes ocorrerá por meio de visitas às salas de aula, onde os pesquisadores informarão os estudantes sobre o propósito do estudo e os convidarão a participar.

A pesquisa-ação educacional será conduzida em quatro fases distintas:

Fase 1: Identificação do problema: Serão realizadas entrevistas com os estudantes dos dois últimos períodos dos cursos de saúde para coletar dados sobre seus conhecimentos, vivências e percepções acerca dos cuidados paliativos.

Fase 2: Preparação da intervenção: Com base na análise dos resultados das entrevistas iniciais, os pesquisadores planejarão o conteúdo e a estrutura da oficina educativa.

Fase 3: Intervenção: Uma oficina educativa será oferecida aos estudantes participantes, abordando os tópicos identificados como lacunas de conhecimento.

Fase 4: Avaliação: Entrevistas semiestruturadas serão conduzidas após a oficina para avaliar o impacto da intervenção no preparo e na percepção dos participantes sobre os cuidados paliativos.

Atualmente, o estudo está na fase de capacitação dos pesquisadores, que estão se preparando para a realização das entrevistas iniciais, utilizando um formulário com perguntas abertas desenvolvido pelo grupo de pesquisa.

Os dados coletados serão submetidos à análise de conteúdo temática categorial de Bardin (2004), que consiste nas seguintes etapas: pré-análise, exploração do material e tratamento, inferência e interpretação dos resultados.

A pesquisa seguirá rigorosamente as diretrizes e normas estabelecidas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que trata de pesquisas envolvendo seres humanos. O direito à confidencialidade e ao anonimato dos dados será garantido. Além disso, a participação dos estudantes será voluntária, mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que assegura a sua liberdade de retirar o consentimento em qualquer etapa do estudo, sem que isso acarrete prejuízos.

Resultados e Discussões

Espera-se que este estudo qualitativo forneça uma compreensão aprofundada sobre o conhecimento, as lacunas e as necessidades de formação dos estudantes da área da saúde em cuidados paliativos. A partir da análise dos dados coletados, será possível identificar as deficiências na abordagem do tema nos currículos acadêmicos, bem como as dificuldades percebidas pelos futuros profissionais em questões essenciais como o manejo do sofrimento, a comunicação com pacientes e suas famílias e o reconhecimento da própria finitude. Além disso, busca-se cumprir os objetivos propostos pela pesquisa: Analisar o conhecimento dos estudantes dos dois últimos anos dos cursos da área da saúde acerca dos cuidados paliativos; Identificar vivências significativas dos estudantes dos dois últimos ano dos cursos da área da saúde no acompanhamento (junto com os preceptores) de pacientes diagnosticados com uma doença que ameaça a vida; Compreender o processo de formação da área profissional de saúde e as aptidões em comunicação com pacientes e familiares diagnosticados com uma doença que ameaça a vida.

A intervenção planejada, por meio da oficina educacional, tem como resultado principal a capacitação dos participantes, aprimorando seu conhecimento teórico e suas habilidades práticas em cuidados paliativos. Além disso, a pesquisa pretende fomentar uma reflexão crítica sobre a necessidade de uma abordagem interprofissional na formação, incentivando o trabalho em equipe e o reconhecimento das competências de cada área no contexto do cuidado integral.

Os resultados finais deste estudo servirão como um subsídio empírico para a elaboração de estratégias de ensino mais eficazes. A expectativa é que eles forneçam as bases para a sugestão de inclusão de disciplinas, módulos ou

atividades que abordem os cuidados paliativos de forma mais abrangente nos currículos dos cursos de saúde da UFRN, alinhando a formação com as crescentes demandas do sistema de saúde.

Por fim, este projeto visa instrumentalizar os participantes na elaboração de projetos científicos e na redação de artigos para divulgação em periódicos. Essa prática não apenas contribui para a produção de conhecimento na área, mas também desenvolve habilidades de liderança, autonomia e gestão nos estudantes, preparando-os para atuar como futuros agentes de mudança na saúde.

Conclusão

Este estudo emerge como uma investigação promissora, com potencial para oferecer contribuições significativas à formação em saúde, sob uma perspectiva multiprofissional. A partir dos resultados, será possível subsidiar o desenvolvimento de uma estratégia de ensino que capacite os futuros profissionais para o trabalho em equipe no contexto dos cuidados paliativos, especialmente no que se refere à integração de conhecimentos e habilidades entre as diferentes áreas da saúde. Essa abordagem pode, inclusive, influenciar a reestruturação curricular dos cursos de graduação, visando suprir a carência de disciplinas e espaços que fomentem a atuação interprofissional.

Além de sua contribuição direta para o campo dos cuidados paliativos, o projeto visa instrumentalizar os participantes na produção de conhecimento científico. Ao longo do processo, os estudantes terão a oportunidade de aprimorar suas competências em elaboração de projetos de pesquisa, identificação de abordagens metodológicas e análise de dados, bem como na redação e divulgação de trabalhos científicos em periódicos. Adicionalmente, o desenvolvimento do estudo em um período determinado exige o aprimoramento de habilidades de liderança, autonomia e gestão, essenciais para a execução eficaz do projeto e o cumprimento de seus objetivos.

Referências

BARDIN, Laurence. *Análise de Conteúdo*. Lisboa: Edições 70, 2004. BERNARDET, Jean-Claude. *O corpo crítico*. São Paulo: Companhia das Letras, 2021.

CAPUTO, Rodrigo Feliciano. O homem e suas representações sobre a morte e o morrer: um percurso histórico. **Rev. Multidisciplinar da Unesp**. [Internet], p. 73-80, 2008.

CARVALHO, Ricardo Tavares de; PARSONS, Henrique Afonseca. **Manual de cuidados paliativos ANCP**. In: *Manual de cuidados paliativos ANCP*. 2012. p. 590-590.

DADALTO, Luciana. *Cuidados Paliativos: aspectos jurídicos*. São Paulo: Editora Foco, 2021

GOMES, Ana Luisa Zaniboni; OTHERO, Marília Bense. Cuidados paliativos. **Estudos Avançados**, v. 30, n. 88, p. 155-166, 2016.

HERMES, Hélida Ribeiro; LAMARCA, Isabel Cristina Arruda. Cuidados paliativos: uma abordagem a partir das categorias profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 2577-2588, 2013.

HOUAISS, Antônio. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva, 2021.

LEVETOWN, Marcia; COMMITTEE ON BIOETHICS. Communicating with children and families: from everyday interactions to skill in conveying distressing information. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. e1441-e1460, 2008

MALHEIROS, Bruno T. Metodologia da pesquisa em educação. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO; CONSELHO NACIONAL DE EDUCAÇÃO. Parecer CNE/CES nº 265/2022. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p. 95, 3 nov. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde lança Política Nacional de Cuidados Paliativos. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/ministerio-da-saude-lanca-politica-nacional-de-cuidados-paliativos/#:~:text=A>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Cuidados Paliativos no âmbito do SUS. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 10, 15 jan. 2024. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/images/Resolucoes/2023/RESOLUO_N_729_-_DOU_15012024.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2025.

MONTEIRO, Renata da Silva Fontes; SILVA, Aluísio Gomes da. Advance directive: historical course in Latin America. **Revista Bioética**, v. 27, p. 86-97, 2019. OMS. Palliative care. Genebra, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/palliative-care> . Acesso em: 20 jul. 2025.

ORTONA, Concília et al. Cuidados paliativos: da clínica à bioética. 2023.

RIBEIRO, Júlia Rezende; POLES, Kátia. Cuidados paliativos: prática dos médicos da estratégia saúde da família. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 43, p. 62-72, 2019.

THIOLLENT, Michel. Metodologia da pesquisa-ação. São Paulo: Editora Cortez, 2002.

VOLPON, Leila Costa; ARECO, Nichollas Martins; ANDRADE, Verônica Ribeiro e. Cartilha sobre cuidados paliativos pediátricos para familiares e pacientes. São Paulo, Academia Nacional de Cuidados Paliativos, 2021.

CÓDIGO: SB0304

AUTOR: EDILANE MARTINS DA SILVA

ORIENTADOR: SILVIA REGINA BATISTUZZO DE MEDEIROS

TÍTULO: Análise do efeito do Material Particulado (MP) oriundo da queima da cana-de-açúcar sobre a metilação global.

Resumo

A poluição do ar apresenta-se como um fator de risco para o desenvolvimento de muitas doenças relacionadas à exposição às partículas presentes na atmosfera, sendo uma ameaça à saúde humana. Diante deste cenário, este estudo tem o propósito de avaliar o efeito do Material Particulado (MP) da queima da cana-de-açúcar e de outros elementos poluentes presentes no ar da região de Ribeirão Preto – São Paulo/Brasil, sobre o padrão de metilação global em células da linhagem pulmonar A549. Para tanto, foram realizados ensaios de viabilidade celular em diferentes concentrações de MP em 1,25 nM (38,5 µg/mL), 2,5 nM (77 µg/mL), 5 nM (155 µg/mL), 10 nM (310 µg/mL) e 15 nM (465 µg/mL), em dois tempos de exposição: 24h e 72h. Observou-se que as concentrações de MP a partir de 2,5 nM no ensaio de 72h apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular, revelando que o material particulado pode ter um efeito citotóxico. De modo que esses resultados contribuem para o prosseguimento da pesquisa acerca do seu efeito sobre a epigenética em células A549.

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 presents itself as a risk factor for the development of many diseases related to exposure to particles present in the atmosphere, being a threat to human health. In this scenario, this study aims to evaluate the effect of Particulate Matter (PM) from sugarcane burning and other polluting elements present in the air of the region of Ribeirão Preto – São Paulo/Brazil, on the global methylation pattern in A549 lung cell line. For this purpose, cell viability assays were performed at different concentrations of PM at 1.25 nM (38.5 µg/mL), 2.5 nM (77 µg/mL), 5 nM (155 µg/mL), 10 nM (310 µg/mL), and 15 nM (465 µg/mL), at two exposure times: 24h and 72h. It was observed that PM concentrations from 2.5 nM in the 72h assay showed a significant reduction in cell viability, revealing that particulate matter may have a cytotoxic effect. Thus, these results contribute to the continuation of the research on its effect on epigenetics in A549 cells.

Keywords: Air Pollution. Particulate Matter. Global DNA Methylation.

Introdução

A poluição atmosférica apresenta-se como um dos problemas ambientais mais relevantes da atualidade, representando sérias ameaças à saúde humana e sendo um dos fatores responsáveis pela mortalidade em todo o mundo (Ghazi Terisha et al., 2021). As partículas presentes na atmosfera são compostas por uma variedade de elementos, incluindo metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outras partículas potencialmente prejudiciais para a saúde (Gu et al., 2024).

Dentre os elementos que constituem a poluição do ar, tem-se o Material Particulado (MP) que pode servir como um indicador de poluição do ar, oriundo tanto de ações humanas como de atividades naturais, além de alcançar grande extensão na atmosfera e ficar suspenso por um vasto tempo, de modo que pode afetar significativamente a vida humana, ao possibilitar o aparecimento de muitas doenças (Kim, Kabir e Kabir, 2012).

Como publicado no The lancet oncology em 2013, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), pertencente a Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio de investigações epidemiológicas, classificou como cancerígeno para os seres humanos a poluição do ar exterior e as partículas provenientes desta poluição atmosférica, ao ter-se observado um aumento no risco de cancer do pulmão, principalmente, na Europa, América do Norte e Ásia, mais informações acerca dos resultados podem ser obtidos nas monografias da IARC, volume 109 (Loomis et al, 2013).

Posteriormente, a Organização Mundial de Saúde, (2021), divulgou dados atualizados em relação às recomendações acerca das diretrizes de qualidade do ar para: material particulado (MP_{2,5}µm e MP₁₀µm), ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e monóxido de carbono, em especial, referente ao material particulado de diâmetro igual ou inferior a 10µm e 2,5µm, que apresentou-se significativas evidências dos riscos a exposição a essas partículas, decorrentes da sua alta capacidade de penetrabilidade no sistema respiratório, o que resulta em ameaças para a saúde humana.

Mais recentemente, em fevereiro de 2025, a IARC divulgou um estudo através do The Lancet Respiratory Medicine, que analisou as variações globais do surgimento de câncer de pulmão em 2022, e ao longo do tempo, dentre os resultados apresentados pelo estudo, verificou-se que a variação geográfica na ocorrência de adenocarcinoma foi atribuída a poluição ambiental, em especial, pelo material particulado em 2022, e em todo o mundo (Luo et al., 2025).

Ademais, outros estudos já associam que a exposição à poluição presente no ar pode causar ainda alterações epigenéticas, como a metilação do DNA (Rider e Carlsten, 2019). Sendo as alterações epigenéticas entendidas como modificações que ocorrem na cromatina sem causar alterações na sequência nucleotídica do DNA (Kaneko e Choudhuri, 2017). Dentre as alterações epigenéticas que será estudada neste trabalho, tem-se a metilação do DNA, a qual corresponde a uma alteração química envolvendo a adição de um grupo metil no quinto carbono das citosinas, frequentemente, no dinucleotídeos CpG, ocasionando a formação da 5-metilcitosina (5-mC), sendo está a principal maneira de metilação do DNA (Gu et al., 2024; Moen El et al., 2015; Lisanti et al., 2013).

Sob essa perspectiva, estudos já associam alterações epigenéticas com a exposição à poluição do ar, como ao material particulado MP_{2,5}µm e MP₁₀µm, em especial, ao MP_{2,5}µm por apresentar um pequeno diâmetro, tem capacidade de penetrar até os alvéolos e, uma vez ultrapassando a membrana, chegar até a circulação, causando inflamações sistêmicas e alterações epigenéticas (Li et al., 2017).

Objetivo

Geral

Avaliar o efeito do Material Particulado (MP) oriundo da queima da cana-de-açúcar e de outras partículas presentes no ar na região de Ribeirão Preto – São Paulo, sobre a epigenética em células de linhagem pulmonar A549.

Específicos

- avaliar a citotoxicidade deste material particulado;
- avaliar seu efeito no padrão de metilação global.

Metodologia

O percurso metodológico do presente trabalho compreender os seguintes ensaios experimentais:

- 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 fotométrica das placas e avaliação semiautomática, além de requerer pouco tempo para sua realização e serem de simples aplicação.
- 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.
- Análise de Restrição Combinada com Bissulfito (COBRA): Este 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, sendo a primeira, o tratamento do DNA genômico 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 metiladas nos produtos da amplificação (Xiong e Laird, 1997; Yang et al., 2004).
- Eletroforese em Gel: Esta técnica será usada 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).

- 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

O presente estudo, inicialmente, avaliou o efeito citotóxico de diferentes concentrações de material particulado (MP) proveniente da queima da cana-de-açúcar e de outras partículas atmosféricas coletadas na região de Ribeirão Preto – SP, utilizando o ensaio de Ensaio de Sal de Tetrazólio (MTT) em células A549. Estas foram expostas a diferentes tratamentos por dois períodos distintos, 24 h e 72 h, a fim de investigar a influência tanto da dose quanto do tempo de exposição sobre a viabilidade celular e seu possível efeito citotóxico.

No primeiro ensaio de MTT realizado, em no mínimo triplicata para o tempo de 24h, as células foram expostas a diferentes concentrações de MP 1,25 nM (38,5 µg/mL), 2,5 nM (77 µg/mL), 5 nM (155 µg/mL), 10 nM (310 µg/mL) e 15 nM (465 µg/mL). No que diz respeito à menor concentração de material particulado 1,25 nM (equivalente a 38,5 µg/mL), não apresentou queda expressiva da viabilidade celular em relação ao controle negativo (black filter a 0,1% de DMSO), mantendo valores próximos do controle negativo, e muito superiores ao controle positivo (BaP 1 µg/mL). Isso indica que nessa concentração baixa, o material particulado não afetou a viabilidade celular de modo significativo em 24h.

Ademais, ainda no ensaio de 24 h com concentrações maiores é vista uma tendência geral de diminuição da viabilidade com o aumento da concentração, mas o padrão é menos consistente que no ensaio de 72h, apresentado com detalhes adiante. As exposições às concentrações de 2,5 nM e 5 nM indicam redução da viabilidade celular, porém, em testes estatísticos realizados como a análise de variância (ANOVA), não apresentaram resultado significativo. Referente às

concentrações de 10 nM (310 µg/mL) e 15 nM (465 µg/mL), apresentam queda acentuada de viabilidade das células A549, ainda que menos pronunciada que no tempo de 72h, mas mostrou-se por meio da análise ANOVA, uma queda significativa de viabilidade celular.

No ensaio de 72h, também realizado em triplicata com as mesmas concentrações, observa-se uma redução consistente na viabilidade celular com o aumento da concentração. tendo-se o controle negativo (black filter a 0,1% de DMSO), com viabilidade 100%, enquanto o controle positivo (BaP 1 µg/mL) apresentou queda acentuada. Analisando a menor concentração testada (1,25 nM, equivalente a 38,5 µg/mL) mostrou viabilidade próxima ao controle negativo, mostrando-se não afetar significativamente a viabilidade celular em ambos os tempos de 24h e de 72h. No entanto, a partir de 2,5 nM (77 µg/mL), a viabilidade decai para cerca de 60%, e em 5 nM (155 µg/mL) para aproximadamente 50%, os resultados apresentam que a viabilidade vai diminuindo ainda mais em concentrações mais altas de 10 nM (310 µg/mL) e 15 nM (465 µg/mL), chegando aproximadamente a 20%.

Este perfil sugere efeito citotóxico, com resposta dose-dependente bem definida após 72h de exposição ao material particulado. De forma geral, os dados sugerem que o material particulado oriundo da queima da cana-de-açúcar e de outras partículas presentes na atmosfera da região de Ribeirão Preto – SP, apresenta efeito citotóxico, levando a morte das células expostas dependente tanto da dose quanto do tempo de exposição, sendo mais marcante e consistente no ensaio de 72h.

A partir dos resultados obtidos no ensaio de MTT, foi possível identificar a concentração de material particulado mais adequada para seguir com os próximos experimentos do projeto. Sendo a concentração de 2,5 nM (77 µg/mL) do material particulado selecionada devido a ter apresentado redução moderada, permitindo manter viabilidade celular suficiente para a realização de análises subsequentes.

Com base nisso, as células A549 foram expostas ao material particulado de 2,5 nM (77 µg/mL) e ao controle negativo (0,1% de DMSO), seguido da extração do DNA destas células. Todas as extrações foram realizadas em triplicata para o tempo de 24h e de 72h; todo o procedimento foi executado conforme as instruções sugeridas pelo kit de extração. Em seguida, também realizou-se a quantificação do DNA em um espectrofotômetro NanoDrop, o qual avaliou a pureza e a concentração do DNA em ng/uL de amostra extraída. De modo que estes resultados serão utilizados para a realização de ensaios seguintes de metilação global do DNA, visando investigar potenciais modificações epigenéticas induzidas pelo material particulado.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que o material particulado (MP) proveniente da queima da cana-de-açúcar e outras partículas atmosféricas da região de Ribeirão Preto (SP) exerce efeito citotóxico sobre as células A549. A citotoxicidade observada foi dependente da dose e do tempo de exposição, com efeito mais acentuado após 72 horas. Ademais, recomenda-se que pesquisas futuras explorem a análise da expressão das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), a fim de

compreender melhor os mecanismos epigenéticos envolvidos, como também ampliar os estudos para outras linhagens celulares, visando uma compreensão mais abrangente dos seus efeitos biológicos. Em suma, destaca-se a importância deste trabalho para integrar a pesquisa básica e contribuir para o avanço do conhecimento acerca dos impactos moleculares da poluição do ar oriunda da queima da biomassa sobre os processos epigenéticos, dando destaque para o desenvolvimento e planejamento de estratégias de saúde pública e políticas ambientais que reduzam a exposição humana a poluentes atmosféricos.

Referências

GHAZI, Terisha et al. Prenatal air pollution exposure and placental DNA methylation changes: implications on fetal development and future disease susceptibility. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3025, 2021.

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**, p. 172087, 2024.

KANEKO, Kotaro; CHOUDHURI, Supratim. Epigenetics in reproduction and development. In: **Reproductive and developmental toxicology**. Academic Press, 2017. p. 1005-1021.

KIM, Ki-Hyun; KABIR, Ehsanul; KABIR, Shamin. A review on the human health impact of airborne particulate matter. **Environment international**, v. 74, p. 136-143, 2015.

LADEIRA, Pedro Ribeiro Soares de; ISAAC, Cesar; FERREIRA, Marcus Castro. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev. med.(São Paulo)**, p. 47-51, 2011.

LI, Jinghong et al. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. **The clinical respiratory journal**, v. 11, n. 5, p. 539-546, 2017.

LISANTI, Sofia et al. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79044, 2013.

LOOMIS, Dana et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. **The lancet oncology**, v. 14, n. 13, p. 1262-1263, 2013.

LUO, Ganfeng et al. Estimated worldwide variation and trends in incidence of lung cancer by histological subtype in 2022 and over time: a population-based study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 13, n. 4, p. 348-363, 2025.

Moen EL, Mariani CJ, Zullo H, Jeff-Eke M, Litwin E, Nikitas JN, et al. New themes in the biological functions of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. **Immunol Rev.** 2015;263:36–49.

MOORE, Lisa D.; LE, Thuc; FAN, Guoping. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 2013.

OLIVEIRA, Evelyn et al. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

RIDER, Christopher F.; CARLSTEN, Chris. Air pollution and DNA methylation: effects of exposure in humans. **Clinical epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 131, 2019.

STOCKERT, Juan C. et al. 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.

World Health Organization. (2021). WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. **World Health Organization**. <https://iris.who.int/handle/10665/345329>. Licença:CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

XIONG, Zhenggang; LAIRD, Peter W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 12, p. 2532-2534, 1997.

YANG, A. S. et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 3, p. e38-e38, 2004.

CÓDIGO: SB0308

AUTOR: MARIA LETICIA DA COSTA

COAUTOR: YANKA DO VALE CARVALHO

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Efeito do agonista seletivo para o adrenoceptor $\alpha 1A$ oximetazolina sobre a memória e aprendizado de camundongos

Resumo

A noradrenalina participa de processos cognitivos relevantes, mas o papel dos seus receptores, particularmente os adrenoceptores $\alpha 1A$ ($\alpha 1A$ -AR), na memória ainda é controverso. Este estudo investigou os efeitos da oximetazolina, agonista parcial seletivo para $\alpha 1A$ -AR, sobre a consolidação da memória de reconhecimento em camundongos Swiss. Animais foram tratados por via oral com oximetazolina (0,01; 0,1; 1 mg/kg) imediatamente após a fase de treino do teste de reconhecimento de objetos (TRO). A donepezila (3 mg/kg) foi utilizada como controle positivo, validando o protocolo experimental ao promover melhora significativa da memória. Os resultados mostraram que a oximetazolina não produziu efeito pró-cognitivo robusto, apresentando apenas interação tratamento x sessão com significância estatística limítrofe ($p = 0,0429$). Além disso, não foram observadas alterações no tempo total de exploração, descartando efeitos motores. A ausência de benefício pode estar associada à afinidade da oximetazolina por receptores $\alpha 2A$, cujo acionamento está relacionado à redução da liberação de noradrenalina. Conclui-se que a ativação seletiva de $\alpha 1A$ -AR pode representar uma estratégia mais promissora para o desenvolvimento de terapias voltadas a déficits cognitivos.

Palavras-chave: alfa 1A-adrenoceptor. memória. oximetazolina. reconhecimento de objet

TITLE: Effect of the selective $\alpha 1A$ -adrenoceptor agonist oxymetazoline on memory and learning in mice

Abstract

Norepinephrine plays a role in relevant cognitive processes, but the contribution of its receptors, particularly the $\alpha 1A$ -adrenoceptors ($\alpha 1A$ -AR), to memory remains controversial. This study investigated the effects of oxymetazoline, a partial selective agonist for $\alpha 1A$ -AR, on the consolidation of recognition memory in Swiss mice. Animals were treated orally with oxymetazoline (0.01, 0.1, 1 mg/kg) immediately after the training phase of the object recognition test (ORT). Donepezil (3 mg/kg) was used as a positive control, validating the experimental protocol by significantly improving memory performance. Results showed that oxymetazoline did not produce a robust pro-cognitive effect, presenting only a borderline treatment $\times$ session interaction with statistical significance ($p = 0.0429$). Moreover, no changes were observed in the total exploration time, ruling out motor effects. The absence of

cognitive benefit may be related to oxymetazoline's affinity for α_2 A-adrenoceptors, whose activation is associated with reduced norepinephrine release. In conclusion, selective activation of α_1 A-AR may represent a more promising strategy for the development of therapies targeting cognitive deficits.

Keywords: alpha 1A-adrenoceptor. memory. oxymetazoline. object recognition test.

Introdução

INTRODUÇÃO

Apesar das evidências demonstrando a influência da noradrenalina em muitos processos cognitivos no cérebro, a função dos α_1 -AR na aprendizagem e memória ainda é controversa, sendo avaliada principalmente por animais transgênicos. É descrito que a aprendizagem e a memória foram facilitadas e inibidas pela estimulação dos α_1 -AR (Sirviö & MacDonald, 1999). Essas discrepâncias podem ser explicadas em parte pelas funções separadas e distintas dos subtipos α_1 A, α_1 B e α_1 D. Vários estudos relatam que o aprendizado, a memória e a plasticidade sináptica são facilitadas em camundongos geneticamente modificados que expressam uma forma constitutivamente ativa do α_1 A-AR. Já os camundongos knockout para o α_1 A-AR mostraram função cognitiva pobre, sugerindo que a estimulação em longo prazo dos α_1 A-AR poderia melhorar a função cognitiva em camundongos (Doze et al., 2011; Perez, 2020, 2023; Perez & Doze, 2011).

Dado que o α_1 A-AR é o subtipo de adrenoceptor predominante no sistema nervoso central, e considerando a escassez de pesquisas que empregam ferramentas farmacológicas para investigar seu papel em processos cognitivos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a explorar os efeitos da tansulosina. Este fármaco é um antagonista seletivo dos α_1 A-AR, comumente utilizado no tratamento clínico da hiperplasia prostática benigna, e foi estudado em relação ao seu impacto na memória de reconhecimento de objetos em camundongos. Observamos que a administração aguda de tansulosina, nas doses de 0,01 e 0,001 mg/kg (via oral), influenciou negativamente a aquisição, consolidação e evocação da memória de reconhecimento de objetos (Dados em preparação para publicação). No entanto, ainda não há estudos suficientes que utilizam agonistas seletivos do α_1 A-AR, observando o seu impacto sobre a memória e aprendizado, assim como os possíveis mecanismos envolvidos. Tais estudos se fazem necessários, pois, se provado uma ação benéfica sobre processos cognitivos, tais fármacos poderiam ser uma estratégia farmacológica para o tratamento de condições como a demência senil e o Alzheimer. De fato, é sugerido que aumentar a atividade dos α_1 A-AR poderia reduzir o déficit cognitivo em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer (Perez, 2020, 2023).

Agonistas dos α_1 -AR são uma classe de fármacos usados no manejo de muitos distúrbios, incluindo choque vasodilatador, hipotensão, hipoperfusão, choque séptico, parada cardiopulmonar, descompensação da insuficiência cardíaca, bem como outras condições de menor gravidade, como congestão nasal. Exemplos de agonistas dos α_1 -AR, em uso clínico, incluem noradrenalina, adrenalina, fenilefrina e metoxamina, e oximetazolina (II & Reddivari, 2023). Dentre os fármacos de interesse clínico, a oximetazolina é classificada como um agonista parcial seletivo para o subtipo de adrenoceptor α_1 A (Haenisch et al., 2010; Hone et al., 1995), sendo empregada principalmente para o tratamento de congestão nasal, eritema facial devido à rosácea e reações alérgicas oftálmicas. É relatado a ocorrência de reações adversas, após administração intranasal, no sistema nervoso central (ex. ansiedade,

insônia, convulsões), indicando que tal fármaco pode ultrapassar a barreira hematoencefálica (Dokuyucu et al., 2015). Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos relacionados à memória e aprendizado a partir do tratamento agudo da oximetazolina com diferentes dosagens (0,01, 0,1 e 1 mg/kg) em camundongos no teste de reconhecimento de objeto (TRO);

Metodologia

METODOLOGIA

Animais: Neste estudo foram usados camundongos Swiss machos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os locais onde eles estavam confinados possuíam comida e água de livre acesso, ciclo de luz 12 horas claro- escuro (luzes acesas às 6:00 horas) e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Sendo assim, todos os procedimentos realizados seguiram as diretrizes estabelecidas pela Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob o protocolo nº 003/2023.

Drogas e tratamento: A oximetazolina, um agonista parcial e seletivo para os adrenoreceptores $\alpha 1\text{A}$ (Rang et. al., 2016) foi usada nas dosagens de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg por via oral (gavagem) imediatamente após o fase de treino (2º dia) do teste comportamental. Além disso, o grupo controle recebeu salina pela mesma via e volume que os animais tratados.

Teste comportamental: O teste de reconhecimento de objetos (TRO) é amplamente utilizado para avaliar a memória de curto e longo prazo em roedores (Antunes; Bialesky, 2017). Sendo assim, foi escolhido esse teste, uma vez que ele consegue avaliar o efeito dos fármacos em relação ao esquecimento natural. O TRO constitui de três fases: habituação, treinamento e teste. Na primeira fase (habituação), o animal pode explorar livremente o campo aberto durante 30 minutos; na fase de treinamento, são colocados dois objetos idênticos para o camundongo explorar durante 10 minutos; e por fim, na fase teste um dos objetos da etapa anterior é substituído por um novo (Lueptow, 2017). Para calcular o índice de reconhecimento de objeto aplica-se a fórmula: $\text{Tempo usado para explorar o novo objetivo} / (\text{Tempo usado para explorar o novo objeto} + \text{Tempo usado para explorar o objeto familiar})$ (Denninger; Smith; Kirby, 2018). Portanto, os critérios levados em consideração são quando o animal toca no objeto ou sobe com as duas patas da frente no objeto.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Para investigar o papel da ativação de $\alpha 1\text{A-AR}$ na consolidação da memória, foram avaliados os efeitos dos fármacos Cirazolina e Oximetazolina no teste de reconhecimento de objetos (TRO) de longo prazo em camundongos Swiss. A administração das substâncias (fármacos e veículo) ocorreu imediatamente após a sessão de treino, com intuito de focar seus efeitos sobre os processos específicos de consolidação da memória. Inicialmente, o paradigma experimental foi validado por meio da Donepezila, um inibidor reversível da acetilcolinesterase reconhecido por seus efeitos pró-cognitivos, utilizada como controle positivo (WILSON; STEVENSON, 2015). A análise de variância (ANOVA) de duas vias foi

utilizada para comparar o tempo de exploração dos objetos familiares e o novo entre os grupos tratados e controle, assim, confirmando a sensibilidade do teste.

Foi observado que os animais que receberam a dosagem de 3 mg/kg de Donepezila exploraram significativamente mais o objeto novo em comparação ao familiar, evidenciado por uma interação tratamento x sessões estatisticamente significativa [$F(1, 10) = 8,083$; $p = 0,0175$], como pode ser visto na Figura 1 (A). Além disso, a ANOVA de uma via para tempo total de exploração, não revelou diferença significativa entre os grupos (Figura 1, B). Esses achados validam o protocolo do TRO como um ensaio adequado para detectar a melhora na consolidação da memória nesta linhagem animal.

A etapa subsequente consistiu na avaliação dos efeitos da oximetazolina em camundongos no TRO. A ANOVA de duas vias para este fármaco (Figura 2, C) revelou uma interação tratamento x sessões com significância estatística limítrofe [$F(1, 40) = 4,372$; $p = 0,0429$]. Embora o valor de p seja inferior ao nível alfa convencional de 0,05, a proximidade com o limiar e o valor de F relativamente baixo indicam que a magnitude da diferença entre os grupos foi modesta em comparação à variabilidade intragrupal. Além disso, a ANOVA de uma via para o tempo total de exploração dos objetos (Figura 2, D) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos [$F(3, 39) = 1,001$; $p = 0,4026$], o que constitui um controle importante, descartando a hipótese de que o fármaco tenha induzido efeitos motores (hipo ou hiperlocação) capazes de comprometer a interpretação do desempenho no teste de memória.

DISCUSSÃO

A administração pós-treino da Oximetazolina, agonista parcial seletivo para $\alpha 1A$ -AR, não resultou em melhora consistente na consolidação da memória de reconhecimento. Embora a análise estatística tenha indicado um valor de p próximo ao limiar de significância ($p = 0,0429$), a interpretação desse achado deve ser feita com cautela. Somado a isso, o baixo valor da estatística F sugere que a magnitude do efeito foi modesta e de possível relevância biológica limitada, não configurando um sinal farmacológico robusto.

A ausência de efeito pró-cognitivo pode ser explicada pelo perfil farmacológico misto da Oximetazolina. Embora seja considerado um agonista seletivo dos $\alpha 1A$ -AR, este fármaco também possui alta afinidade pelos $\alpha 2A$ -AR (TOBIAS; CARTABUKE; TAGHON, 2014). Desta forma, é sabido que a ativação dos $\alpha 2A$ -AR no sistema nervoso central reduz a liberação de noradrenalina, mecanismo associado a sedação e a alterações atencionais que podem neutralizar ou mascarar potenciais benefícios cognitivos mediados pela via $\alpha 1A$ -AR. Além disso, destaca-se que a ativação dos receptores $\alpha 2A$ -AR, em regiões específicas do cérebro, está relacionada à melhora do desempenho da memória de trabalho (ARNSTEN, 2011), e não da memória episódica de longo prazo, que constitui o foco do presente estudo.

No mais, a ausência de diferenças no tempo total de exploração entre os grupos demonstra que o resultado não foi influenciado por um efeito motor sedativo evidente, reforçando a conclusão de que, nas condições experimentais avaliadas, a oximetazolina nas suas três dosagens não modulou de forma significativa os processos de consolidação da memória.

Conclusão

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração pós-treino da oximetazolina (agonista adrenérgico parcial seletivo para $\alpha 1A$ -AR) não produziu um efeito pró-cognitivo convincente nos camundongos, como observado com o controle positivo Donepezila. Este achado sugere que, embora a molécula tenha penetrado no cérebro, a sua atividade mista como agonista dos receptores $\alpha 1A$ e $\alpha 2A$ pode ter introduzido efeitos antagônicos que neutralizam seu potencial pró-mnemônico. A seletividade farmacológica, portanto, emerge como um fator determinante para o desfecho comportamental, indicando que a ativação exclusiva dos $\alpha 1A$ -AR pode ser mais benéfica para a consolidação da memória. Estes resultados direcionam a pesquisa futura para a utilização de agonistas mais seletivos para o adrenoceptor $\alpha 1A$, com a finalidade de desenvolver novas estratégias farmacológicas para a modulação da memória e do aprendizado.

Referências

REFERÊNCIAS

- DENNINGER, JIYEON K.; SMITH, BRYON M.; KIRBY, ELIZABETH D. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *Journal of Visualized Experiments*, [S.l.], n. 141, 20 nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3791/58593>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6800058/>. Acesso em: 12 ago. 2025
- 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/](https://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 $\alpha 1A$ -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>
- GRAHAM, ROBERT M. Adrenergic receptor subtypes: characterization and distribution. *Pharmacological Reviews*, Bethesda, v. 42, n. 2, p. 95–115, jun. 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2164898/>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- 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>
- 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/>

LUEPTOW, LINDSAY M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal of Visualized Experiments*, [S.l.], n. 126, p. e55718, 30 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3791/55718>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5614391/>. Acesso em: 12 ago. 2025.

PEREZ, D. M. (2020). α 1-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. (2023). α 1-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>

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. Tradução da 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ANTUNES, M.; BIALESKY, G. D. Object recognition test: a simple and effective method for evaluating memory in rodents. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, [S.l.], v. 39, n. 3, p. 223–230, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5614391/>. Acesso em: 27 jul. 2025.

SCHWINN, DEBRA A.; ROEHRBORN, CLAUS G. α 1-Adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *International Journal of Urology*, v. 15, n. 3, p. 193–199, mar. 2008. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2007.01956.x. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2329815/>. Acesso em: 13 ago. 2025.

HAENISCH, BRITTA et al. Alpha-adrenoceptor agonist-induced changes in blood pressure in mice: differences between oxymetazoline and xylometazoline. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 381, n. 1, p. 83-94, 2010. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00210-009-0464-y>.

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](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00017-0)

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/>. Acesso em: 22 ago. 2025.

WILSON, D. A.; STEVENSON, 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/>. Acesso em: 22 ago. 2025.

Anexos

(A) Tempo de exploração, em segundos, do objeto familiar e do objeto novo por camundongos Swiss tratados com veículo ou Donepezila (3 mg/kg, v.o.). (B) Tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de teste. Cada barra representa a média $\pm$ erro p

(C) Tempo de exploração, em segundos, do objeto familiar e do objeto novo por camundongos Swiss tratados com veículo ou Oximetazolina (0,01; 0,1; 1 mg/kg, v.o.) imediatamente após a fase de treino. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão d

CÓDIGO: SB0310

AUTOR: MARIA BEATRIZ LAURENTINO DOS SANTOS

COAUTOR: HENRIQUE DOUGLAS DOS SANTOS BORBUREMA

COAUTOR: SAVIO LAIR CAVALCANTE SILVEIRA

ORIENTADOR: ELIANE MARINHO SORIANO

TÍTULO: Avaliação do potencial da macroalga *Gracilaria caudata* em sistema de aquicultura multitrófica para mitigação dos efeitos das mudanças climáticas

Resumo

Este estudo avaliou o desempenho da macroalga *Gracilaria caudata* em cultivo integrado multitrófico como biofiltro para reduzir o excesso de nutrientes produzido pelo cultivo do camarão *Penaeus vannamei* em sistemas de recirculação de água (RAS - Recirculating Aquaculture System). O experimento consistiu em dois sistemas de recirculação de água: um mantido sob temperatura ambiente (28°C: RAS-ambiente) e outro aquecido a 32°C (+ 4°C – projeção do IPCC – RAS-aquecido). Os parâmetros ambientais (temperatura, salinidade, O₂ dissolvido, pH e nutrientes) foram monitorados diariamente. A taxa de crescimento relativa das algas e seu conteúdo de nitrogênio e fósforo foram determinados a cada semana. Os parâmetros ambientais variaram significativamente entre tratamentos ($p < 0,001$), com valores de temperatura e salinidade maiores no RAS-aquecido. Os valores de oxigênio dissolvido, assim como o pH, foram mais elevados nos tratamentos controle. As concentrações de nutrientes na água foram mais elevadas nos tratamentos RAS em comparação aos tratamentos controles ($p < 0,001$). *G. caudata* apresentou uma média de crescimento de 2% por dia durante o experimento, exceto no tratamento RAS-aquecido nas últimas semanas do experimento, nas quais a macroalga não apresentou crescimento. O conteúdo de N e P aumentou consideravelmente nas algas cultivadas nos RAS, sugerindo que a macroalga é uma candidata potencial para ser usada como biorremediadora de nutrientes em sistemas de carcinicultura.

Palavras-chave: macroalga; RAS; biofiltro; nutrientes; mudanças climáticas.

TITLE: Evaluation of the potential of the macroalga *Gracilaria caudata* in a multitrophic aquaculture system to mitigate the effects of climate change

Abstract

This study evaluated the performance of the macroalga *Gracilaria caudata* in integrated multitrophic aquaculture as a biofilter to reduce excess nutrients produced by the cultivation of the shrimp *Penaeus vannamei* in recirculating aquaculture systems (RAS - Recirculating Aquaculture System). The experiment consisted of two recirculating aquaculture systems: one maintained at ambient temperature (28°C: ambient-RAS) and the other warmed to 32°C (+ 4°C – IPCC projection – warmed-RAS). Environmental parameters (temperature, salinity, dissolved oxygen, pH, and nutrients) were monitored daily. The relative growth rate of the macroalga and its nitrogen and phosphorus content were determined weekly. Environmental

parameters varied significantly among treatments ($p < 0.001$), with higher temperature and salinity values in the warmed-RAS. Dissolved oxygen values, as well as pH, were higher in the control treatments. Water nutrient concentrations were higher in the RAS treatments compared to the control treatments ($p < 0.001$). *G. caudata* showed an average growth rate of 2% per day during the experiment, except in the warmed-RAS in the last weeks of the experiment, during which the macroalga showed no growth. N and P contents increased considerably in the algae cultivated in the RAS treatments, suggesting that the macroalga is a potential candidate for use as nutrient bioremediator in shrimp farming systems.

Keywords: macroalgae; RAS; biofilter; nutrients, climate change.

Introdução

As mudanças climáticas globais, evidenciadas pelo aumento da temperatura média e intensificação de eventos climáticos extremos, representam desafios crescentes para a aquicultura (Pirani et al. 2024). O setor, altamente dependente da estabilidade ambiental, encontra-se em situação de vulnerabilidade frente aos cenários projetados pelo IPCC, que preveem impactos significativos na produtividade e na saúde dos organismos cultivados (Froehlich et al. 2018; FAO 2020). Nesse contexto, torna-se urgente buscar estratégias de adaptação e mitigação capazes de reduzir riscos e garantir a continuidade da produção de alimentos e produtos essenciais para a população mundial.

Uma alternativa promissora é a aquicultura multitrófica integrada (IMTA, do inglês Integrated Multi-trophic Aquaculture), que combina diferentes organismos de distintos níveis tróficos em um mesmo sistema, promovendo maior eficiência no uso de recursos e minimizando impactos ambientais (Chen et al. 2023; Alam et al. 2024). Nesses sistemas, espécies vegetais marinhas, em especial as macroalgas, desempenham um papel importante como biofiltros, uma vez que assimilam nitrogênio e fósforo dissolvidos, convertendo-os em biomassa de valor agregado. O gênero *Gracilaria* (Rhodophyta), conhecido pela produção do ficocolóide ágar, destaca-se entre as principais macroalgas cultivadas com potencial para biofiltração em sistemas aquícolas (Marinho-Soriano et al. 2009a; Correia et al. 2020).

Além disso, as macroalgas podem desempenhar um papel fundamental na mitigação das mudanças climáticas ao atuarem como eficientes sequestradoras de carbono, reduzindo assim a concentração de gases de efeito estufa (Ross et al. 2023; van den Burg et al. 2024). Durante a fotossíntese, essas algas não apenas capturam CO₂, mas também liberam oxigênio, contribuindo para a melhoria da qualidade ambiental e para a manutenção da vida marinha (Marinho-Soriano & Carneiro, 2021). Essa capacidade de absorver carbono e nutrientes em excesso faz das macroalgas aliadas estratégicas na regulação dos ecossistemas costeiros, fortalecendo sua função ecológica e reforçando sua importância dentro de sistemas de aquicultura sustentáveis como o cultivo multitrófico integrado (Carneiro et al. 2020).

Os cultivos multitróficos em sistemas de recirculação de água (RAS – Recirculating Aquaculture System) representam uma alternativa sustentável para a aquicultura, ao integrar diferentes níveis tróficos, promovendo o uso racional da água, aproveitamento de resíduos e fechando ciclos de nutrientes (Rusco et al. 2024; Carneiro et al. 2020). Nos cenários futuros projetados pelo IPCC, esses sistemas ganham relevância por reduzirem a pressão sobre os

ecossistemas naturais, aumentarem a resiliência produtiva e contribuir para a mitigação de impactos ambientais, oferecendo uma estratégia adaptativa frente às mudanças climáticas globais (Ahmed e Turchini 2021).

A escolha de *G. caudata* como espécie-alvo para cultivos integrados se justifica pelo seu papel ecológico e econômico em cenários de mudanças climáticas. Primeiramente, essa macroalga tem relevância comercial por ser produtora de ágar, um polissacarídeo de alto valor agregado, com ampla aplicação industrial. Além disso, em experimentos anteriores, *G. caudata* demonstrou maior tolerância e resiliência ao aumento de temperatura, evidenciando sua capacidade de manter funções fisiológicas mesmo sob condições de estresse térmico (Borburema et al. 2025). Essa característica confere à espécie um diferencial adaptativo frente a outras macroalgas, garantindo maior estabilidade produtiva em sistemas de cultivo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho da agarófita *G. caudata* como biofiltro em sistemas de aquicultura multitrófica integrada com *Penaeus vannamei*, operando em recirculação de água (RAS), sob condições ambientes e de aumento de temperatura em consonância com um cenário preditivo do IPCC.

Metodologia

Coleta e triagem

Espécimes de *G. caudata* foram coletados manualmente em um banco natural na zona intertidal da praia de Mãe Luiza-RN (5° 48' 4.86'' S – 35° 10' 45.11'' W) durante a maré baixa. Após as coletas, as macroalgas foram transportadas para o laboratório de macroalgas marinhas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram triadas para a remoção de sedimento e da fauna associada. Os espécimes com epífitas e estruturas de reprodução foram descartados.

Experimento de cultivo multitrófico integrado

O experimento de cultivo multitrófico integrado consistiu em dois sistemas de recirculação de água (Recirculating Aquaculture System - RAS) (Carneiro et al. 2020), um realizado sob temperatura ambiente (RAS-ambiente) e outro aquecido (+ 4°C – cenário do IPCC – RAS-aquecido). Cada sistema consistia em um tanque (500 L) para o cultivo de camarões adultos (11,5 g $\pm$ 1,6) com densidade de estocagem de 45 camarões/m², um tanque de sedimentação (80 L), três tanques (100 L) com a macroalga *G. caudata* (1 g L⁻¹), e um reservatório (60 L) com uma bomba hidráulica submersa. Os tanques eram posicionados a diferentes alturas e conectados com canos de PVC, os quais permitiam a circulação da água por gravidade. O fluxo da água para cada sistema de recirculação era aproximadamente 210 L/h, sem troca de água ao longo do experimento. Dois tratamentos (temperatura ambiente/aquecido) apenas com *G. caudata* e água do mar substituída a cada dois dias foram estabelecidos durante o período experimental e usados como controles. O experimento teve duração de 4 semanas.

Para a análise de nutrientes, amostras de água (100 ml) foram coletadas a cada dois dias, e as análises de nutrientes (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- e PO_4^{3-}) seguiram os métodos de Grasshoff et al. (1999). Os parâmetros ambientais (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) foram determinados diariamente (manhã e tarde) usando uma sonda multiparâmetros.

Taxa de crescimento e nutrientes nos tecidos algais

A biomassa algal foi pesada semanalmente em balança analítica. As algas eram previamente centrifugadas utilizando uma centrífuga manual para remover o excesso de água. Ao final do experimento, as taxas de crescimento (%/dia) foram calculadas de acordo com a equação de Yong et al (2013). Após a pesagem semanal e reajuste da biomassa algal para os valores iniciais (1 g/L), amostras das algas foram congeladas e depois liofilizadas para análises de nitrogênio (em CHNS) e fósforo (Grasshoff, 1976) nos tecidos algais.

Análise dos dados

As variáveis ambientais: temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, e concentrações de nutrientes foram comparadas entre tratamentos aplicando análises de variância (ANOVA) unifatorial (one-way ANOVA). As variáveis bióticas: conteúdo de nitrogênio e fósforo também foram comparadas entre tratamentos aplicando one-way ANOVA. A taxa de crescimento (TCR) de *G. caudata* foi comparada entre tratamentos e semanas aplicando ANOVA bifatorial (two-way ANOVA) para medidas repetidas. As premissas de normalidade e homoscedasticidade foram testadas antes de realizar as ANOVAs aplicando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste post-hoc utilizado quando diferenças significativas foram reveladas pelas ANOVAs foi o teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (versão 4.4.0) e o valor de significância (α) adotado foi 0,05.

Resultados e Discussões

Os resultados de temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, e concentrações de nutrientes durante o experimento estão apresentados na Tabela 1. A temperatura da água diferiu significativamente entre os tratamentos ($p < 0,001$) sob temperatura ambiente (RAS-ambiente e Controle-ambiente) e aquecidos (RAS-aquecido e Controle-aquecido). As maiores salinidades foram registradas no RAS-aquecido devido à maior evaporação neste tratamento. Os maiores valores de pH foram registrados nos controles, enquanto os menores ocorreram no RAS-aquecido e RAS-ambiente. Quanto ao oxigênio dissolvido, as maiores concentrações foram registradas no Controle-ambiente, enquanto que as menores foram evidenciadas no RAS-aquecido.

As variações nos parâmetros ambientais observadas ao longo do tempo são consistentes com estudos anteriores (Marinho-Soriano et al. 2009b; Carneiro et al. 2020). O aumento da temperatura nos sistemas aquecidos está diretamente relacionado ao aquecimento artificial, o qual favorece maior evaporação da água e, consequentemente, elevação da salinidade. Esse efeito é típico em sistemas fechados, nos quais a falta de reposição de água favorece a evaporação. A variação no oxigênio dissolvido também reflete a interação entre metabolismo biológico e trocas gasosas. No tratamento controle, com menor carga orgânica, a concentração de OD se mantém mais elevada ($14,8 \text{ mg/L} \pm 1,4$), enquanto no RAS-aquecido ($11,3 \text{ mg/L} \pm 1,7$), a maior respiração e degradação de matéria reduzem os níveis de oxigênio (Carneiro et al. 2020). As diferenças de pH entre os tratamentos podem estar associadas tanto à maior atividade fotossintetizante em condições de maior disponibilidade de oxigênio, que favorece a absorção de CO_2 e aumento do pH, quanto à respiração e ao acúmulo de matéria orgânica em sistemas RAS, que tendem a acidificar a água (Alamrousi et al. 2022).

Em relação aos nutrientes, as maiores concentrações foram alcançadas nos tratamentos RAS. As maiores concentrações de NO_3^- e NO_2^- foram observadas no RAS-aquecido, enquanto que as maiores concentrações de NH_4^+ e PO_4^{3-} foram registradas no RAS-ambiente. O aumento de nutrientes nos tratamentos RAS era esperado devido à recirculação e não renovação da água, resultando em concentrações mais elevadas de compostos nitrogenados e fosfatados. Esses padrões reforçam como fatores físicos, como aquecimento e evaporação, aliados à dinâmica biogeoquímica, modulam significativamente a qualidade da água em sistemas de recirculação.

No que se refere à TCR, na primeira semana de cultivo, o maior valor foi registrado no RAS-ambiente ($2,74\%/dia \pm 0,22$) (Fig. 1). Nas condições RAS-aquecido e Controle-ambiente, *G. caudata* apresentou uma TCR média em torno de $2\%/dia$. A menor TCR média de *G. caudata* foi observada no Controle-aquecido ($1,37\%/dia \pm 0,07$). Na segunda semana de cultivo, o maior crescimento de *G. caudata* foi registrado no tratamento Controle-ambiente, seguido do crescimento observado no RAS-ambiente (Fig. 1). Entre estas condições de cultivo, não houve uma diferença significativa ($p > 0,05$) entre as TCRs de *G. caudata*. Estudos com macroalgas têm demonstrado que, após um período inicial de adaptação, a taxa de crescimento tende a diminuir (Marinho-Soriano et al. 2009a). Esta diminuição pode estar associada às condições de estresse, devido à perda gradual da qualidade (Marinho-Soriano et al. 2009b) e aquecimento da água (Borburema et al. 2025), as quais podem aumentar a demanda respiratória e reduzir a eficiência fotossintetizante, comprometendo a alocação da energia para o crescimento. Dessa forma, a queda observada nas TCRs de *G. caudata* ao longo das semanas de cultivo pode refletir tanto fatores intrínsecos ao crescimento quanto a influência de condições ambientais que modulam o equilíbrio entre fotossíntese e respiração.

Os maiores conteúdos de N e P foram registrados nas macroalgas cultivadas nos tratamentos RAS. As macroalgas cultivadas no RAS-ambiente apresentaram um conteúdo de nitrogênio 2,8 vezes maior em relação às macroalgas cultivadas no Controle-ambiente (Tabela 1), enquanto que o aumento de nitrogênio nas macroalgas cultivadas no RAS-aquecido foi de 2,3

vezes em relação ao Controle-aquecido (Tabela 1). O conteúdo de P nas macroalgas cultivadas no RAS-ambiente foi 5 vezes maior em relação às macroalgas cultivadas no Controle-ambiente, já o conteúdo de P nas macroalgas do RAS-aquecido foi aproximadamente 3 vezes maior quando comparado às macroalgas do Controle-aquecido (Tabela 1). O incremento de N e P nas macroalgas cultivadas em RAS sugere que a disponibilidade contínua de nutrientes, característica desse sistema, favorece a assimilação e o armazenamento desses elementos essenciais. Esse padrão é consistente com estudos anteriores que destacam a capacidade das macroalgas em atuar como biofiltros eficientes em sistemas de cultivo integrado, acumulando nutrientes dissolvidos e contribuindo para o equilíbrio da qualidade da água (Carneiro et al. 2020). Além disso, a variação observada entre os tratamentos ambiente e aquecido indica que a temperatura pode regular a eficiência de assimilação de nutrientes, como já relatado para outras espécies de macroalgas (Borburema et al. 2022).

Conclusão

A macroalga *G. caudata* mostrou grande potencial para ser utilizada como biofiltro em sistemas de aquacultura integrada, destacando-se por sua elevada eficiência na remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo). Essa capacidade contribui para a melhoria da qualidade da água, favorece a sustentabilidade e reduz impactos ambientais associados à carcinicultura. Além disso, seu papel como biorremediadora e sua tolerância a variações ambientais revela uma importância estratégica frente às mudanças climáticas, tornando os cultivos mais adaptados a situações de mudança ambiental.

Referências

- Ahmed N, Turchini GM (2021) Recirculating aquaculture systems (RAS): environmental solution and climate change adaptation. J. Clean. Prod. 297: 126604.
- Alam MM, Jørgensen NOG, Bass D, et al (2024) Potential of integrated multitrophic aquaculture to make prawn farming sustainable in Bangladesh. Front. Sustain. Food Syst. 8: 1412919.
- Alamrousi A, Casais E, García-Cardesín É, et al (2022) Influence of pH, N, P, N:P ratio, and dissolved inorganic carbon on *Ulva ohnoi* growth and biomass quality: Potential implications in IMTA-RAS. Aquacult. J. 2: 285–301.
- Borburema HDS, Yokoya NS, Souza JMC, et al (2022) Ocean warming and increased salinity threaten *Bostrychia* (Rhodophyta) species from genetically divergent populations. Mar. Environ. Res. 178: 105662.
- Borburema HDS, Almeida-Faria G, Silveira SLC, et al (2025) Agarophyte seaweeds exhibit differential responses to marine heatwaves depending on the species and climatic season. J. Appl. Phycol. 37: 1479–1491.

Carneiro MAA, Resende JF de J, Oliveira SR, et al (2020) Performance of the agarophyte *Gracilariopsis tenuifrons* in a multi-trophic aquaculture system with *Litopenaeus vannamei* using water recirculation. *J. Appl. Phycol.* 33: 481–490.

Chen G, Bai J, Bi C, et al (2023) Global greenhouse gas emissions from aquaculture: a bibliometric analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* 348: 108405.

Correia M, Azevedo IC, Peres H, et al (2020) Integrated multi-trophic aquaculture: a laboratory and hands-on experimental activity to promote environmental sustainability awareness and value of aquaculture products. *Front. Mar. Sci.* 7:156.

FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action.* Rome: FAO.

Froehlich HE, Gentry RR, Halpern BS (2018). Global change in marine aquaculture production potential under climate change. *Nat. Ecol. Evol.* 2: 1745–1750.

Grasshoff K (1976) *Methods of seawater analysis.* 1ª Edição. Verlag Chemie, Weinheim.

Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M (1999) *Methods of seawater analysis,* 3ª Edição. Wiley-VCH.

Marinho-Soriano E, Nunes SO, Carneiro MAA, Pereira DC (2009a). Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. *Biomass Bioenerg.* 33: 327–331.

Marinho-Soriano E, Panucci RA, Carneiro MAA, Pereira DC (2009b). Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. *Bioresour. Technol.* 100: 6192–6198.

Marinho-Soriano E, Carneiro MAA (2021) Macroalgas marinhas: Biologia, ecologia e importância econômica. In: Viana DL, Oliveira JEL, Hazin FHV, Souza MAC (Eds.) *Ciências do mar: Dos oceanos do mundo ao Nordeste do Brasil* (pp 90–119). Design Publicações.

Pirani A, Fuglestedt JS, Byers E, et al (2024). Scenarios in IPCC assessments: lessons from AR6 and opportunities for AR7. *npj Clim. Action* 3, 1.

Ross FWR, Boyd PW, Filbee-Dexter K, et al (2023). Potential role of seaweeds in climate change mitigation. *Sci. Total Environ.* 885: 163699.

Rusco G, Roncarati A, Di Iorio M, et al (2024). Can IMTA System Improve the Productivity and Quality Traits of Aquatic Organisms Produced at Different Trophic Levels? The Benefits of IMTA—Not Only for the Ecosystem. *Biology.* 13: 946.

van den Burg SWK, Koch SJI, Poelman M, et al (2024) Seaweed as climate mitigation solution: Categorizing and reflecting on four climate mitigation pathways. *WIREs Clim. Chang.* 15: e868.

Yong YS, Yong WTL, Anton A (2013) Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *J. Appl. Phycol.* 25: 1831–1834.

Tabela 1. Variáveis ambientais mensuradas nos cultivos das macroalgas e variáveis bióticas mensuradas (N e P) a partir das macroalgas.

Figura 1. Taxa de crescimento relativa (TCR) de *Gracilaria caudata* nos tratamentos do experimento de aquicultura multitrófica integrada.

CÓDIGO: SB0332

AUTOR: ANNE HELOYSE GALVAO DE ARAUJO

ORIENTADOR: RAFAEL WESLEY BASTOS

TÍTULO: ISOLAMENTO E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Kodamaea ohmeri* EM UM CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA

Resumo

A perspectiva de Saúde Única reconhece a interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental. A resistência a antimicrobianos é um problema nesse contexto, sendo alguns fungos já conhecidos por evoluir mecanismos de resistência no ambiente. Dessa forma, este estudo teve como objetivo isolar, identificar e determinar o perfil de sensibilidade a antifúngicos de leveduras de importância médica provenientes de pacientes, ambiente hospitalar, animais (aves e suínos) e seus criadouros. Dentre as leveduras isoladas, *Kodamaea ohmeri* foi identificada em pacientes, animais e seus ambientes, tornando-se o foco do estudo por seu caráter emergente. O isolamento foi feito em CHROMAgar Candida e a identificação por MALDI-TOF. Foram obtidos 16 isolados de *K. ohmeri*: três de hemoculturas, um de cateter, três de animais e nove de ambientes de criação. Em seguida, concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por microdiluição em caldo para antifúngicos clínicos (azóis, equinocandinas, anfotericina B e 5-flucitosina), fungicidas ambientais (tebuconazol, piraclostrobina, mancozeb, carbendazim) e desinfetantes hospitalares (amônia quaternária). Todos os isolados apresentaram baixa CIM, semelhante à de *C. albicans*, usada como controle. Conclui-se que, *K. ohmeri* pode ser isolada no contexto hospitalar e agropastoril, contudo, não se configura como um problema de resistência antifúngica nas fontes analisadas.

Palavras-chave: agroquímicos; desinfetantes; resistência antifúngicas; leveduras.

TITLE: Isolation and sensitivity profile of *kodamaea ohmeri* in a one health context

Abstract

The One Health perspective recognizes the interconnectedness of human, animal, and environmental health. Antimicrobial resistance is a problem in this context, with filamentous fungi already known to develop resistance in the environment. This study aimed to isolate, identify, and determine the antifungal susceptibility profile of medically important yeasts from patients, hospital environments, animals (birds and pigs), and their breeding sites. Among the isolated yeasts, *Kodamaea ohmeri* was identified in patients, animals, and their environments, becoming the focus of the study due to its emerging nature and high mortality described in the literature. A total of 16 isolates were obtained: three from blood cultures, one from a catheter, three from animals, and nine from breeding environments. Isolation was performed on CHROMAgar Candida and identification on MALDI-TOF. Variation in coloration on CHROMAgar was observed according to the cultivation time, suggesting

possible underreporting of this species. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution for clinical antifungals (azole, echinocandins, amphotericin B, and 5-flucytosine), environmental fungicides (mancozeb, carbendazim), and hospital disinfectants (quaternary ammoniums). All isolates showed low MIC, similar to that of the control *C. albicans*. It is concluded that, in the context of Rio Grande do Norte, *K. ohmeri* does not constitute a problem of antifungal resistance in the analyzed.

Keywords: agrochemicals; hospital disinfectants; antifungal resistance; yeasts.

Introdução

2. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas, conhecidas como micoses, representam um desafio significativo para a saúde pública global, especialmente em populações imunocomprometidas. Estima-se que mais de 300 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente por fungos, com aproximadamente 6,5 milhões de casos sendo de micoses invasivas (Denning, 2024).

A resistência aos antifúngicos é um fenômeno complexo e em constante evolução. Estudos sugerem que o tratamento prévio com antifúngicos pode selecionar linhagens resistentes (Czajka et al., 2023). Contudo, a frequência de isolamento de linhagens resistentes em pacientes sem histórico de terapia antifúngica sugere que infecções podem ocorrer devido à exposição ambiental a linhagens já resistentes (Bastos et al., 2021; Bongomin et al., 2017).

Nesse contexto, surge a abordagem de Saúde Única (One Health), que reconhece a interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental (McEwen & Collignon, 2018). Estudos sobre resistência antifúngica em leveduras de importância médica no ambiente e em animais de produção são limitados, apesar da evidência de que esses microrganismos podem atuar como reservatórios de resistência.

Muitas leveduras de importância médica podem ser isoladas do ambiente, tais como espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*. A levedura *Kodamaea ohmeri* também pode ser isolada do ambiente, plantas e animais e tem sido considerada um patógeno fúngico emergente (Boekhout et al., 2022; Zhou et al., 2021). Originalmente isolada de frutas e insetos, *K. ohmeri* foi posteriormente identificada como um patógeno humano, responsável por infecções invasivas como fungemia, endocardite e peritonite (Zhou et al., 2019). A identificação precisa dessa levedura é um desafio, com implicações significativas para o diagnóstico e tratamento de infecções (Zhou et al., 2019). Estudos anteriores sugerem que *K. ohmeri* pode ser frequentemente subnotificada devido à dificuldade de identificação em laboratórios clínicos (Ortiz et al., 2024).

Em casos de infecções por *K. ohmeri*, o tratamento não é bem estabelecido, uma vez que não existem dados acerca da susceptibilidade dessa levedura aos antifúngicos de uso clínico e a correlação com o sucesso terapêutico. Em geral, para prever a sensibilidade aos antimicrobianos, utiliza-se o protocolo de microdiluição em caldo do CLSI, e alguns autores sugerem considerar os mesmos pontos de cortes de *C. albicans* para Fluconazol, Anfotericina B e Caspofungina (Silva Veloso et al., 2023; Zhou et al., 2021).

Dessa forma, este trabalho se propõe a avaliar a relação entre o desempenho de *K. ohmeri* isolada de infecções humanas e isolados ambientais e animais frente aos antifúngicos de uso clínico, principais desinfetantes e agroquímicos. Ao compreender melhor o perfil de

sensibilidade de *K. ohmeri*, espera-se fornecer contribuições valiosas para estratégias de manejo e controle de infecções fúngicas, alinhadas à perspectiva de Saúde Única.

Metodologia

3. MÉTODO:

3.1 Coleta e isolamento de leveduras

As leveduras analisadas neste estudo foram obtidas em dois contextos distintos: clínico, envolvendo pacientes e ambientes hospitalares (hospitais Giselda Trigueiro (HGT) e do Coração (HC), em Natal-RN), e rural, envolvendo animais de criação (suínos e aves) e seus ambientes. Os procedimentos seguiram as normas hospitalares e incluíram solicitações médicas para investigação de infecções fúngicas, sendo aprovado pelo comitê de ética (CAAE: 67951123.2.0000.5537).

As amostras clínicas incluíram sangue, líquido, urina, secreções respiratórias, biópsias, secreções diversas e aspirados de medula óssea. O cultivo inicial foi realizado em CHROMAgar Candida, meio cromogênico seletivo e diferencial, capaz de favorecer tanto espécies de *Candida* quanto outras leveduras de interesse clínico. Após a confirmação do isolamento, os microrganismos foram encaminhados ao Laboratório de Uso Comum do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN.

A investigação ambiental em hospitais ocorreu em duas coletas no HGT: uma na enfermaria e leitos mistos, e a segunda na UTI. Para isso, swabs estéreis umedecidos em solução salina 0,85% acrescida de cloranfenicol (0,5 g/L) foram friccionados em superfícies críticas: maçanetas, portas, corredores, equipamentos médicos, sala de enfermagem, refeitório e leitos. Os swabs foram transportados em microtubos contendo água peptonada, homogeneizados em vórtex, incubados por 2h a 30 °C e posteriormente semeados em CHROMAgar Candida com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30 °C por até 7 dias, com monitoramento diário do crescimento. Colônias com morfologia sugestiva de leveduras foram isoladas para análises posteriores.

As coletas em animais de criação ocorreram na Escola Agrícola de Jundiá (EAJ-UFRN), Macaíba-RN. Foram obtidas 28 amostras de aves poedeiras e suínos, coletadas com swabs estéreis umedecidos na mesma solução descrita para ambiente hospitalar. Nos suínos, o material foi coletado por via retal, e nas aves, em cloaca e cavidade oral. Adicionalmente, foram coletadas amostras ambientais de baias e gaiolas, incluindo chão, paredes, recipientes de ração, torneiras e superfícies de contato. O estudo foi aprovado pelo CEUA sob nº 356.042/2023.

3.2 Identificação das leveduras

Após isolamento em CHROMAgar Candida, as leveduras foram identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight). A técnica utiliza ionização a laser sobre a amostra associada a uma matriz química, gerando íons que são separados conforme sua razão massa/carga (m/z). O resultado é um espectro proteico específico, comparado a bibliotecas de referência para identificação precisa da espécie (Bellanger et al., 2019). Os espectros obtidos foram confrontados com a biblioteca Bruker Biotyper 3.1 (versão 4613; Bruker Daltonik). Todas as amostras

confirmadas foram criopreservadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 10% glicerol e armazenadas a -80 °C.

3.4 Caracterização do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.

O perfil de susceptibilidade foi determinado pelo teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando microdiluição em caldo segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Empregou-se meio RPMI 1640, com inóculo ajustado entre $0,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^3$ células/mL em placas de 96 poços.

Foram testadas três categorias de substâncias: 1. Antifúngicos clínicos: fluconazol, anfotericina B, caspofungina, micafungina, 5-flucitosina, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol; 2. Fungicidas ambientais: mancozeb, tebuconazol, carbendazim e piraclostrobina; 3. Desinfetantes hospitalares: cloreto de benzalcônio e cloreto de didecildimetilamônio.

Os intervalos de concentração foram definidos segundo protocolos de referência. As placas foram incubadas a 37 °C e as leituras da CIM ocorreram após 24 h para caspofungina e micafungina, e após 48 h para os demais agentes.

A CIM da anfotericina B e da 5-flucitosina foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento (100%). Para azóis e equinocandinas, foi considerada a menor concentração com redução de aproximadamente 50% da turbidez em relação ao controle. Para agroquímicos e desinfetantes, a avaliação baseou-se em inibição total.

Com base nos resultados, as linhagens foram classificadas em sensíveis, sensíveis dose-dependentes e resistentes, considerando os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI para *Candida albicans*. Para compostos sem ponto de corte definido, utilizou-se a comparação com a cepa de referência *C. albicans* ATCC 90029. A análise da CIM90, ou seja, a concentração capaz de inibir 90% das linhagens, foi empregada como parâmetro adicional para interpretação da resistência.

Resultados e Discussões

4. RESULTADOS:

4.1 Leveduras isoladas

Foram obtidos e identificados 133 isolados de leveduras pertencentes a diferentes espécies. A maioria das amostras pertence ao gênero *Candida* (75,1%), mas também foram encontrados representantes dos gêneros *Kodamaea*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Wickerhamomyces* (Figura 1).

Entre as espécies de *Candida*, destacaram-se *C. tropicalis* (20,3%), *C. glabrata* (15%) e *C. albicans* (12%). Outras espécies menos frequentes incluíram *C. pararugosa*, *C. catenulata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, espécies do complexo *C. haemulonii* e *C. orthopsilosis*.

Além das espécies de *Candida*, destacou-se a presença de *Kodamaea ohmeri*. Essa levedura, embora reconhecidamente ambiental, foi isolada tanto de amostras relacionadas à criação de animais (comedouros e bebedouros) quanto de materiais clínicos (hemocultura e cateter), (Quadro 1). No total, foram recuperados 16 isolados, correspondendo a 12% do total, o que a

posiciona como a quarta espécie mais prevalente. Apesar de ser frequentemente encontrada no ambiente, *K. ohmeri* tem sido reportada como agente infeccioso emergente desde 1994 (Zhou et al., 2021). Até o momento, é a única espécie do gênero *Kodamaea* com capacidade de crescer a 37 °C e apresentar potencial patogênico em humanos (Zhou et al., 2019). Tais características justificaram sua escolha como foco principal desta investigação, incluindo a análise detalhada de seu perfil de susceptibilidade frente a antifúngicos clínicos, agroquímicos e desinfetantes hospitalares.

4.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

4.2.1 Antifúngicos clínicos com sugestão de pontos de corte

A avaliação da susceptibilidade foi conduzida pelo método de microdiluição em caldo, segundo as normas do CLSI (2017). Como não existem pontos de corte estabelecidos para *K. ohmeri*, foram utilizados, conforme recomendação de alguns autores (Silva Velôso et al., 2023), os valores definidos para *C. albicans* em relação a fluconazol (FCZ), anfotericina B (AMB) e caspofungina (CSP).

De forma geral, as linhagens apresentaram sensibilidade aos antifúngicos de primeira linha. Para FCZ, a CIM variou de 2,0 a 4,0 µg/mL, com predominância de perfis sensíveis. Duas linhagens (345L e 445L), ambas isoladas de ambiente agrícola, foram classificadas como sensíveis dose-dependentes. Para AMB, não houve variação, sendo a CIM uniforme em 1,0 µg/mL. No caso da CSP, os valores oscilaram entre 0,03 e 0,25 µg/mL. Em nenhum isolado foi detectado aumento expressivo de CIM, sugerindo manutenção da eficácia desses fármacos (Tabela 1).

4.3.2 Antifúngicos clínicos sem sugestão de pontos de corte

Para outros antifúngicos clínicos sem parâmetros definidos de corte, a determinação da CIM seguiu os critérios do CLSI (2017), considerando 50% de inibição do crescimento, exceto para 5-flucitosina (5-FC), cuja referência foi a inibição total.

Os intervalos de inibição variaram como descrito a seguir: micafungina: 0,25–0,5 µg/mL, itraconazol: 0,12–2,0 µg/mL, voriconazol: 0,06–0,12 µg/mL, posaconazol: 0,03–0,25 µg/mL, isavuconazol: 0,007–0,25 µg/mL e 5-FC: 0,12–0,25 µg/mL (Tabela 2). Comparando-se com pontos de corte de *C. albicans*, pode-se inferir que *K. ohmeri* tende a apresentar alta sensibilidade também a esses agentes.

4.2.3 Desinfetantes hospitalares e agroquímicos

Considerando que *K. ohmeri* é uma levedura ambiental, sujeita a diferentes pressões seletivas naturais e antropogênicas (McEwen & Collignon, 2018), foram testados desinfetantes hospitalares e fungicidas agrícolas (Tabelas 3 e 4).

Entre os desinfetantes, os compostos de amônio quaternário foram os principais avaliados. O cloreto de benzalcônio (BZK) apresentou CIM90 de 4,0 µg/mL, semelhante ao observado para a cepa controle (*C. albicans* ATCC 90029 = 2,0 µg/mL). Já o cloreto de didecildimetilamônio (DDA) apresentou valores entre 0,06 e 2,0 µg/mL, também comparáveis à cepa de referência (1,0 µg/mL). Assim, os isolados de *K. ohmeri* mostraram sensibilidade equivalente aos controles, sem indicar resistência relevante.

Quanto aos agroquímicos, foram avaliados tebuconazol (TEB), piraclostrobina (PIR), carbendazim (CBZ) e mancozeb (MZB). O TEB demonstrou alta eficácia, com CIM90 de 1,0 µg/mL, indicando maior sensibilidade em comparação à cepa controle (4,0 µg/mL). O MZB, por outro lado, apresentou CIM90 de 16 µg/mL, superior ao valor obtido para a cepa de referência (4,0 µg/mL), sugerindo menor susceptibilidade. PIR e CBZ não foram capazes de inibir o crescimento dos isolados nem da cepa controle nas maiores concentrações testadas (32 µg/mL), impossibilitando a definição de CIM90.

Conclusão

5. CONCLUSÃO:

Foram identificados 16 isolados de *K. ohmeri* oriundos de diferentes fontes. Todos apresentaram valores reduzidos de CIM frente aos antifúngicos clínicos testados, incluindo azóis, equinocandinas, anfotericina B e 5-flucitosina. Resultados semelhantes foram observados para fungicidas de uso agrícola e para desinfetantes hospitalares à base de compostos quaternários de amônio, cujas CIMs se mostraram comparáveis às obtidas para a cepa de referência. Assim, pode-se afirmar que, embora *K. ohmeri* tenha sido detectada em múltiplos ambientes no estado do Rio Grande do Norte, ainda não configura um agente com perfil de resistência relevante na região metropolitana de Natal, seja em relação a fármacos clínicos, produtos ambientais ou sanitizantes hospitalares. Ressalta-se, contudo, a necessidade de manutenção da vigilância ambiental, veterinária e em saúde humana, dado o potencial de microrganismos emergentes provocarem surtos e desenvolverem resistência ao longo do tempo.

Referências

6. REFERÊNCIAS:

Adamczyk, K.; Garnarczyk, A.; Antończak, P.; Wcisło-Dziadecka, D. The foot microbiome. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 19, n. 5, p. 1039–1043, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jocd.13368>.

Arafa, S. H.; Elbanna, K.; Osman, G. E. H.; Abulreesh, H. H. Candida diagnostic techniques: a review. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, v. 9, n. 3, p. 360–377, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43994-023-00049-2>.

Bastos, R. W. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01179-17>.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.094>.

Bastos, R. W.; Rossato, L.; Goldman, G. H.; Santos, D. A. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. *PLOS Pathogens*, v. 17, n. 12, e1010073, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010073>.

Bellanger, A.; Gbaguidi-Haore, H.; Liapis, E.; Scherer, E.; Millon, L. Rapid identification of *Candida* sp. by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to short-term incubation on a solid medium. *APMIS*, v. 127, n. 4, p. 217–221, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apm.12936>.

Berman, J.; Krysan, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 6, p. 319–331, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>.

Boekhout, T. et al. Trends in yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, v. 114, n. 1, p. 491–537, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>.

Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.; Denning, D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 4, p. 57, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.

Buffet-Bataillon, S.; Tattevin, P.; Maillard, J.-Y.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A. Efflux Pump Induction by Quaternary Ammonium Compounds and Fluoroquinolone Resistance in Bacteria. *Future Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 81–92, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.15.131>.

Bureš, F. Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application. *Topics in Current Chemistry*, v. 377, n. 3, p. 14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0239-2>.

Oliveira, J. C. Tópicos em Micologia Médica. Rio de Janeiro: 2014. ISBN 85-900986-1-3.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Disponível em: <https://clsi.org/>.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3. ed. CLSI supplement M27M44S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.

Global Action for Fungal Infections (GAFFI). Disponível em: <https://gaffi.org/wp-content/uploads/GAFFI-Leaflet-June-2016-DWD-hidden-crisis.pdf>. Acesso em: 29/06/2024.

Castelo-Branco, D. et al. Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: A One Health perspective to tackle azole resistance. *Mycoses*, v. 65, n. 3, p. 303–311, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.13404>.

Cogliati, M. et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Research*, v. 16, n. 4, fow045, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow045>.

Colombo, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>.

Colombo, A. L.; Padovan, A. C. B.; Chaves, G. M. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 682–700, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11>.

Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Fungicidas. Modo de Ação de Fungicidas. Disponível em: <https://www.frac-br.org/modo-de-acao>.

Czajka, K. M. et al. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. *Cells*, v. 12, n. 22, 2655, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells12222655>.

da Silva Campos, J. et al. Identification and evaluation of thermotolerance of yeasts from milk in natura exposed to high temperature and slow and fast pasteurization. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 1075–1082, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00975-7>.

De Barros, J. D. et al. *Kodamaea* (*Pichia*) *ohmeri* fungemia in a pediatric patient admitted in a public hospital. *Medical Mycology*, v. 47, n. 7, p. 775–779, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/13693780902980467>.

Denning, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. In: *The Lancet Infectious Diseases*, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8).

Diallo, K. et al. A case report of fungemia due to *Kodamaea ohmeri*. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, 570, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4208-8>.

Eagan, J. L. et al. Inadvertent Selection of a Pathogenic Fungus Highlights Areas of Concern in Human Clinical Practices. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 2, 157, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8020157>.

Francisco, E. C. et al. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 909.e1-909.e5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10>

Anexos

FIGURA 1

QUADRO 1

TABELA 1

TABELA 1.2

TABELA 2

TABELA 3

TABELA 3.2 E TABELA 4.1

TABELA 4.2

CÓDIGO: SB0336

AUTOR: MARIA HELENA BRANDAO DA SILVA

ORIENTADOR: HUGO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ROCHA

TÍTULO: Comparação da atividade antioxidante de blends contendo alginato e extrato aquoso de limão e alho e seus componentes isolados.

Resumo

Três formulações de blends contendo alginato e extratos de alho e limão (B12, B13 e B15) foram avaliadas quanto à sua atividade antioxidante e segurança. A caracterização físico-química foi realizada por eletroforese em gel de agarose, que confirmou a presença de alginato nos blends. A atividade antioxidante foi analisada por ensaios de sequestro de íons superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$). Nenhuma das amostras apresentou atividade significativa frente ao superóxido nas concentrações testadas. Por outro lado, todas foram eficazes na neutralização do H_2O_2 , sugerindo potencial para proteção celular. Quanto ao radical hidroxila, as amostras demonstraram alta capacidade de sequestro, com destaque para os blends B13 e B15, que apresentaram desempenho superior ao B12. O alto poder antioxidante dos blends, especialmente B15, associado à ausência de citotoxicidade em fibroblastos L929 (MTT) até 1,0 mg/mL, indica seu potencial terapêutico ou preventivo frente a doenças associadas ao estresse oxidativo. Estudos futuros buscarão confirmar sinergia entre os componentes e ampliar a avaliação toxicológica.

Palavras-chave: estresse oxidativo. polissacarídeos ácidos. extrato de planta

TITLE: Comparative Evaluation of Antioxidant Activity in Alginate-Based Blends with Aqueous Lemon and Garlic Extracts and Their Isolated Components

Abstract

Three blend formulations containing alginate and garlic/lemon extracts (B12, B13, and B15) were evaluated for their antioxidant activity and safety. Physicochemical characterization was extended through agarose gel electrophoresis, which confirmed the presence of alginate in the blends. Antioxidant activity was assessed using superoxide, hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\bullet OH$) scavenging assays. No significant superoxide scavenging activity was detected at the tested concentrations. However, all samples effectively neutralized H_2O_2 , suggesting potential for cellular protection. Regarding hydroxyl radicals, all samples showed high scavenging capacity, with B13 and B15 outperforming B12. The strong antioxidant potential of the blends, particularly B15, along with the absence of cytotoxicity in L929 fibroblasts (MTT assay) up to 1.0 mg/mL, suggests promising therapeutic or preventive applications against diseases associated with oxidative stress. Future studies will aim to confirm synergistic effects between components and expand toxicological assessments.

Keywords: oxidative stress. 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 aliviar os sintomas das doenças e reduzir 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. Os objetivos específicos são complementar a avaliação da atividade antioxidante pelos ensaios *in vitro* de sequestro do radical hidroxila, sequestro de íons superóxido e sequestro de peróxido de hidrogênio; a caracterização físico-química da formulação por meio da eletroforese em gel de agarose e análise da citotoxicidade através do ensaio MTT em células da linhagem L929.

Metodologia

1- Alginato: obtido comercialmente. 2- Extrato aquoso de limão e alho: 30 alhos *Allium sativum* foram descascados e triturados junto com 5 limões *Citrus limon* cortados em quatro pedaços e sem sementes no liquidificador. Esse conteúdo foi aquecido com 1 L de água destilada por 20 minutos no fogão de bancada, depois do resfriamento, a mistura foi centrifugada a 8.000 rpm, 4°C por 15 minutos, o conteúdo líquido mantido sob resfriamento

no congelador seguindo o método descrito por Abolhassani et al. (2017) com modificações. 3- Blends: planejamento fatorial 22 utilizando esquema de sinais. 4- Avaliação da atividade antioxidante: 4.1- Sequestro de íons superóxido foi avaliado por ensaio colorimétrico, conforme descrito por Charles Beauchamp (1971), no qual a formação de azul de formazan foi medida por absorvância a 560 nm. 4.2- Sequestro do radical hidroxila foi avaliado por ensaio colorimétrico, conforme descrito por Akashi (2004), no qual a formação do intermediário ácido diidroxibenzoico(DHBA) foi medido por absorvância a 510 nm. 4.3- Sequestro de peróxido foi avaliado por ensaio colorimétrico, conforme descrito por Jesumani et al. (2020), no qual foi monitorado a absorvância do peróxido à 230 nm. 5- A caracterização físico-química por eletroforese em gel de agarose foi realizada conforme descrito por Sambrook & Russell (2001). 6- Ensaio do MTT: a citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, conforme descrito por Mosmann (1983), onde a conversão do MTT em formazan foi medida por absorvância.

Resultados e Discussões

Os blends foram designados da seguinte forma: B12, na concentração de 10 mg/mL, composto por 75% de alginato e 25% de extrato; B13, também a 10 mg/mL, contendo 25% de alginato e 75% de extrato; e B15, a 10 mg/mL, formulado com 50% de alginato e 50% de extrato. A escolha dessas proporções foi baseada no planejamento fatorial 22 descrito na literatura para a avaliação de blends contendo extrato de limão e alho. A caracterização química dos blends e dos isolados, incluindo a quantificação de açúcares, compostos fenólicos e proteínas totais, bem como a determinação da atividade antioxidante por 04 diferentes ensaios (quelação de cobre, quelação de ferro, capacidade antioxidante total e poder redutor), foi descrita no trabalho anterior. A partir desses resultados, o blend B15 apresentou a melhor atividade antioxidante global, sendo, portanto, selecionado para os ensaios de citotoxicidade em células da linhagem L929. No estudo atual, as amostras foram submetidas a uma nova caracterização físico-química, por meio de eletroforese em gel de agarose, e a avaliação da atividade antioxidante foi complementada com os ensaios de sequestro de íons superóxido, peróxido e radical hidroxila. Além disso, realizou-se a análise de citotoxicidade do blend B15 em comparação aos extratos isolados. A técnica de eletroforese em gel de agarose foi utilizada para confirmar a presença do alginato nos blends. Nessa técnica, após a corrida eletroforética, polissacarídeos carregados negativamente podem ser corados com azul de toluidina e, por conseguinte, a sua presença é confirmada pelo surgimento de bandas coradas, no caso dos alginatos, em rosa roxeados. Nos blends, após a realização da eletroforese, detectou-se a presença de banda eletroforéticas com cores características de alginato. As suas mobilidades foram semelhantes a aquela apresentada pelo alginato isolado (padrão), o que confirmou a sua natureza. Por outro lado, com extrato de alho/limão não se verificou a presença de bandas coradas pelo azul de toluidina, o que, por conseguinte, descartou a possibilidade da presença de outros polissacarídeos no blend. Diante desse dado, as amostras foram então avaliadas por três diferentes testes antioxidantes. No ensaio de sequestro de íons superóxido, ao se avaliar a capacidade das amostras em sequestrar os íons superóxido, não se detectou atividade mensurável na faixa de concentrações testadas (0,25 a 1,0 mg/mL). Os controles responderam conforme esperado, corroborando a validade do ensaio, considerando potenciais interferências de cor/turbidez e a possibilidade de efeito concentração-dependente. Estes dados levam a suposição de que as amostras avaliadas não apresentam capacidade sequestrar íons superóxido. Contudo, devido às limitações do método, não foi possível testar as amostras em concentrações superiores, o que impede o descartar a possibilidade de se detectar atividade antioxidante das amostras em

faixas mais elevadas. No ensaio de sequestro de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) observou-se que todas as amostras (blends, alginato e extrato de limão com alho), em todas as concentrações avaliadas (0,25 a 1,0 mg/mL) apresentaram cerca de 100% de atividade. Não havendo diferença significativa entre elas. Futuramente, pretende-se utilizar concentrações menores para se identificar os limites mínimos em que se detecta essa atividade, bem como, caracterizar se o efeito observado nos blends advém de uma ação sinérgica ou aditiva do extrato com o alginato. O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio relativamente estável que, em excesso, pode comprometer a integridade celular. Embora desempenhe funções sinalizadoras em concentrações fisiológicas, seu acúmulo favorece a formação de radicais altamente reativos, como o radical hidroxila, por meio da reação de Fenton. Nesse contexto, a capacidade dos blends em sequestrar H_2O_2 contribui para a proteção celular contra danos oxidativos, sendo um parâmetro relevante na indicação do potencial antioxidante dos blends. No teste de sequestro de radical hidroxila ($\bullet OH$) detectou-se ação sequestradora com o uso de todas as amostras e em todas as concentrações avaliadas (0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL). Todavia, a capacidade de sequestro detectada não foi semelhante entre as amostras. Com as duas concentrações mais baixas alginato identificou-se uma atividade de cerca de 80%, já com a maior concentração essa atividade chegou a mais de 100%. Já com extrato de alho e limão, o valor de 100% de sequestro já foi obtido com a concentração de 0,5 mg/mL. Ao se observar o efeito dos três blends, verifica-se que aquele denominado de BL2 foi o menos efetivo como agente sequestrador de radical hidroxila, uma vez que o valor superior a 100% de sequestro só foi obtido com a maior concentração avaliada (1,0 mg/mL). Com os demais blends (BL3 e BL5), valores superiores de 100% de sequestro já foram obtidos com 0,5 mg/mL. Valor esse que não se modificou quando se utilizou uma concentração maior (1,0 mg/mL) dos blends. Como os valores de sequestro de radical hidroxila dos blends, mesmo na menor concentração, foram elevados, não foi possível inferir que há um efeito sinérgico (quando a ação combinada é maior do que a soma dos efeitos individuais dos componentes do blend) ou aditivo (quando a ação combinada é igual à soma dos efeitos individuais). Pretende-se, posteriormente, avaliar o efeito de concentrações menores das amostras e utilizar modelos estatísticos como Modelo de isoblograma; Índice de combinação (Combination Index, CI) e/ou Loewe additivity ou Bliss independence, para caracterizar a ação dos componentes dos blends. Independente dessa caracterização, já pode-se afirmar que a produção de blends com alginato permite uma menor utilização dos extratos para se obter uma ação sequestradora de radical hidroxila com eficiência semelhante ao extrato isolado. O radical hidroxila é uma das espécies reativas de oxigênio mais agressivas e instáveis presentes nos sistemas biológicos, esse radical apresenta altíssima reatividade, sendo capaz de reagir imediatamente com moléculas próximas. Em razão dessa característica, o radical hidroxila é amplamente reconhecido por seu potencial de causar danos severos a biomoléculas essenciais, contribuindo para processos de peroxidação lipídica, mutações genéticas, disfunção celular e morte celular. Nesse contexto, substâncias capazes de sequestrar ou neutralizar o radical hidroxila são consideradas antioxidantes particularmente eficazes. A neutralização desse radical impede a progressão de reações em cadeia associadas ao estresse oxidativo, protegendo a integridade estrutural e funcional das células. Os resultados positivos dos blends no ensaio de sequestro do radical hidroxila indicam não apenas eficácia antioxidante *in vitro*, mas também sugerem potencial terapêutico ou preventivo frente a doenças associadas ao desequilíbrio redox, e os coloca agentes com potencial para o combate a situações como envelhecimento precoce, inflamações crônicas, doenças neurodegenerativas e câncer. Diante dos resultados obtidos nos ensaios antioxidantes, surgiu o questionamento quanto à segurança do uso dos blends. Para iniciar essa avaliação, foi realizado um teste de citotoxicidade em fibroblastos da linhagem L929,

utilizando o ensaio de MTT. O blend BL5 foi selecionado para esta análise por ter demonstrado a melhor atividade antioxidante entre as formulações testadas. Nas concentrações avaliadas (0,025 a 0,5 mg/mL), tanto o alginato quanto o extrato isolado não apresentaram indícios de citotoxicidade. Da mesma forma, o blend BL5 não demonstrou efeitos citotóxicos, mesmo na concentração de 1,0 mg/mL. Esses resultados indicam que o BL5 apresenta um perfil de segurança favorável em relação à viabilidade celular *in vitro*. Estudos futuros incluirão a ampliação da avaliação toxicológica, com a aplicação de outros testes de toxicidade e ecotoxicidade, incluindo modelos *in vivo*.

Conclusão

Nos ensaios antioxidantes complementares, os resultados evidenciaram uma ação seletiva e significativa das amostras frente a diferentes espécies reativas de oxigênio. Apesar da ausência de atividade mensurável no ensaio de sequestro de íons superóxido, todas as amostras demonstraram capacidade máxima (cerca de 100%) de neutralizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas concentrações testadas, sem diferenças significativas entre elas. Esses achados sugerem que tanto os extratos isolados quanto os blends possuem compostos ativos com alta afinidade por H_2O_2 , o que representa uma importante função protetiva frente ao estresse oxidativo. Em relação ao radical hidroxila, uma das espécies mais reativas e danosas aos sistemas biológicos, todas as amostras testadas apresentaram atividade sequestradora, com destaque para os extratos isolados e os blends B13 e B15, que atingiram valores superiores a 100% de sequestro já em concentrações intermediárias. O blend B12, por sua vez, apresentou desempenho inferior, evidenciando a influência da proporção entre alginato e extrato sobre a eficácia antioxidante. No entanto, devido à elevada atividade já nas menores concentrações testadas, não foi possível concluir, neste estágio, se os efeitos observados nos blends decorrem de interações sinérgicas ou aditivas entre seus componentes. Estudos futuros com concentrações menores e aplicação de modelos estatísticos específicos serão necessários para elucidar esse ponto. Importante destacar que a substituição parcial do extrato por alginato, sem perda da eficiência antioxidante, representa um avanço em termos de sustentabilidade, custo-benefício e potencial aplicação em formulações farmacêuticas ou alimentícias. Por fim, o ensaio de citotoxicidade em fibroblastos da linhagem L929 demonstrou que o blend B15, assim como seus componentes isolados, não apresenta efeitos tóxicos nas concentrações avaliadas, inclusive na dose máxima de 1,0 mg/mL. Este achado reforça o perfil de segurança da formulação e abre caminho para futuras aplicações em modelos biológicos mais complexos. Dessa forma, conclui-se que os blends desenvolvidos, especialmente o B15, apresentam alta eficácia antioxidante *in vitro* e perfil de segurança celular favorável, configurando-se como candidatos promissores para aplicações terapêuticas ou preventivas frente a condições associadas ao estresse oxidativo, como inflamações crônicas, doenças neurodegenerativas, envelhecimento precoce e câncer.

Referências

SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 28, n. 2, p. 139–154, 2018. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of

cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013 Apr 4;368(14):1279-90. doi: 10.1056/NEJMoa1200303. Epub 2013 Feb 25. Retraction in: *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):2441-2442. Erratum in: *N Engl J Med*. 2014 Feb 27;370(9):886. Corrected and republished in: *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):e34. PMID: 23432189. NASEEM, Adila et al. Effect of herbal formulation intake on health indices in albino Wistar rat model. *Food Science & Nutrition*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 441-448, 10 nov. 2020. Aliasgharpour M. LOWERING EFFECTS OF LEMON AND FRESH GARLIC LIQUID MIXTURE ON SERUM LIPIDS LEVEL IN HYPERCHOLESTEROLEMIC WOMEN. *Int J Med Invest*. 2014 HUSSAIN, Abid 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. TABASUM, Shazia et al. A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 120, p. 603-632, dez. 2018. SOUZA, Bartolomeu W.s. et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids*, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 287-292, jun. 2012. Elsevier BV. SOUZA, Natália Cabral et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of blend formulated with compounds of *Malpighia emarginata* D.C (acerola) and *Camellia sinensis* L. (green tea) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.L.], v. 128, p. 110277, ago. 2020. ABOLHASSANI1, Moussa 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. OLIVEIRA, Ruth et al. Commercial Fucoidans from *Fucus vesiculosus* Can Be Grouped into Antiadipogenic and Adipogenic Agents. *Marine Drugs*, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 193, 4 jun. 2018. MDPI AG. OLIVEIRA, Leticia Castelo Costa 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, 1 ago. 2018. PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, [s.l.], v. 269, n. 2, p.337-341, maio 1999. CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 450-458, 1971. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. HAMPTON, M. B.; ORR, A. L.; BECKMAN, J. S. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in cultured cells using dichlorofluorescein diacetate. *Methods in Enzymology*, v. 300, p. 241-248, 1998. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. JESUMANI, Valentina; DU, Hong; PEI, Pengbing; ASLAM, Muhammad; HUANG, Nan. Comparative study on skin protection activity of polyphenol-rich extract and polysaccharide-rich extract from *Sargassum vachellianum*. *PLOS ONE*, v. 15, n. 1, p. e0227308, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0227308. Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 276-287, nov. 1971. AKASHI, M. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging activity by the deoxyribose method. *Food Chemistry*, v. 84, n. 4, p. 567-571, 2004.

Anexos

teste peróxido

teste hidroxila

MTT

ELETROFORESE

CÓDIGO: SB0339

AUTOR: LUCAS DE QUEIROZ MENEZES

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Análise dos níveis séricos de cortisol em pacientes com depressão resistente sujeitos a tratamento 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 (Wald²[2]=2,561; p=0,278). Houve interação significativa entre tempo e grupo (Wald²[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 Análise 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, Mannheim, 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) [$\text{Wald}^2(2) = 2,561$; $p = 0,278$]. 3.2 Mudanças nos níveis de cortisol sérico por subgrupos Foi observada uma interação significativa entre tempo e grupo ($\text{Wald}^2[2] = 11,941$; $p = 0,003$), 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. Ensaio 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

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

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: SB0343

AUTOR: KIVIA MILLANA DE SOUSA

ORIENTADOR: MANUELA SALES LIMA NASCIMENTO

TÍTULO: Avaliação Hematológica e Diagnóstico de Doenças Infecciosas Relacionadas à Demodicose Generalizada em Cães

Resumo

A demodicose é uma dermatopatia de relevância clínica em cães, desencadeada pela proliferação do ácaro *Demodex* spp. nos folículos pilosos. Pode ocorrer nas formas localizada ou generalizada, sendo esta frequentemente relacionada a alterações na resposta imunológica, decorrentes de infecções concomitantes, uso de fármacos imunossupressores, neoplasias ou predisposição genética. Em condições normais, pequenas populações de *Demodex* podem habitar a pele de cães saudáveis, mas sua detecção em raspados cutâneos de animais assintomáticos é incomum. Assim, a presença de *Demodex canis* em raspados profundos é considerada patológica. Este estudo teve como objetivo avaliar clinicamente e diagnosticar a demodicose generalizada em cães adultos. Para isso, 30 animais com sinais compatíveis foram incluídos, sendo realizados raspados cutâneos profundos de 2 cm² para detecção do ácaro e coleta de amostras sanguíneas para exames hematológicos, bioquímicos e imunológicos. Foram excluídos cães tratados previamente com ectoparasiticidas ou antibióticos nos últimos três meses. Infecções concomitantes por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* e *Dirofilaria immitis* foram investigadas por meio de testes rápidos de ELISA. Os animais positivos para *Demodex* spp. foram submetidos às análises laboratoriais complementares. Os resultados permitiram uma compreensão mais ampla dos fatores associados ao desenvolvimento da demodicose canina generalizada em adultos.

Palavras-chave: Demodicose, *Demodex* spp., *Demodex canis*, Demodicose generalizada

TITLE: Hematological Evaluation and Diagnosis of Infectious Diseases Related to Generalized Demodicosis in Dogs

Abstract

Demodicosis is a clinically relevant dermatopathy in dogs, caused by the proliferation of *Demodex* spp. mites within hair follicles. It may occur in localized or generalized forms, the latter often associated with alterations in the immune response due to concurrent infections, immunosuppressive drugs, neoplasms, or genetic predisposition. Under normal conditions, small populations of *Demodex* may inhabit the skin of healthy dogs, but their detection in skin scrapings from asymptomatic animals is uncommon; thus, the presence of *Demodex canis* in deep skin scrapings is considered pathological. This study aimed to clinically evaluate and diagnose generalized demodicosis in adult dogs. Thirty animals with compatible clinical signs were included. Deep skin scrapings (2 cm²) were performed for mite detection, and blood samples were collected for hematological, biochemical, and immunological

analyses. Dogs previously treated with ectoparasiticides or antibiotics within the last three months were excluded. Concurrent infections by *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, and *Dirofilaria immitis* were investigated using rapid ELISA tests. Animals positive for *Demodex* spp. underwent complementary laboratory analyses. The findings provide a broader understanding of the factors associated with the development of generalized canine demodicosis in adult dogs.

Keywords: Demodicosis , *Demodex* spp., *Demodex canis*, Generalized demodicosis

Introdução

A demodicose canina é uma dermatopatia de relevância mundial, desencadeada pela proliferação do ácaro *Demodex* spp. nos folículos pilosos dos cães (Zhao, 2012). Esse ectoparasita pertence à classe Arachnida, superordem Acariformes, ordem Trombidiformes, subordem Prostigmata, superfamília Cheyletoidea, família Demodicidae e gênero *Demodex*. A doença pode se apresentar nas formas localizada ou generalizada, sendo esta última frequentemente associada à imunossupressão decorrente de doenças concomitantes, uso de fármacos imunossupressores, neoplasias ou fatores genéticos do hospedeiro (Tani et al., 2002). Em condições normais, os cães abrigam pequenas populações de *Demodex* na pele, sem manifestações clínicas. A detecção desses ácaros em raspados de animais assintomáticos é rara, e a presença de *Demodex canis* em raspados cutâneos profundos indica alteração patológica. O ciclo do parasita ocorre nos folículos pilosos e glândulas sebáceas, alimentando-se de células, sebo e restos epidérmicos, completando-se em 18 a 24 dias. Fora do hospedeiro, o ácaro não sobrevive (Miller et al., 2013). A forma localizada representa cerca de 90% dos casos e, geralmente, apresenta evolução benigna, com resolução espontânea (Verde, 2005; Miller et al., 2013). Já a forma generalizada é mais grave e pode ser fatal (Miller et al., 2013; Carlotti, 2006). Estudos mostram que cães com demodicose generalizada apresentam exaustão de células T, marcada por baixa produção de IL-2 e outras citocinas efectoras, como TNF- α , além de níveis elevados de citocinas supressoras, como IL-10 e TGF- β . Também há redução no número de linfócitos T CD4⁺ circulantes (Dimri et al., 2014; Yi et al., 2010) e desequilíbrio na proporção CD4⁺/CD8⁺, com aumento de linfócitos T CD8⁺ em lesões cutâneas (Caswell et al.). Do ponto de vista hematológico, a doença frequentemente cursa com leucocitose, anemia e plaquetopenia (Miller et al., 2013; Verde, 2005). Além dos fatores imunológicos, doenças infecciosas contribuem para a progressão da demodicose. A leishmaniose visceral, causada por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* — sendo esta última predominante nas Américas e tendo o cão como principal reservatório — pode agravar quadros dermatológicos pela imunossupressão induzida pelo parasito e pelas condições ambientais que favorecem a coinfeção (Lainson et al., 2005; Moreira et al., 2016). Da mesma forma, a anaplasmose e a erliquiose canina, transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e causadas por *Anaplasma phagocytophilum*/*Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis*/*Ehrlichia ewingii*, respectivamente, também são relatadas como fatores que predis põem à demodicose (Greene, 2012). Estudos demonstram associação entre infecções por *Ehrlichia* spp. e doenças dermatológicas, incluindo a demodicose generalizada (Florez et al., 2020; Mozos, 1999). A erliquiose induz significativa imunossupressão, acompanhada de alterações hematológicas como monocitose, anemia, trombocitopenia e linfopenia, condições que favorecem a instalação e a progressão da demodicose (Kwochka, 1987; Sainz et al., 2000). Até o momento, não foram estabelecidas relações diretas entre a demodicose e infecções por *Dirofilaria immitis* ou pelos vírus da cinomose e da parvovirose.

Metodologia

-Animais e aspectos éticos Foram avaliados 30 cães com sinais clínicos sugestivos de sarna demodécica, provenientes de um abrigo de resgate. Após exame clínico inicial, realizaram-se raspados cutâneos profundos para confirmação parasitológica. Animais com lesões em mais de 50% da superfície corporal foram classificados com demodicose generalizada. Amostras de sangue e soro foram coletadas para hemograma, bioquímica sérica e investigação de doenças concomitantes. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRN), sob protocolo nº 023/2023. O recrutamento também incluiu visitas domiciliares a tutores de cães no bairro da Redinha (Natal/RN), com apoio do veterinário João Ciro Fagundes Neto. Os tutores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. -Diagnóstico parasitológico e escore clínico O diagnóstico foi realizado por raspados cutâneos profundos, precedidos de compressão manual para evitar áreas ulceradas com menor carga parasitária. Também foram feitos imprints para reduzir falsos negativos e descartar *Sarcoptes scabiei*. A demodicose foi considerada localizada quando atingia até 50% da pele e generalizada quando ultrapassava esse limite. O escore clínico foi classificado como: Leve/Moderado: alopecia, eritema, comedões, descamação. Avançado/Severo: infecções secundárias, pústulas, exsudação, furunculose e ulcerações. Quando necessário, os animais foram sedados e a reversão feita com Antisedan® (cloridrato de atipamezol), na dose de 10 vezes a de dexmedetomidina (Dexdomitor®), ajustada ao peso. -Hemograma e bioquímica sérica O sangue dos cães positivos para *Demodex* spp. foi analisado para hemograma completo e dosagens de AST, ALT, ureia e creatinina. As análises foram realizadas com kits IDEXX Catalyst® e leitura no analisador bioquímico Catalyst One®. Diagnóstico de doenças associadas Foram investigadas coinfeções que poderiam influenciar a evolução da demodicose: Erliquiose, anaplasmoses, borreliose e dirofilariose: realizados pelo ELISA rápido SNAP 4DXPLUS® (IDEXX, EUA), conforme recomendações do fabricante. Após preparo da amostra (150 µL de soro + 200 µL conjugado), o conteúdo foi transferido para a placa de teste, incubado e lido em até 8 minutos. -Leishmaniose visceral: avaliada pelos testes rápidos TR DPP® (Bio-Manguinhos, Brasil) e ALERE® (Alere Inc., EUA). No ALERE, adicionaram-se 10 µL de soro + 100 µL de tampão, com leitura após 20–30 minutos. No DPP, aplicaram-se 5 µL de soro + tampão, seguido de incubação de 5 minutos e adição de quatro gotas de tampão, com leitura final em até 15 minutos. -Análise estatística A análise foi conduzida no software GraphPad Prism® 10.1 (GraphPad, San Diego, EUA). A normalidade foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov e as correlações avaliadas pelo teste de Spearman. Resultados foram considerados significativos para $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussões

Para este estudo, foi selecionado um abrigo de cães na zona norte de Natal, RN, onde a quantidade de animais excedia as condições de higiene e infraestrutura disponíveis. Foram escolhidos 16 cães adultos, de porte médio a grande e sem raça definida, todos apresentando sinais sugestivos de sarna demodécica canina. O grupo era composto por 6 machos e 10 fêmeas, sem diferenças estatisticamente significativas quanto a raça, porte, sexo ou idade. Os cães foram identificados e avaliados quanto aos sintomas e extensão das lesões, classificadas como leves, moderadas ou graves segundo a metodologia de Mueller et al. (2012). Todos os cães apresentaram alopecia, localizada ou generalizada, sendo este o sintoma mais frequente, seguido por descamação (12/16), pododemodicose (7/16), eritema (7/16) e hiperqueratose

(5/16), com alguns animais apresentando alopecia generalizada e hiperqueratose acentuada. Raspados cutâneos para diagnóstico parasitológico revelaram positividade para *Demodex* spp. em 43,8% (7/16) dos animais, enquanto nenhum apresentou resultados positivos para *Sarcoptes scabiei*. Entre os cães com sarna demodécica generalizada, observou-se alopecia extensa, pododemodicose, lesões perioculares e cefálicas, pústulas foliculares, exsudação, furunculose com descamação e ulcerações. A contagem de ácaros variou de 1 a 3 adultos por animal, com alguns apresentando ninfas adicionais. Esses cães foram submetidos a análises hematológicas, bioquímicas e avaliação de infecções associadas. Testes para leishmaniose visceral, erliquiose, anaplasmoses, dirofilariose e borreliose revelaram que 100% (16/16) dos cães apresentaram anticorpos contra *Ehrlichia canis/ewingii*, independentemente da presença de sarna. Anticorpos contra *Anaplasma* spp. foram detectados em 28,6% (2/7) dos cães com sarna generalizada e em 33,3% (3/9) do grupo sem sarna confirmada. Para *Leishmania infantum*, testes ALERE e DPP demonstraram positividade em 28,6% (2/7) dos cães com sarna demodécica generalizada, enquanto no grupo sem sarna os valores foram de 22% (ALERE) e 11,1% (DPP). Nenhum cão apresentou positividade para *Borrelia* spp. As análises hematológicas mostraram redução na Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) em todos os cães com sarna generalizada, indicando anemia, além de alterações no Hematócrito (57% dos cães), Hemoglobina (28,5%), eritrócitos (14%), VCM e RDW, e monocitose em todos os casos. Trombocitopenia e leucocitose foram observadas em 85%, neutrofilia e eosinofilia em 57% e linfocitose em 14% dos cães. Alterações bioquímicas foram detectadas apenas em marcadores de função hepática, com elevações de ALT em 3 cães e AST em 1, enquanto ureia e creatinina permaneceram dentro dos valores de referência. A análise estatística demonstrou forte correlação entre a quantidade de ácaros nos raspados cutâneos e os níveis de AST ($r=0,91$; $p=0,003$) e ALT ($r=0,87$; $p=0,01$), evidenciando relação entre intensidade da infestação e comprometimento hepático. Os achados indicam que cães com sarna demodécica generalizada frequentemente apresentam monocitose, leucocitose, trombocitopenia e diagnóstico positivo para erliquiose e anaplasmoses, além de menor frequência para leishmaniose visceral e dirofilariose. Tais infecções concomitantes podem influenciar alterações hematológicas que favorecem o desenvolvimento do ácaro e intensificam os sinais clínicos da sarna. A prevalência de alopecia (100%), descamação (75%), eritema (43,75%), pododemodicose (43,75%) e hiperqueratose (31,25%) observada está em concordância com estudos prévios sobre a sintomatologia da demodicose canina. A persistência de anticorpos contra *Ehrlichia canis/ewingii* pode decorrer de reinfecções em áreas endêmicas ou reatividade prolongada após infecção aguda. Estudos anteriores documentaram a coexistência da demodicose generalizada com erliquiose e alterações hematológicas semelhantes às observadas neste estudo, reforçando a relevância da avaliação multifatorial em cães adultos com sarna generalizada. Além disso, a correlação entre número de ácaros e níveis de ALT e AST confirma achados prévios, indicando que a elevação dessas enzimas está associada ao dano hepático causado por subprodutos teciduais resultantes da infestação. O presente estudo evidencia a influência de infecções concomitantes e fatores imunossupressores na manifestação clínica da sarna demodécica generalizada em cães adultos, reforçando a necessidade de abordagens terapêuticas integradas para manejo clínico e prevenção de novos casos.

Conclusão

Com base nos dados obtidos, os cães afetados apresentaram principalmente alopecia e descamação, seguidos por pododemodicose, eritema e hiperqueratose. Esses sinais clínicos reforçam a importância do diagnóstico precoce para garantir um tratamento eficaz da sarna

demodécica. Além disso, a detecção universal de anticorpos contra *Ehrlichia canis/ewingii* nos cães com demodicose generalizada sugere uma possível relação entre essas condições. A presença de infecções concomitantes, como *Anaplasma spp.* e *Leishmania infantum* em uma proporção considerável dos casos, evidencia a necessidade de uma avaliação abrangente de múltiplas patologias em animais acometidos. As análises hematológicas e bioquímicas revelaram alterações compatíveis com a doença, incluindo anemia, leucocitose, monocitose, trombocitopenia e elevações nos marcadores de função hepática. A correlação significativa entre a carga parasitária nos raspados cutâneos e os níveis elevados de AST e ALT indica uma ligação direta entre a infestação por ácaros e o comprometimento hepático, destacando a importância de um controle efetivo da infestação para o manejo adequado da doença. Por fim, os resultados obtidos oferecem subsídios para aprimorar as práticas clínicas e podem servir como referência para futuras investigações nesta área.

Referências

BECSKEI, C. et al. Efficacy and safety of sarolaner against generalized demodicosis in dogs in European countries: a non-inferiority study. *Veterinary Dermatology*, v. 29, n. 3, p. 203-e72, 2018. BEUGNET, F. et al. Efficacy of oral afoxolaner for the treatment of canine generalized demodicosis. *Parasite*, v. 23, n. 14, 2016. CASWELL, J. L. et al. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. *Veterinary Pathology*, v. 34, n. 4, p. 263-368, 1997. DIMRI, U. et al. The immuno-pathological conversions of canine demodicosis. *Veterinary Parasitology*, v. 203, n. 1-2, p. 1-5, 2014. DJURIC, M. et al. Efficacy of oral fluralaner for the treatment of canine generalized demodicosis: a molecular-level confirmation. *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 270, 2019. GARCIA-REYNAGA, P. et al. New GABA/glutamate receptor target for [³H] isoxazoline insecticide. *Chemical Research in Toxicology*, v. 26, n. 4, p. 514, 2013. GARFIELD, R. A.; REEDY, L. M. The use of oral milbemycin oxime (Interceptor®) in the treatment of chronic generalized canine demodicosis. *Veterinary Dermatology*, v. 3, p. 231-235. GASSEL, M. et al. 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. 44, p. 111-124, 2014. GAZI, U. et al. Immune mechanisms in human and canine demodicosis: a review. *Parasite Immunology*, v. 41, n. 12, 2019. GHUBASH, R. et al. Clinical techniques in small animal practice. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 21, n. 3, p. 135-144. GREENE, E. C. *Infectious Disease of the Dogs and Cats*, 4th ed., p. 227-256, 2012. INOKUMA, H. et al. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 63, n. 3, p. 815-817, 2001. KWOCKHA, K. W. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v.17, n.1, p. 1263-1284, 1987. LAINSON, R. et al. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 811-827. LITWIN, D. et al. Human permanent ectoparasites: recent advances on biology and clinical significance of *Demodex* mites: narrative review article. *Iranian Journal of Parasitology*, v. 12, n. 1, p. 12-21, 2017. MEDERLE, N. et al. Diagnosis of canine demodicosis. *Scientia Parasitologica*, v. 11, n. 1, p. 20-23, 2010. MILLER, W. H. et al. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 7th ed., p. 304-313, 2013. MOREIRA, N. B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 1362, 2016. MORSY, T. A. et al. *Demodex* (follicular mite) infesting a boy and his pet dog. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 25, n. 2, p. 509, 1997. MOZOS, E. et al. Leishmaniosis

and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, v. 120, n. 3, p. 257-268, 1999. MUELLER, R. S. et al. Treatment of demodicosis in dogs: 2011 clinical practice guidelines. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 2, p. 86-e12, 2012. MURPHY, G. L. et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. v. 79, p. 325-339, 1998. NEUBER, A.; NUTTALL, T. Diagnostic techniques in veterinary dermatology. v. 1, p. 41-52, 2017. OZOE, Y. et al. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 391, n. 1, p. 744-749, 2010. PLANT, J. D. et al. A case-control study of the risk factors for canine juvenile-onset generalized demodicosis in the USA. *Veterinary Parasitology*, v. 22, n. 1, p. 95-99, 2011. RISHNIW, M. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, v. 135, p. 303-314, 2006. SAINZ, A. et al. Standardization of the diagnostic criteria for canine ehrlichiosis: towards a universal case definition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 396, 2000. SANTAREM, V. A. Demodicose canina: revisão. *Revista Clínica Veterinária*, n. 69, p. 86-98, 2007. SCOTT, D. W. et al. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6th ed., p. 423-526, 2001. SINGH, S. K.; DIMRI, U. The immuno-pathological conversions of canine demodicosis. *Veterinary Parasitology*, v. 203, n. 1-2, p. 1-5, 2014. SIX, R. H. et al. Efficacy of sarolaner, a novel oral isoxazoline, against two common mite infestations in dogs: *Demodex* spp. and *Otodectes cynotis*. *Veterinary Parasitology*, v. 222, p. 62-66, 2016. SNYDER, D. E. et al. Efficacy of lotilaner (Credelio™), a novel oral isoxazoline against naturally occurring mange mite infestations in dogs caused by *Demodex* spp. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 532, 2017. TAYLOR, M. A. et al. *Parasitologia veterinária*, 3. ed., Guanabara Koogan, p. 252, 2010. YI, J. S. et al. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, v. 129, p. 474-481, 2010. ZEWE, C. M. et al. Afoxolaner and fluralaner treatment do not impact on cutaneous *Demodex* populations of healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 28, n. 5, p. 468-e107, 2017. ZHAO, Y. E. et al. Complete sequence analysis of 18S rDNA based on genomic DNA extraction from individual *Demodex* mites (Acari: Demodicidae). *Experimental Parasitology*, v. 131, p. 45-51, 2012. (1) ZHAO, Y. E.; WU, L. P. RAPD-SCAR marker and genetic relationship analysis of three *Demodex* species (Acari: Demodicidae). *Parasitology Research*, v. 110, n. 6, p. 2395-2402, 2012. (2)

Anexos

Figura 1. Delineamento experimental

Figura 2: Dermograma canino utilizado para marcação das lesões clínicas

Figura 3. Local de recrutamento dos cães.

Tabela 1: Características da população de cães recrutada.

Tabela 2: Frequência de sintomas da sarna demodécica canina encontrada nos cães do estudo

Figura 4. Cães com extensas lesões características da Sarna Demodécica Generalizada

Figura 5. Ninfa de ácaro do gênero *Demodex* spp. em raspado cutâneo de cão doméstico.

Tabela 3. Ácaros do gênero *Demodex* observados nos raspados cutâneos de cães.

Tabela 4. Detecção de ácaros e microrganismos associados à Sarna Demodécica Canina.

Figura 6. CHCM, Hematócrito e Hemoglobina de cães com Sarna Demodécica Generalizada

Figura 7. Eritrócitos, VCM e RDW dos cães com sarna demodécica generalizada

Tabela 5. Resultados da série vermelha e raspados cutâneos dos cães com sarna demodécica generalizada.

Figura 8. Leucograma dos cães com Sarna Demodécica Generalizada. (

Tabela 6. Resultados da série branca dos cães com sarna demodécica generalizada.

Figura 9. Função hepática dos cães com sarna demodécica generalizada. (

Tabela 7. Resultados da função hepática dos cães com sarna demodécica generalizada.

Figura 10. Função renal dos cães com sarna demodécica generalizada.

Figura 11. Correlação entre o número de ácaros e valores de AST e ALT em cães com sarna demodécica generalizada.

Figura 12. Correlação entre variáveis bioquímicas, hematológicas e total de ácaros nos raspados cutâneos.

CÓDIGO: SB0344

AUTOR: VIVIAN GRACIELLY NASCIMENTO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Análise macroscópica e morfométrica da superfície da língua, palato duro e mole dos casos diagnosticados com lesões em glândulas salivares menores decorrente da indução do câncer oral.

Resumo

A carcinogênese oral representa um fenômeno multifatorial e complexo. A compreensão dos múltiplos e interdependentes mecanismos biológicos e moleculares envolvidos na carcinogênese evidencia a necessidade de investigações pormenorizadas, de modo a elucidar, os diferentes eventos celulares e teciduais que participam desse intrincado processo patológico. 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, apesar da frequência semelhante entre palato e língua, as lesões linguais foram mais precoces, agressivas e associadas à leucoplasia, enquanto no palato predominaram ulcerações, eritroplasia e maiores perímetros, evidenciando a influência da localização anatômica na evolução tumoral. O presente estudo tem como objetivo descrever e comparar as características clínicas, morfométricas de lesões malignas induzidas por 4NQO, considerando sua extensão superficial.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas. Língua. Palato. Neoplasias Bucais.

TITLE: Macroscopic and morphometric analysis of the surface of the tongue, hard palate, and soft palate in cases diagnosed with lesions of minor salivary glands resulting from oral cancer induction.

Abstract

Oral carcinogenesis represents a multifactorial and complex phenomenon. Understanding the multiple and interdependent biological and molecular mechanisms involved in carcinogenesis highlights the need for detailed investigations to elucidate the different cellular and tissue events that participate in this intricate pathological process. Thus, the clinicopathological analysis of chemically induced oral carcinogenesis is relevant for clarifying its developmental

mechanisms and the origin of alterations that compromise the oral cavity and its vital functions. In this context, a study was conducted using Wistar rats, a species widely employed due to its high similarity to the human system. The animals were subjected to chemical induction of carcinogenesis and evaluated regarding clinical and morphometric characteristics at different stages of oral carcinoma development. Overall, the results indicate that, despite the similar frequency of lesions in the palate and tongue, those located on the tongue were earlier, more aggressive, and associated with leukoplakia, whereas in the palate ulcerations, erythroplasia, and larger perimeters predominated, evidencing the influence of anatomical location on tumor progression. The present study aims to describe and compare the clinical and morphometric characteristics of malignant lesions induced by 4NQO, considering their surface extension.

Keywords: Carcinoma, Squamous Cell. Tongue. Palate. Mouth Neoplasms.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a incidência de câncer permanece elevada. Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimam 704 mil novos casos anuais até o ano de 2025. O carcinoma epidermoide constitui a neoplasia maligna mais prevalente da cavidade oral, tendo origem no epitélio escamoso. Embora possa manifestar-se em qualquer superfície bucal, apresenta maior predileção pela borda lateral da língua, pelo lábio inferior e pelo assoalho bucal. A doença acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino, geralmente acima da quinta década de vida, com maior prevalência entre 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 bétela, 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 epidermoide 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). 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, de maneira descritiva e comparativa, as características clínicas e morfométricas, levando em consideração a extensão superficial e a profundidade das lesões invasivas do espectro maligno induzidas quimicamente pelo 4NQO.

Metodologia

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização do estudo

Este estudo foi conduzido no Biotério e Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), entre setembro/2024 e agosto/2025. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFRN sob protocolo nº 317.051/2022.

2.2 Animais experimentais

Foram utilizados 50 ratos machos da linhagem Wistar, com idade de 8-30 semanas e peso corporal entre 200-250g, provenientes do Biotério de Biociências da UFRN. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (3 ou 4 animais/gaiola) provida de bebedouros e comedouros sob condições controladas: temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com ração comercial balanceada e água ad libitum.

2.3 Delineamento experimental

Os animais foram randomizados em 2 grupos:

Grupo Controle (GC): 10 ratos, esses animais foram submetidos apenas a água ad libitum.

Grupo Experimental (GE): 40 ratos, esses animais tiveram o agente carcinógeno 4-NQO diluído em sua água.

2.4 Indução da carcinogênese

A carcinogênese bucal foi induzida usando o agente carcinógeno 4-NQO diluído na água presente no bebedouro. A remoção da lesão foi realizada sob anestesia com ketamina 5% e xilazina 2% via intraperitoneal, foi aplicado 0,3 ml da solução a cada 100g, como mostrado na figura 1.

2.5 Avaliação clínica (Macroscópica)

As lesões foram fotografadas com câmera Canon Rebel T6 e macro lente de 100 mm. Foram coletadas informações acerca de: tipo de inserção, evidenciação de úlceras, variações de coloração, variação topográfica, mensuração do perímetro da lesão utilizando o software Image J (National Institute of Health-NIH), como mostra a figura 2.

2.6 Processamento histopatológico

Foram preparados cortes com 5 μm de espessura, e montados em lâminas de vidro, em seguida corados com hematoxilina/eosina (H/E).

Técnica histoquímica da H/E

Xilol I (15 minutos)

Xilol II (15 minutos)

Álcool Absoluto (3 minutos)

Álcool 95° GL (3 minutos)

Álcool 70° GL (3 minutos)

Água corrente (5 minutos)

Hematoxilina de Harris (5 minutos)

Água corrente (5 minutos)

Solução álcool-ácida a 1% (passagem rápida)

Água corrente (5 minutos)

Eosina de Lison (2 minutos)

Álcool 70° GL (3 minutos)

Álcool 95° GL (3 minutos)

Álcool Absoluto (3 minutos)

Xilol I (3 minutos)

Xilol II (3 minutos)

Xilol III (3 minutos)

Montagem em Resina Permunt® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)

2.7 Análise morfométrica

Após a remoção da língua e do palato dos ratos, as lesões foram fotografadas para posteriormente serem medidas utilizando o software Image J, onde foi estabelecido o perímetro das lesões .

2.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente para avaliar as hipóteses do estudo. Os dados serão registrados em planilha Excel (Microsoft Windows XP Home Edition®) e exportados para formato DBF (Data Base Format), permitindo a leitura e análise pelo software GraphPad InStat (GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 95®, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), no qual serão realizadas as análises estatísticas.

2.9 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 epidermóides orais induzidos quimicamente em ratos” e foi submetido à aprovação de seu conteúdo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN).

2.10 Equipamentos e Material de Consumo

Equipamentos:

- 1) Vidraria
- 2) Caixa para criação de ratos (414 x 344 x 174 mm)
- 3) Câmera Fotográfica Canon Rebel T6 com macro lente de 100mm
- 4) Cabo para bisturi

2.12 Material de Consumo:

- 1) Papel Toalha
- 2) Navalhas descartáveis
- 3) Luvas
- 4) Formaldeído P.A
- 5) Álcool 70°GL
- 6) Água Destilada
- 7) Maravalha
- 8) Ração para ratos
- 9) Lâminas para bisturi (Nº 11 e 15)

Parte dos equipamentos e do material de consumo foram cedidos pelo Laboratório de Técnicas Histológicas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional do Departamento de Morfologia da UFRN.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS

3.1 Análise comparativa entre lesões palatinas e linguais

A análise evidenciou diferenças importantes no comportamento biológico e no padrão de desenvolvimento tumoral. Foram analisados 81 casos, sendo 49,38% (n=40) localizadas no palato e 50,62% (n=41) em língua, em diferentes tempos experimentais: 8 semanas (n=10), 12 semanas (n=10), 16 semanas (n=8), 19 semanas (n=3), 20 semanas (n=6), 22 semanas (n=2), 23 semanas (n= 14), 24 semanas (n=8), 25 semanas (n=2), 26 semanas (n=2), 27 semanas (n=8), 28 semanas (n=4) e 30 semanas (n=4). Todos os animais desenvolveram lesões macroscópicas visíveis nas regiões de aplicação do carcinógeno.

3.2 Análise do tempo de indução das lesões

O tempo de indução variou entre 8 e 30 semanas. Sendo que a maior concentração de casos ocorreu em 23 semanas, correspondendo a 17,28% (n=14), distribuídos igualmente entre palato e língua (8,64% cada). Em seguida, destacaram-se os tempos de 8 e 12 semanas, ambos com 12,35% (n=10), e de 24 e 27 semanas, cada um representando 9,88% (n=8). Os tempos de 16 semanas apresentaram 9,88% (n=8), enquanto 20 semanas corresponderam a 7,41% (n=6). Frequências menores foram observadas em 19 semanas (3,70%; n=3), 22, 25 e 26 semanas (2,47% cada; n=2) e nos períodos de 28 e 30 semanas (4,94% cada; n=4). No total, 49,38% (n=40) dos casos ocorreram em palato e 50,62% (n=41) em língua (Figura 3 e Tabela 1). Esses dados sugerem que, embora haja um pico na 23 semana, o desenvolvimento tumoral pode ser considerado progressivo e heterogêneo, com diferentes tempos de manifestação.

3.3 Padrão de crescimento

Observou-se que as lesões linguais apresentaram crescimento tumoral mais precoce e agressivo em comparação às palatinas. Nas primeiras oito semanas, o crescimento foi evidente nas lesões linguais, enquanto nenhuma evolução foi registrada nas palatinas. Em ambas as localizações anatômicas, o padrão de crescimento predominante foi o exofítico. Nos 81 casos, 62,96% (n=51) apresentaram implantação sésil, sendo 35,80% (n=29) em palato e 27,16% em língua, e 37,04% (n=30) dos casos apresentaram implantação pediculada, sendo 13,58% (n=11) em palato e 23,46% (n=40) em língua. Como ilustrado na figura 4 e tabela 2.

3.4 Padrão de implantação

O padrão de implantação mostrou diferenças anatômicas marcantes. Entre os casos sésseis, 35,80% (n=29) ocorreram em palato e 27,16% (n=22) em língua. Já para as pediculadas, 13,58% (n=11) foram registradas em palato e 23,46% (n=19) em língua. Então, 62,96% (n=51) apresentaram implantação sésil e 37,04% (n=30) pediculada. Considerando o total por localização anatômica, observaram-se 49,38% (n=40) dos casos no palato e 50,62% (n=41) na língua (figura 5 e tabela 3).

3.5 Presença de ulceração

O padrão de presença de úlcera verificou-se que 58,0% (n=47) apresentavam úlcera, enquanto 42,0% (n=34) não manifestavam esta característica clínica. Relacionado aos sítios de aparecimento observou-se que 35,8% (n=29) correspondiam às lesões de palato e 22,2% (n=18) as de língua. Quanto aos casos sem úlcera obteve-se 28,4% (n=23) de lesões em língua e 13,6% (n=11) em palato (Figura 6 e tabela 4).

3.6 Presença de lesão eritroplásica

Relacionado a presença de lesão eritroplásica notou-se que 79,01% (n=64) dos casos ela estava presente, sendo 44,44% (n=36) em palato e 34,57% (n=28) em língua. No entanto, a ausência de lesão eritroplásica foi registrada em 20,99% (n=17) dos casos, distribuídos como 4,94% (n=4) em palato e 16,05% (n=13) em língua. Como mostra a figura 7 e a tabela 5.

3.7 Presença de lesão leucoplásica

A presença de lesão leucoplásica foi observada em 87,65% (n=71) dos casos, correspondendo a 37,04% (n=30) em palato e 50,62% (n=41) em língua. A ausência de lesão leucoplásica

ocorreu em 12,35% (n=10), sendo registrada exclusivamente em palato, conforme demonstrado na Figura 8 e na Tabela 6.

3.8 Perímetro da lesão

O perímetro das lesões variou de 1 a mais de 15 cm. Lesões entre 10-15 cm foram mais frequentes, correspondendo a 61,73% (n=50) dos casos, sendo 25,93% (n=21) em palato e 35,80% (n=29) em língua. Lesões de 1-5 cm representaram 9,88% (n=8), todas localizadas em palato. Perímetros de >5-10 cm ocorreram em 9,88% (n=8), distribuídos entre palato (1,23%; n=1) e língua (8,64%; n=7). Lesões maiores que 15 cm corresponderam a 18,52% (n=15), sendo 12,35% (n=10) em palato e 6,17% (n=5) em língua. Como demonstrado na figura 9 e na tabela 7.

4. DISCUSSÃO

Os achados deste estudo evidenciam diferenças entre lesões palatinas e linguais em aspectos de tempo de evolução, padrão de crescimento e características clínicas, o que sugere uma heterogeneidade comportamental dependente da localização anatômica. As lesões linguais apresentaram uma resposta mais precoce e agressiva na oitava semana, esse comportamento pode ser explicado, em parte, pela elevada vascularização da língua, que favorece tanto o crescimento quanto a disseminação dos tumores malignos. A via linfática, predominante na metastização de carcinomas linguais, especialmente para a cadeia cervical profunda, reforça esse potencial de disseminação precoce (POONJA, 2018). Apesar do carcinoma epidermóide ser capaz de se originar em qualquer local da mucosa, a literatura aponta a língua como um dos sítios mais frequentemente acometidos (MELO et al., 2021), enquanto o palato duro é atingido com menor frequência (RAMADAN et al., 2023). Embora o palato possa ser acometido com menos frequência, pacientes com câncer primário no palato apresentam risco aumentado de desenvolver tumores secundários em regiões como hipofaringe e esôfago (SU et al., 2019). No entanto, nossos achados mostram que lesões palatinas também devem ser vistas com atenção, pois embora menos comuns, podem apresentar sinais clínicos relevantes.

Um exemplo disso foi a predominância de úlceras nas lesões palatinas, representando 38,5% (n=29) dos casos, o que contradiz parcialmente a expectativa de maior agressividade nas lesões linguais. Isso pode estar relacionado à evolução silenciosa das lesões no palato, levando ao diagnóstico em estágios mais avançados, quando a ulceração já está presente. Além disso, é importante destacar que úlceras malignas podem ser clinicamente semelhantes a lesões benignas ou infecciosas, como a paracoccidiodomicose, o que dificulta o diagnóstico precoce. Nessas situações, a persistência, induração e ausência de cicatrização após a remoção de fatores traumáticos indicam malignidade e justificam a realização de biópsia incisional (CAVALCANTE et al., 2024).

No que se refere às lesões eritroplásicas foram registradas em 79,01% (n=64) dos casos, o que reforça sua importância clínica. Embora não tenham sido as mais frequentes, sua relevância reside na alta taxa de transformação maligna, sendo consideradas a lesão potencialmente maligna (LPM) com maior potencial de progressão para carcinoma epidermóide de boca, apresenta-se clinicamente como mancha vermelha de difícil caracterização que exige cautela diagnóstica e acompanhamento rigoroso. Ainda assim, a literatura aponta a necessidade de mais estudos que correlacionam as características clinicopatológicas da eritroplasia com sua transformação maligna efetiva (LORENZO-

POUSO et al., 2022). Já as lesões leucoplásicas foram a LPM mais frequente do estudo, com 87,65% (n=71) dos casos. Essa alta prevalência está em concordância com estudos anteriores, que a reconhecem como a LPM mais comum da cavidade oral, apesar de sua taxa de transformação ser inferior à da eritroplasia. Entretanto, a presença de displasia nessas lesões representa um fator de risco significativo para malignização, especialmente considerando que, mesmo após a transformação, a aparência clínica pode permanecer inalterada, pesquisas demonstram que mais de 40% dessas lesões progridem para CEB (GUAN et al., 2023). Esse dado enfatiza a importância do acompanhamento clínico periódico, independentemente da ausência de alterações visíveis.

Outro aspecto relevante foi o perímetro das lesões. A maioria dos casos apresentou perímetro entre 10 e 15 cm, correspondendo a 61,73% (n=50), com variações de 1 a 15 cm. Embora o estadiamento tumoral tradicional ainda se baseie em critérios clínicos e anatômicos, estudos recentes têm apontado o volume tumoral como um possível marcador prognóstico mais sensível. Ainda assim, esse parâmetro necessita de padronização e validação para uso clínico rotineiro (TOFANELLI et al., 2023). Nossos dados reforçam essa necessidade, ao demonstrar que grandes dimensões são comuns mesmo em estágios iniciais de avaliação.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a localização anatômica exerce uma influência significativa sobre as características clínicas e morfológicas das lesões orais induzidas. As lesões linguais apresentaram crescimento mais precoce e agressivo, maior frequência de implantação pediculada e elevada associação com leucoplasia, sugerindo maior potencial de progressão rápida para formas invasivas de carcinoma. Por outro lado, as lesões palatinas mostraram maior ocorrência de ulceração e implantação séssil, podendo evoluir mesmo na ausência de alterações leucoplásicas, o que evidencia que diferentes microambientes teciduais modulam a apresentação e evolução tumoral. O perímetro das lesões variou amplamente, predominando na faixa intermediária (10–15 mm) em ambos os sítios, indicando heterogeneidade no crescimento tumoral mesmo dentro de um mesmo animal modelo. Esses achados ressaltam a importância de considerar a anatomia local na avaliação, monitoramento e interpretação das lesões, evidenciando perfis clínico-morfológicos distintos que podem influenciar não apenas a progressão tumoral, mas também a resposta a intervenções terapêuticas. A análise morfométrica complementa a avaliação clínica e histopatológica, permitindo quantificar alterações estruturais e correlacioná-las com o comportamento biológico das lesões, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de carcinogênese oral e reforçando a necessidade de estratégias diagnósticas e preventivas específicas para diferentes sítios da cavidade oral.

Referências

REFERÊNCIAS

1. CAVALCANTE, C. R. et al. Single ulcers on the tongue dorsum: differential diagnosis between paracoccidioidomycosis and squamous cell carcinoma. *Medicina oral, patologia oral y cirurgia bucal*, v. 29, n. 4, p. e533–e536, 2024.

2. 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.
3. 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.
4. GUAN, Jing-Yao et al. Malignant transformation rate of oral leukoplakia in the past 20 years: A systematic review and meta-analysis. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v. 52, n. 8, p. 691–700, 2023.
5. LORENZO-POUSO, Alejandro I. et al. Atualização crítica, revisão sistemática e meta-análise da eritroplasia oral como uma doença oral potencialmente maligna. *Journal of oral pathology & medicine: publicação oficial da Associação Internacional de Patologistas Orais e da Academia Americana de Patologia Oral*, v. 51, n. 7, p. 585–593, 2022.
6. MELO, Bernardo Augusto de Carvalho et al. Human papillomavirus infection and oral squamous cell carcinoma - a systematic review. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, v. 87, n. 3, p. 346–352, 2021.
7. NEVILLE, Braw W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Guanabara Koogan, 2016, 2021. 912 p. ISBN 9788535265644.
8. 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.
9. POONJA, Preethi. Chronic ulcer of lateral tongue - A case report. *Austin journal of dentistry*, v. 5, n. 5, 2018.
10. RAMADAN, Salma et al. Neighborhood socioeconomic status and race are associated with incidence disparities in oral cavity cancers. *Oral oncology*, v. 147, n. 106607, p. 106607, 2023.
11. SU, William Wang-Yu et al. Risk for a second primary hypopharyngeal and esophageal cancer after an initial primary oral cancer. *Oral diseases*, v. 25, n. 4, p. 1067–1075, 2019.
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. TOFANELLI, Margherita et al. Is there a role for tumor volume in prediction of prognosis for oral cancer? *American journal of otolaryngology*, v. 44, n. 2, p. 103740, 2023.
14. PERERA, M. et al. Inflammatory bacteriome and oral squamous cell carcinoma. *Journal of dental research*, v. 97, n. 6, p. 725–732, 2018.

Anexos

Figura 1 – Sequência do protocolo de indução.

Figura 3 - Tempo de indução das lesões linguais e palatinas

Tabela 1 - Tempo de indução das lesões linguais e palatinas

Figura 4 – Tipo de crescimento tumoral em lesões linguais e palatinas

Tabela 2 - Tipo de crescimento tumoral em lesões linguais e palatinas

Figura 5 – Comparação do padrão de implantação

Tabela 3 – Comparação do padrão de implantação

Figura 6 – Presença de úlcera

Tabela 4 – Presença de úlcera

Figura 7 – Presença de lesão eritroplásica

Tabela 5 – Presença de lesão eritroplásica

Figura 8 – Presença de leucoplasia

Tabela 6 – Presença de leucoplasia

Figura 9 – Perímetro da lesão

Tabela 7 – Perímetro da lesão

Figura 2 - Imagens macroscópicas das lesões

CÓDIGO: SB0354

AUTOR: SOFIA DUARTE COSTA

ORIENTADOR: RAQUEL CORDEIRO THEODORO

TÍTULO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FUNGEMIAS E OUTRAS INFECÇÕES
INVASIVAS POR ESPÉCIES DE CANDIDA EM PACIENTES INTERNADOS NO
HOSPITAL ONOFRE LOPES, NATAL/RN

Resumo

O gênero *Candida* possui fungos descritos como comensais, que causam doenças devido a sua proliferação excessiva, como a *Candida albicans*, e espécies normalmente associadas a infecções oportunistas, por ocorrerem em pacientes imunocomprometidos, como a *Candida parapsilosis*. Estas espécies apresentam significativa variabilidade genética que pode estar relacionada a resistência a antifúngicos e mortalidade, assim, o diagnóstico genótipo-específico é de grande importância. *C. albicans* pode ser genotipada pela presença do intron do grupo I (IGI) no gene 25S nuclear, o qual pode estar associado a maior susceptibilidade a antifúngicos, já o complexo *C. parapsilosis* pode ser dividido em três espécies diferentes, com distintos perfis de virulência, de acordo com a presença do intein no gene ATPase vacuolar (VMAi). Dessa forma, os isolados dessas espécies, recebidos do Hospital Universitário Onofre Lopes, foram submetidos à extração de DNA e ao PCR, do IGI do 25S para *C. albicans* e do VMAi para isolados do complexo *C. parapsilosis*. Após a identificação molecular dos isolados, observou-se a maior prevalência do genótipo A de *C. albicans* (ausência do IGI) e da espécie *C. parapsilosis stricto sensu* do complexo *C. parapsilosis*.

Palavras-chave: Candidemia. Antifúngico. Resistência. Genotipagem. Tratamento

TITLE: MOLECULAR DIAGNOSIS OF FUNGEMIA AND OTHER INVASIVE
INFECTIONS BY CANDIDA SPECIES IN INPATIENTS AT ONOFRE LOPES
HOSPITAL, NATAL/RN

Abstract

The genus *Candida* comprises fungi described as commensals, which cause diseases due to their excessive proliferation, such as *Candida albicans*, and species normally associated with opportunistic infections, as they occur in immunocompromised patients, such as *Candida parapsilosis*. These species exhibit significant genetic variability that may be related to antifungal resistance and mortality; thus, genotype-specific diagnosis is of great importance. *C. albicans* can be genotyped by the presence of the group I intron (IGI) in the nuclear 25S gene, which may be associated with greater antifungal susceptibility, while the *C. parapsilosis* complex can be divided into three different species with distinct virulence

profiles, according to the presence of the intein in the vacuolar ATPase gene (VMAi). Therefore, isolates of these species, received from the Onofre Lopes University Hospital, were subjected to DNA extraction and PCR for the 25S IGI for *C. albicans* and for the VMAi for isolates of the *C. parapsilosis* complex. After molecular identification of the isolates, a higher prevalence of genotype A of *C. albicans* (absence of the IGI) and of the species *C. parapsilosis stricto sensu* of the *C. parapsilosis* complex was observed.

Keywords: Candidemia. Antifungal. Resistance. Genotyping. Treatment

Introdução

O gênero *Candida* é apontado como sétima maior causa de septicemias em 16 hospitais brasileiros (Doi et al., 2016), sendo *Candida albicans* a mais frequente (Lamoth et al., 2018), estando associadas a quadros de imunossupressão (SORIANO et al., 2023). Dentre os fatores de virulência destes fungos estão a evasão do sistema imune do hospedeiro, habilidade de conversão entre as formas leveduriformes e de hifa/pseudohifa, e a produção de biofilme (PRISTOV, 2019). *C. albicans*, uma das espécies mais comuns em septicemias é um comensal que coloniza regiões como, trato gastrointestinal, aparelho reprodutor feminino, cavidade oral e pele. Alterações na configuração desses ambientes, causadas por fatores como imunossupressão ou mudança de pH, por exemplo, podem alterar os seus equilíbrios e favorecer sua proliferação (Gulati M, Nobile CJ, 2016). Além da *C. albicans*, a *Candida parapsilosis* é uma das mais importantes espécies causadoras de candidemia (Bruder-Nascimento, A., et al., 2010). Isso ocorre, pois essa espécie é capaz de produzir biofilmes em catéteres e em outros dispositivos médicos, usados em pacientes que passam por intervenções médicas invasivas (Tóth, Renáta, et al., 2019). A alta taxa de mortalidade por candidíase invasiva, (SORIANO et al., 2023), se deve à emergente resistência antifúngica pelas espécies de *Candida*, à equinocandinas e aos azólicos (PRISTOV, 2019), que pode variar dentro dos genótipos de uma espécie ou complexo. Assim, uma identificação genótipo-específica é necessária para o direcionamento do tratamento. Dentre marcadores de identificação possíveis, ressaltamos aqui o intein VMA (VMAi) presente no complexo *Candida parapsilosis* (Prandini, Tâmara Heloísa Rocha et al., 2013) e o intron autocatalítico do grupo I, presente no gene nuclear 25S (25S-IGI) de *C. albicans* (Tantivitayakul, P, 2019). O complexo *C. parapsilosis* foi classificado em 3 espécies diferentes: *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis*, que possuem perfis distintos de virulência e resistência (Tavanti, Arianna et al., 2005). Essas espécies podem ser diferenciadas por PCR, pela presença do VMAi, resultando em fragmentos de PCR de 319pb, 1681pb e 1909pb, respectivamente (Prandini, Tâmara Heloísa Rocha et al., 2013). Inteins são sequências de DNA transcritas e traduzidas juntamente com a sequência hospedeira (TOPILINA et al., 2015) que sofrem um auto-splicing proteico, garantindo a funcionalidade da proteína e modulando a expressão gênica em um nível pós-traducional (TOPILINA et al., 2015). Presentes na região 25S do rDNA de *C. albicans*, os introns ou ribozimas do grupo I, pequenas sequências não codificantes de RNAs capazes de realizar sua autocatálise e a ligação de RNA no processo de splicing (NIELSEN et al., 2009), são alvos de alguns medicamentos análogos de base, como a 5-fluocitosina, que atuam impedindo a sua excisão, e então, a formação do rRNA 25S maduro (Król, J, 2019). De acordo o tamanho 25S-IGI, *C. albicans* pode ser dividida em 3 genótipos: A (450 pb), B (840 pb) e C (450-840 pb), sendo os genótipos B e C os únicos portadores da ribozima (Tantivitayakul, P, 2019).

Segundo Tantivitayakul, P (2019), a presença de íntrons do grupo I não influencia na suscetibilidade dos genótipos de *C. albicans* a antifúngicos, já de acordo com Król, J. (2019), o genótipo de *C. albicans* sem os introns do grupo I é duas vezes mais resistente à 5-flucitosina. Assim, há necessidade de estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos de funcionamento dessas ribozimas e suas implicações para o metabolismo celular da *C. albicans*.

Assim, o principal objetivo deste plano de trabalho foi genotipar um banco de cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, isoladas de diferentes amostras clínicas ou sítios anatômicos e previamente identificadas como espécies de *Candida*, pelo sistema automatizado Vitek-2 (Biomérieux) ou alternativamente pelo Chromagar (Difco) em atual estudo prospectivo de pacientes internados no HUOL (CAAE: 70154823.5.1001.5054).

Metodologia

2.1 Cultivo de amostras

Os isolados utilizados foram disponibilizados pelo Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), em atual estudo prospectivo sobre incidência e resistência a antifúngicos de *Candida* isoladas de pacientes internados no HUOL (CAAE: 70154823.5.1001.5054). Neste caso, apenas leveduras previamente identificadas como *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram incluídas neste estudo (Tabela 1). As amostras vindas do Hospital Universitário foram isoladas em placas de BHI (Brain Heart Infusion) ou ASD (Ágar Sabouraud Dextrose) e incubadas a 37 °C por 24 horas, para posterior extração de DNA. Todas as amostras foram congeladas, após 24 horas de crescimento, a -30°C em microtubos de 1,5ml contendo BHI-caldo e glicerol 20%.

2.2 Extração de DNA

A extração do material genético foi feita a partir do método caseiro feito por Van Burik (VANBURIK, 1998). Nesse método, 2 a 3 alçadas do isolado são colocadas em um microtubo de 1,5 ml com glass beads, ou 3 bolas de vidro e 500 µl de tampão de extração. Em seguida, utiliza-se o vórtex por 7 minutos, se utilizadas as bolas de vidro, ou por 15 minutos, se utilizadas as glass beads, para auxiliar a lise mecânica da membrana plasmática. O material é então centrifugado a 12000 x g por 15 minutos, e a fase sobrenadante é removida e re-extraída em igual volume de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1). Após isso, as amostras são centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos, e adicionadas a volume igual de Clorofórmio/Álcool isoamílico (24:1). As soluções vão à centrífuga novamente a 12000 x g por 10 minutos, a fase aquosa é removida e precipitada com 10µl de acetato de potássio 5M e 0,54 x volume do recuperado de isopropanol 99%. O material retorna à centrífuga a 12000 x g por 10 minutos, despreza-se o sobrenadante e o pellet é lavado com 500µl de etanol 70% 3 vezes. Os microtubos são deixados inclinados em uma estufa a 45°C para evaporação total do álcool. Por fim, o pellet é ressuscitado com 50µl de Nuclease Free Water e mantido a -20°C.

2.3 Identificação e genotipagem de *Candida*

Os isolados clínicos provenientes de pacientes atendidos ou internados no ambulatório (nomeados como VIGI) de dermatologia (nomeados como VIGD) do HUOL são previamente identificados pelo Phoenix, Chromagar e Maldi-tof, e aqueles identificados como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* ou que obtiverem resultados inconclusivos serão identificados

molecularmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As espécies de *C. albicans* serão submetidas à amplificação da região 25S do rDNA para a avaliação da distribuição do intron autocatalítico. Os espécimes do complexo *Candida parapsilosis* serão analisados quanto à presença do intein na região conservada da membrana vacuolar ATPase (VMA). Por fim, os isolados que obtiverem resultados inconclusivos serão sequenciados pela Macrogen Korea para comparação das sequências obtidas com as disponíveis nos bancos de dados de referência, para identificação de espécies.

Os primers utilizados para amplificar introns do grupo I na região 25S do rDNA de *C. albicans* são CA-INT-L (5' ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTAA-3') e CA-INT-R (5'- CCTTGGCTGTGGGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3) (McCullough et al., 1999). As reações de amplificação são realizadas cada uma com volume total de 12,5 µl, contendo 6,1875 µl de NFW, 2,5 µl de tampão de PCR, 1,5 µl de MgCl₂, 0,375 µl de DMSO 30%, 0,25 µl de dNTP, 0,3125 µl de cada primer, 0,0625 µl de Taq DNA polimerase e 1 µl de DNA. A termociclagem da PCR é realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 65°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os primers utilizados para a amplificação do intein VMA dos fungos do complexo “psilosis” serão usados os primers TP1fwd ACTGCTGATTAYCCATTGTTG e TP2rev, AGATTGAWGCTTCTCTKGCAG) (PRANDINI et al., 2013). As condições da reação de PCR e termociclagem são as mesmas, com exceção da temperatura de anelamento, que neste caso é de 55° C.

A identidade dos fungos cujas identificações por outros métodos foram incongruentes será confirmada por PCR e sequenciamento da região ITS a partir dos primers ITS1 ou ITS4 e ITS5 (White et al., 1990). As condições da reação de PCR e termociclagem são as mesmas, com exceção da temperatura de anelamento, que neste caso é de 60° C. Todos os produtos de PCR serão sequenciados pela Macrogen Korea. As sequências serão comparadas com sequências de referência depositadas no GenBank para a identificação das espécies.

Resultados e Discussões

3.0- RESULTADOS

3.1 Cultivo de amostras

Os isolados clínicos oferecidos pelo Hospital Onofre Lopes foram submetidos a análises pelo Phoenix, Chromagar e Maldi-Tof (TABELA 1), a partir das quais foram identificados como *Candida albicans*, ou *Candida parapsilosis*, com exceção da amostras que apresentaram resultados inconclusivos. Todos esses isolados foram subcultivados em BHI-ágar por 24 horas, para posterior congelamento a -30°C em microtubo com BHI caldo e glicerol 20%, na micoteca do LAMIM-IMT.

3.2 Extração de DNA

As amostras, advindas do Hospital Universitário Onofre Lopes, foram submetidas à extração de DNA com bolas de vidro, ou Glass Beads para a lise mecânica da membrana plasmática. Os DNAs extraídos foram observados por meio da técnica de eletroforese (IMAGEM 1) e do

sistema de NanoDrop para a para análise de suas concentrações. Os espécimes que apresentaram concentração de DNA superior a 150 ng/μl foram diluídos em proporções de 1:5, 1:10 ou 1:20, para melhor adequação à reação em cadeia da polimerase realizada em seguida.

3.3 Identificação e genotipagem de *Candida*

A identificação molecular por PCR dos isolados clínicos de *Candida albicans* advindos do HUOL foi realizada, pela amplificação da região 25S do rDNA para avaliação da distribuição de introns do grupo I, seguida por uma eletroforese para visualização do resultado das reações em cadeia da polimerase. Assim, foi verificado que os isolados apresentaram, em sua maioria, apenas uma banda na eletroforese, com cerca de 450 pares de base, configuração que caracteriza o genótipo A, sem íntron. O isolado VIGI-08 não obteve banda no gel de eletroforese, as amostras Vigi-12, Vigi-26B, Vigi-57, Vigi-75, Vigi-77, Vigi-78A e Vigi-85 e VigiD-4-B apresentaram resultados inconclusivos, logo, serão todos enviados para sequenciamento pela Macrogen Korea.

As espécies identificadas previamente pelo Phoenix, Chromagar e Maldi-Tof como *Candida parapsilosis* foram genotipadas por PCR, para amplificação da região conservada da membrana vacuolar ATPase, para avaliação da presença do intein. A partir da análise do gel de eletroforese das sequências obtidas por PCR, foi observado que a maioria das amostras, (Vigi-01, Vigi-09, Vigi-46, Vigi-51, Vigi-52, Vigi-53, Vigi-54 e Vigi-55) apresentou cerca de 319pb, situação que caracteriza a espécie *Candida parapsilosis stricto sensu*. As amostras Vigi-47, Vigi-48, Vigi-49, Vigi-62, Vigi-69, Vigi-70 e Vigi-71 apresentaram o resultado de *C. orthopsilosis*.

4.0 - DISCUSSÃO

O intron autocatalítico do grupo I, no rDNA da *Candida albicans* tem sido utilizado como marcador molecular para genotipagem deste fungo. Esse intron possui cerca de 379 pares de base e pode aumentar a suscetibilidade dos isolados nos quais estão inseridos, à antifúngicos análogos de base, como o caso da 5-flucitosina, que impede a excisão do intron, e a formação do rDNA maduro (Król, J, 2019). Neste trabalho, o genótipo A (450pb), sem intron, foi o mais frequente entre as amostras analisadas, com 100% de incidência, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, ao passo que medicamentos indicados para o tratamento de candidíases que atuam no splicing do intron, não são efetivos contra esse genótipo.

No presente plano de trabalho, os isolados cedidos pelo Hospital Onofre Lopes para extração de DNA e identificação molecular foram coletados de diferentes sítios (TABELA 1): urina, líquido peritoneal, sangue, swab de lesão do couro cabeludo e raspado subungueal de dorso do pé. Após a análise dessas amostras por PCR da região 25S do rDNA, para avaliação da presença do intron do grupo I, observou-se que o genótipo A (450pb), com 100% de incidência, é o mais frequentes em todos os sítios de coleta, assim como descrito por Zida, et al (2018), enquanto o genótipo C (450 e 840 pb) e o genótipo B (840pb) não foram detectados.

Isolados que não possuem o intron autocatalítico (genótipo A) são mais invasivos e propensos a invadirem a corrente sanguínea (Karahana, 2004), assim como observado neste trabalho, pelas amostras Vigi-06, Vigi-36, Vigi-38, VigiVigi-41, Vigi-58, Vigi-59, Vigi-60, Vigi-61 Vigi-63 e Vigi64, , isoladas do sangue, e identificadas como genótipo A (450pb).

A diferenciação do complexo psilosis em *C. parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis*, e *Candida metapsilosis* é importante para direcionamento de tratamentos mais eficazes para cada caso, ao passo que essas espécies possuem diferentes perfis de virulência e de resistência a antifúngicos (Tavanti, Arianna et al., 2005). A utilização do intein VMA como marcador molecular para identificação do complexo psilosis é uma alternativa de pesquisa mais barata, e mostrou-se satisfatória, como apontado por Prandini, em 2013, tendo em vista que os resultados obtidos por esse método no atual estudo, demonstraram concordância com os indicados pela técnica de Maldi-Tof.

Dentre o complexo psilosis, a *C. parapsilosis stricto sensu* foi a mais prevalente, seguida por *Candida orthopsilosis*, enquanto a *Candida metapsilosis* não foi identificada. Além disso, a *Candida parapsilosis* foi o microrganismo mais presente em hemoculturas, com aproximadamente 53,8% de prevalência, como já observado por Bruder-Nascimento em 2010.

Conclusão

Métodos alternativos para identificação molecular de espécies e genótipos fúngicos permitem maior previsibilidade dos tratamentos gerenciados, ao passo que essas diferenças genéticas impõem distintas respostas dos microrganismos frente a antifúngicos e infecções. Para *Candida albicans* pode ser feita a amplificação da região 25S do rDNA, que divide essa espécie em três genótipos, pela presença ou ausência de introns autocatalíticos do grupo I. Já para *Candida parapsilosis*, o estudo da região da membrana vacuolar ATPase, de acordo com a disposição do intein, pode caracterizar esse complexo em três espécies. A partir dessas análises, é possível realizar o direcionamento de tratamentos mais específicos, tendo em vista que algumas medicações atuam impedindo o splicing do intron autocatalítico, em *C. albicans*, e que a suscetibilidade das espécies do complexo psilosis a antifúngicos é variada.

No plano de trabalho atual, foi possível observar a maior prevalência do genótipo A de *C. albicans*, e da espécie *C. parapsilosis stricto sensu* do complexo psilosis.

Isolados que obtiveram identificação molecular inconclusiva, VIGI-08, Vigi-12, Vigi-26B, Vigi-57, Vigi-75, Vigi-77, Vigi-78A e Vigi-85 e VigD-4-B, serão submetidos à PCR com os primers ITS4 e ITS5, para amplificação da região variável ITS, e sequenciamento para identificação da espécie fúngica por comparação das sequências nucleotídicas obtidas com as existentes nos bancos de dados científicos.

Referências

5.0- REFERÊNCIAS

Bruder-Nascimento, A., Camargo, C.H., Sugizaki, M.F. et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. BMC Res Notes 3, 1 (2010).

Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. PLoS One, 2016

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016.

Karahan, Z. C. et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses*, v. 47(11-12), p. 465–469, 2004

Król, J et al. “The susceptibility of *Candida albicans* strains to selected anticancer drugs and flucytosine, relevance of the presence of self-splicing intron in 25S rDNA.” *Journal de mycologie medicale* vol. 29,1 (2019)

LAMOTH, F., Lockhart, S. R., Berkow, E. L., & Calandra, T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n.suppl_1, p. i4-i13, 2018.

McCullough, M. J.; Clemons, K. V.; & Stevens, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *Journal of clinical microbiology*, v. 37(2), p. 417–421, 1999

Natalya I. Topilina, Olga Novikova, Matthew Stanger, Nilesh K. Banavali, Marlene Belfort, Post-translational environmental switch of RadA activity by extein–intein interactions in protein splicing, *Nucleic Acids Research*, Volume 43, Issue 13, 27 July 2015

NIELSEN, H.; JOHANSEN, S.D. Group I introns Moving in new directions. *Rna Biology*, v. 6, n. 4, p. 375–383, 2009.

Prandini, Tâmara Heloísa Rocha et al. “Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification.” *Journal of clinical microbiology* vol. 51,9 (2013)

Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2019

Soriano A, Honore PM, Puerta-Alcalde P, et al. Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations. *J Antimicrob Chemother.* 2023

Tantivitayakul, P. et al. Genotyping of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S rDNA analysis shows association with virulence attributes in oral candidiasis. *Archives of oral biology*, v. 97, p. 18–24, 2019.

Tavanti, Arianna et al. “*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III.” *Journal of clinical microbiology* vol. 43,1 (2005)

Tóth, Renáta et al. “*Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside.” *Clinical microbiology reviews* vol. 32,2 e00111-18. 27 Feb. 2019

VANBURIK JAH, Schreckise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* 1998; 36: 299 /303

Zida, Adama et al. “25S rDNA genotype and antifungal susceptibility of clinical *Candida albicans* in Ouagadougou (Burkina Faso).” *Medical mycology* vol. 56,7 (2018).

Anexos

TABELA 1

IMAGEM 1

CÓDIGO: SB0357

AUTOR: JOSÉ LUCAS VICENTE DE ARAÚJO

COAUTOR: RODRIGO JULIANI SIQUEIRA DALMOLIN

COAUTOR: EPITÁCIO DANTAS DE FARIAS FILHO

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 Tireóide; 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 9º 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 benefício 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.

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-PRIOLETT, 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/cnrc.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: SB0358

AUTOR: RYAN CARLOS DE QUEIROZ AQUINO

COAUTOR: VINICIUS EDUARDO DA SILVA

COAUTOR: EVELLYN JHADY NEGRIS DE CARVALHO

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: O uso da IA como ferramenta de prognóstico e gerenciamento do tratamento do câncer cervical usando a expressão de marcadores tumorais do M2TAM. Análise de 691 casos da LIGA contra o Câncer, Natal RN.

Resumo

O câncer cervical (CC) representa um significativo desafio para a saúde pública. Nesse contexto, a Inteligência Artificial (IA) e o Aprendizado de Máquina (ML) surgem como ferramentas com grande potencial para auxiliar no prognóstico e no manejo terapêutico de pacientes oncológicos. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar modelos de ML capazes de prever a sobrevida de pacientes com CC a partir de uma base de dados clínicos e da expressão de marcadores tumorais. Foram analisados dados de 691 pacientes, nos quais se desenvolveram dois modelos preditivos. O primeiro utilizou os classificadores SVM, KNN, Random Forest (RF) e Regressão Logística (RL), alcançando uma acurácia de 90,72%. O segundo substituiu o SVM pelo Gradient Boosting (GB), realizou uma limpeza de variáveis e otimizou os hiperparâmetros, obtendo um desempenho superior com 93,23% de acurácia e maior estabilidade. Ambos os modelos utilizaram estratégias de validação cruzada, balanceamento com o algoritmo SMOTE e uma abordagem de competição one-vs-one para classificar os desfechos. Os resultados mostram um modelo de ML com alta capacidade de generalização, com o modelo 1 obtendo 90,72% na acurácia média e um desvio padrão médio de 5,71%, enquanto o segundo obteve 93,23% com desvio padrão médio de 1,98%, denotando mais estabilidade e precisão nas respostas. Esses resultados superam valores encontrados na literatura e reforçam o potencial da IA como uma ferramenta de apoio à decisão clínica.

Palavras-chave: Aprendizado de Máquina. Neoplasias do Colo do Útero. Prognóstico.

TITLE: The Use of AI as a Prognostic and Treatment Management Tool for Cervical Cancer using M2TAM Tumor Marker Expression. An Analysis of 691 Cases from LIGA contra o Câncer, Natal, RN.

Abstract

Cervical cancer (CC) represents a significant public health challenge. In this context, Artificial Intelligence (AI) and Machine Learning (ML) emerge as tools with great potential to assist in the prognosis and therapeutic management of cancer patients. The present study aimed to develop and validate ML models capable of predicting the survival of patients with

CC from a database of clinical data and tumor marker expression. Data from 691 patients were analyzed, from which two predictive models were developed. The first used the SVM, KNN, Random Forest (RF), and Logistic Regression (LR) classifiers, achieving an accuracy of 90.72%. The second replaced SVM with Gradient Boosting (GB), performed feature selection, and optimized hyperparameters, obtaining a superior performance with 93.23% accuracy and greater stability. Both models utilized cross-validation strategies, balancing with the SMOTE algorithm, and a one-vs-one competition approach to classify outcomes. The results show an ML model with a high generalization capacity, with model 1 obtaining a mean accuracy of 90.72% and a mean standard deviation of 5.71%, while the second obtained 93.23% with a mean standard deviation of 1.98%, denoting more stability and precision in the responses. These results surpass values found in the literature and reinforce the potential of AI as a clinical decision support tool.

Keywords: Machine Learning. Uterine Cervical Neoplasms. Prognosis.

Introdução

O Machine Learning é uma área da tecnologia em que algoritmos de IA são submetidos a um treinamento com uma base de dados e estes aprendem por intermédio da repetição de dados. O objetivo do ML é a criação de um modelo capaz de generalizar informações, sendo assim, dados que não foram analisados anteriormente pelo modelo podem ser analisados e rotulados, com um grau de precisão e confiança (1)

Nesse sentido, na área da saúde o ML tem diversas aplicabilidades dentro da saúde como a previsão de doenças, que consiste na análise de uma quantidade massiva de dados de pacientes por parte do algoritmo que resulta no reconhecimento preciso de padrões possibilitando a previsão de condições antes que estas se desenvolvam. Ademais, outra possibilidade de uso da IA seria no gerenciamento das doenças, pois com um grande volume de dados os recursos de ML podem criar um algoritmo que analisa e identifica padrões na progressão da doença, possibilitando uma otimização no manejo e tratamento destes, melhorando, assim, o acompanhamento desses pacientes.(2)

Outrossim, dentro da oncologia o ML tem apresentado enorme potencial e está sendo utilizado sobretudo para analisar a sobrevida dos pacientes, conseguindo prever até certo ponto a evolução e desfecho da doença. Com isso, as ferramentas de IA caminham para se tornarem importantes ferramentas de apoio da equipe médica, ao possibilitar separar os pacientes em categorias de risco diferentes, conseguem influenciar no manejo clínico e decisões médicas (3,4,5,6,7)

Ademais, a utilização das tecnologias de IA na oncologia são de suma importância, tendo em visto o impacto que essa doença causa na saúde pública brasileira. No Brasil, a estimativa para o triênio 2023-2025 aponta para 704 mil novos casos da doença anualmente, desconsiderando o câncer de pele não melanoma. Nesse sentido, o CC tem um alto impacto na população brasileira, sendo o terceiro mais comum em mulheres, sendo um desafio para o sistema de saúde pública brasileiro. (8,9). Além disso, no tocante ao câncer os macrófagos são células que desempenham papel importante, sobretudo quando relacionamos com os macrófagos associados a tumores (TAMs). Essas células estão estritamente relacionadas a fenômenos de crescimento tumoral, invasão, metástase e resistência a medicamentos e estão relacionadas a marcadores como o CD-163 (10).

Nesse contexto, houve uma parceria entre o Instituto de Tecnologia de Mauá com o Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação (LAICI) para que ocorresse a análise de 691 pacientes de cancro cervical da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer (LIGA), utilizando recursos de IA e ML. Essas ferramentas são treinadas utilizando uma base de dados robusta e que possibilite um aprendizado adequado dos padrões e permita o algoritmo estimar a sobrevida de pacientes. Para tal, diversas estratégias são utilizadas para aprimorar o aprendizado de máquina e obter resultados mais precisos, utilizando os dados clínicos e marcadores imunohistoquímicos. Destarte, o presente projeto estuda se os recursos de ML IA serão capazes de prever a sobrevivência de pacientes com CC em um banco de dados, usando dados da expressão imuno histoquímica dos anticorpos anti-CD163 e anti-CD204 correlacionando com o tratamento instituído para os pacientes com esse tipo de câncer.

Metodologia

O estudo foi desenvolvido a partir de uma parceria entre o Instituto de Tecnologia de Mauá, o LAICI e a LIGA, com a intermediação do professor orientador Raimundo Fernandes de Araújo Junior. A partir dessa colaboração, a equipe do projeto recebeu orientação sobre como manipular os dados dos 691 pacientes disponíveis.

Inicialmente, foram selecionados 1390 pacientes com CC, dos quais 644 foram excluídos devido à falta de dados. As 746 pacientes restantes foram incluídas para análise histopatológica, sendo 55 excluídas por possuírem lesões benignas, o que resultou em 691 pacientes para o estudo(Figura.1). Os dados foram agregados em uma planilha do Excel, incluindo informações separadas nas seguintes categorias: Identificação e Dados Demográficos; Dados Clínicos e Histórico de Saúde; Histórico Ginecológico e Obstétrico; Diagnóstico e Estadiamento; Exames Laboratoriais e de Imagem; Dados Cirúrgicos e Anatomopatológicos; Tratamento; Marcadores Imunohistoquímicos; Seguimento e Desfecho. Essas pacientes foram, ainda, separadas em quatro categorias de desfecho: Vivos com recidiva (n=45); Vivos sem recidiva (n=369); Óbito com recidiva (n=148) e Óbitos sem recidiva (n=92).

Para a criação do primeiro modelo de ML, os dados foram submetidos a quatro classificadores renomados na literatura: Máquinas de Vetores de Suporte (SVM), K-Nearest Neighbors (KNN), Random Forest (RF) e Regressão Logística (RL).

Após a seleção dos classificadores, foi aplicada a estratégia de validação cruzada k-folds, na qual 80% dos dados foram utilizados para treinamento e 20% para teste do modelo. Ressalta-se que, para aumentar a confiabilidade e diminuir vieses, os dados foram embaralhados antes das etapas de treinamento. Adicionalmente, para aumentar a robustez dos resultados, foi utilizado o algoritmo SMOTE, que tem a finalidade de criar dados sintéticos para equilibrar as categorias e evitar que o modelo se tornasse viciado em decorrência da superioridade numérica do grupo "vivos sem recidiva".

Por fim, a última etapa empregada foi a utilização da estratégia one-vs-one (OVO) dos classificadores. Nessa abordagem, os classificadores são colocados em disputa. Como foram utilizados quatro classificadores (SVM, KNN, RF e RL), obteve-se um total de seis disputas: SVM x KNN; SVM x RF; SVM x RL; KNN x RF; KNN x RL; RF x RL. Para cada paciente, os classificadores eram postos em "batalha" e uma categoria era declarada vencedora. Ao

final de todas as disputas, a categoria mais frequente era atribuída àquele paciente pelo algoritmo.

Para a formação do segundo modelo, foi realizada uma limpeza nos dados, com a remoção de categorias excedentes, para permitir que o modelo operasse de forma mais fluida e com melhores resultados. Para tal, os dados foram submetidos aos algoritmos de RF e Gradient Boosting (GB), os quais, individualmente, criaram uma sequência de classificação de importância das variáveis. Após essa etapa, as duas listas geradas foram comparadas, e as colunas que convergiram em ambas como de menor impacto foram retiradas para que o modelo pudesse funcionar com maior precisão.

Nesse sentido, para compor os classificadores, o SVM foi substituído pelo GB, devido aos dados não apresentarem uma característica de linearidade, o que tornava o primeiro modelo menos adequado. Os demais classificadores permaneceram. Diferentemente do primeiro modelo, no segundo foi adotada uma estratégia de otimização individual dos classificadores por meio da sintonia de hiperparâmetros, as configurações que definem o funcionamento de cada classificador. Assim, os modelos foram submetidos a testes para definir suas melhores especificações, obtendo-se o melhor modelo individual de RF, GB, KNN e RL.

Ademais, o desenvolvimento do segundo modelo foi semelhante ao primeiro, seguindo o mesmo fluxo lógico com o uso da estratégia de validação cruzada, do algoritmo SMOTE e da disputa de classificadores mediante a estratégia OVO.

Por fim, para analisar os resultados de ambos os modelos (1 e 2), foi utilizada a matriz de confusão. As previsões são dispostas em uma matriz 4x4 para mensurar a capacidade de acerto do algoritmo. Na horizontal, são apresentadas as previsões do modelo, enquanto na vertical consta a categoria real da paciente. Desse modo, o ideal é que as previsões se concentrem na diagonal principal, indicando acertos, enquanto os valores fora da diagonal representam os erros (confusões) da IA.

Resultados e Discussões

O primeiro modelo, que utilizou os classificadores SVM, KNN, RF e RL em uma abordagem OVO, atingiu uma acurácia média de 90,72% com um desvio padrão médio de 5,71%. A matriz de confusão gerada pelo teste do modelo está apresentada na (Figura 2.) A análise da matriz indica a capacidade de predição do modelo para cada uma das quatro classes. Por exemplo, para a classe 1 (Vivos sem recidiva), o modelo classificou corretamente 367 pacientes e incorretamente 2 pacientes, que foram atribuídos à classe 2 (Óbitos sem recidiva). A classe 3 (vivos com recidiva) teve 100% de acerto nas previsões (45 de 45), enquanto a classe 4 (Óbitos com recidiva) teve 147 acertos e 1 erro de classificação.

Ademais, o segundo modelo em que o modelo SVM foi substituído pelo GB e no qual houve a exclusão de 19 colunas, além da otimização dos hiperparâmetros obteve resultados significativamente melhores, com acurácia média de 93,23% e um desvio padrão médio de 1,98%. A matriz de confusão (Figura 3.) demonstra uma alta quantidade de acertos na diagonal e o melhor resultado no desvio padrão indica maior estabilidade do algoritmo.

Nesse estudo dois modelos de ML foram desenvolvidos com o intuito de realizar previsões quanto ao prognóstico de pacientes com CC. Os resultados foram promissores, condizentes e até superiores ao encontrado na literatura.

Para a construção de resultados tão sólidos, as estratégias utilizadas foram de suma importância. Sendo assim, cabe citar que a limpeza de dados executada nas etapas pré-teste foram fundamentais para garantir que o algoritmo pudesse desempenhar da melhor forma possível. Além disso, o uso do algoritmo SMOTE foi fulcral para garantir a qualidade do modelo de ML, isso em decorrência do desequilíbrio inicial entre as classes, em que a categoria “vivo sem recidiva” correspondia a cerca de 50%, dessa forma o algoritmo poderia ficar viciado e dar respostas menos precisas, no entanto com a criação de dados sintéticos essa situação é amenizada.

Além disso, a utilização da validação cruzada e a abordagem OVO, foram essenciais para garantir confiabilidade nos resultados. Quando se trata de ML é fundamental que uma parcela dos dados seja utilizada como teste, sendo assim o uso de 80% para treino e 20% para teste com embaralhamento garante que os dados sejam aleatórios e evita ordens que viciem o algoritmo, sendo assim permite maior confiabilidade nos resultados. Ademais, o uso da estratégia OVO permite uma melhoria nos resultados, pois abre mão de confiar em apenas um classificador e atribui a classificação vencedora aquela que mais se repetir por meio de um sistema de votação, sendo assim dilui os pontos fracos de um classificador isolado e potencializa a inteligência coletiva do conjunto.

Ao analisar os resultados, notamos uma notória superioridade do segundo modelo, o qual obteve acurácia média de 93,23% e um desvio padrão médio de 1,98%, significativamente superiores aos 90,72% de acurácia média com um desvio padrão médio de 5,71%. Esses números explicitam que o modelo 2 além de ser mais preciso nas suas previsões, também é mais estável, conseguindo manter resultados mais próximos entre os diferentes testes. Essa melhoria ocorreu sobretudo devido inicialmente a redução de variáveis redundantes e de baixo impacto, com a utilização dos classificadores GB e RF, permitindo que o algoritmo tivesse mais fluidez ao ler e interpretar os dados, melhorando a acurácia. Outrossim, a substituição do SMV pelo GB foi relevante, pois permitiu melhoria na análise dos dados, sobretudo pelo caráter não linear dos mesmos, o que é uma limitação do modelo SMV, isso se dá pois analisar desfechos clínicos não é algo claro e preciso, são muitas variáveis que interagem entre elas, de forma complexa e com diversas exceções, o que prejudica modelos lineares como o SVM. Outro ponto fundamental foi a seleção dos melhores hiperparâmetros, foi uma etapa essencial e que não foi realizada no primeiro modelo, o que resultou em maior confiabilidade nas decisões e com menor variabilidade.

A análise das matrizes de confusão (Figura 2 e 3) revela os pontos fortes e as dificuldades dos modelos. Ambos os algoritmos demonstraram ótima capacidade de generalização, com poucos erros, os quais de um modo geral se concentraram nas categorias “vivos sem recidiva” e “Óbito com recidiva”, sendo assim, alguma característica similar entre elas segue gerando confusões no modelo, no entanto sem comprometer os resultados de modo global. Ainda no tocante às matrizes, vale ressaltar que a primeira está maquiada, contando também com os dados de teste, algo que não aconteceu na segunda matriz, em que nitidamente está presente apenas os dados treino, trazendo ainda mais fidelidade aos resultados.

Por fim, ao compararmos com a literatura, o que obtemos é que os modelos de ML preditivos obtiveram resultados de acurácia que variaram de 0,61-0,92. Destarte, ambos modelos desenvolvidos obtiveram resultados muito satisfatórios com destaque para o modelo 2 que

ficou acima da faixa de 92%. A literatura reforça a importância da validação cruzada (k-folds) para mitigar vieses em bases de dados limitadas e a relevância de um tratamento rigoroso dos dados, etapas que foram seguidas na construção de ambos os algoritmos e que se traduziram nos ótimos resultados de acurácia. Além disso, os algoritmos RF, GB e RL estão entre os mais usados nos mais diversos modelos, sendo assim fica claro que a escolha dos classificadores foi coerente e a troca do SVM pelo GB está respaldada. Logo, fica evidente que a construção do modelo se deu de forma coerente e robusta. (11)

Conclusão

Em suma, esse projeto demonstrou a viabilidade da construção de um modelo de ML preciso e com capacidade de prever o prognóstico de pacientes com CC. Nesse contexto, foi possível criar um modelo com alta capacidade de generalização e acurácia, com resultados melhores do que alguns presentes na literatura. Esse resultado só foi alcançado devido à metodologia rigorosa envolvendo a limpeza e preparação de dados, a seleção estratégica de classificadores e validação e otimização. Isso foi possível devido a parceria construída entre o LAICI e o Instituto de Tecnologia de Mauá, aliando conhecimento técnico na frente da área de dados e na área médica, potencializando a construção do modelo final.

No entanto, mais pesquisas são necessárias no campo da IA e do ML, sendo assim, será fulcral desenvolver os algoritmos de modo que se encontre um modelo que consiga obter resultados precisos com menos informações. Esses modelos terão extrema utilidade no prognóstico e direcionamento terapêutico logo nas etapas iniciais do tratamento. Nesse sentido, essa área ainda carece de pesquisas, para que seja possível desenvolver ainda mais as melhores estratégias que permitam otimizar os resultados e avançar nessa área da medicina. Além disso, outro ponto fundamental é investir recursos na elaboração de um sistema que consiga automatizar a leitura dos dados dos pacientes novos. Esse feito permitiria praticidade e facilitaria sua utilização na rotina médica como ferramenta prognóstica. Ademais, ainda cabe citar que há necessidade de se pesquisar mais no uso desses recursos além do prognóstico e buscar formas de que os algoritmos de ML permitam a formulação de uma medicina personalizada, com tratamentos individualizados.

Por fim, fica evidente que o projeto tem alto impacto e relevância na área médica. Os resultados iniciais positivos são importantes para o surgimento de novas pesquisas em busca de mais inovação na área. Desse modo, a saúde pública brasileira é impactada, à medida que doenças como o CC são alcançadas pelos algoritmos de IA, permitindo uma medicina individualizada e melhoria no prognóstico e direcionamento terapêutico.

Referências

1. PAIXÃO, G. M. DE M. et al. Machine Learning na Medicina: Revisão e Aplicabilidade. Arquivos brasileiros de cardiologia, v. 118, n. 1, p. 95–102, 2022.
2. TING SIM, JZ et al. Aprendizado de máquina na medicina: o que os médicos devem saber. Revista médica de Singapura, v. 64, n. 2, p. 91–97, 2023.

3. PIEDIMONTE, S. et al. Prevendo a resposta ao tratamento e a sobrevivência no câncer de ovário avançado usando aprendizado de máquina e radiômica: uma revisão sistemática. *Cancers* , v. 17, n. 3, 2025.
4. KOUROU, K. et al. Aplicações de aprendizado de máquina no prognóstico e predição do câncer. *Revista de biotecnologia computacional e estrutural* , v. 13, p. 8–17, 2015.
5. HUANG, S. et al. Inteligência artificial no diagnóstico e prognóstico do câncer: oportunidades e desafios. *Cancer letters* , v. 471, p. 61–71, 2020.
6. HAMANO, J. et al. Modelos ótimos de aprendizado de máquina para o desenvolvimento de previsões prognósticas em pacientes com câncer avançado. *Cureus* , v. 16, n. 12, p. e76227, 2024.
7. LI, Y. et al. Aprendizado de máquina para diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer de pulmão. *Genômica, proteômica e bioinformática* , v. 20, n. 5, p. 850–866, 2022.
8. FERRARI, YAC et al. Tendência secular da mortalidade por câncer de colo do útero no Brasil e regiões. *Ciência & saúde coletiva* , v. 3, pág. e09962023, 2025.
9. PRIMO, W. Q. S. P. National cancer institute and the 2023 -2025 estimate - cancer incidence in Brazil. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*, v. 45, n. 1, p. 1–2, 2023.
10. NGAMBENJAWONG, C.; GUSTAFSON, H. H.; PUN, S. H. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, v. 114, p. 206–221, 2017.
11. RAHIMI, M. et al. Cervical cancer survival prediction by machine learning algorithms: a systematic review. *BMC cancer*, v. 23, n. 1, p. 341, 2023.

Anexos

Figura 1. Fluxograma representando o processo de seleção das pacientes incluídas no estudo

Figura 2. Matriz de confusão do primeiro modelo

Figura 3. Matriz de confusão do segundo modelo

CÓDIGO: SB0361

AUTOR: JOAO PAULO DE ARAUJO ELIAS

ORIENTADOR: ADRIANO CALIMAN FERREIRA DA SILVA

TÍTULO: As características físicas são melhores preditores do que os compostos secundários para a decomposição da serrapilheira em uma vegetação semidecídua tropical.

Resumo

A serrapilheira, a camada de matéria orgânica no chão da floresta, é vital para a regulação de nutrientes e energia em florestas tropicais. Estudos em florestas tropicais úmidas identificaram compostos secundários, como fenólicos e taninos, como os principais motores de sua decomposição. Para testar se essa importância se aplica também à Restinga, um ambiente de floresta tropical com alta incidência solar, foi realizada uma pesquisa. O estudo avaliou a decomposição da serrapilheira de 26 espécies ao longo de dois anos, analisando 14 características, incluindo fenólicos e taninos. Os resultados revelaram uma grande variação tanto nas características das espécies quanto em suas taxas de decomposição. Contrariando estudos de florestas tropicais úmidas, os compostos fenólicos e taninos tiveram pouca ou nenhuma importância na decomposição da serrapilheira na Restinga. Os melhores preditores individuais foram a área foliar específica e a capacidade de retenção de água. Quando combinados com elementos como carbono, fósforo, cálcio, magnésio e sódio, essas características se mostraram os melhores indicadores da decomposição na Restinga. No entanto, o baixo poder preditivo desse modelo sugere que outros fatores bióticos e abióticos também desempenham um papel crucial. E a pesquisa conclui que a importância dos compostos fenólicos e taninos é dependente do contexto.

Palavras-chave: ciclagem de nutrientes. floresta tropical. decomposição

TITLE: Physical traits are better drivers than secondary compounds for litter decomposition in a tropical heath vegetation.

Abstract

Litter, the layer of organic matter on the forest floor, is vital for the regulation of nutrients and energy in tropical forests. Studies in humid tropical forests have identified secondary compounds, such as phenolics and tannins, as the main drivers of its decomposition. To test if this importance also applies to the Restinga, a tropical forest environment with high sun exposure, a study was conducted. The study evaluated the decomposition of litter from 26 species over two years, analyzing 14 characteristics, including phenolics and tannins. The results revealed a great variation in both the characteristics of the species and their decomposition rates. Contrary to studies in humid tropical forests, phenolic compounds and tannins had little to no importance in litter decomposition in the Restinga. The best individual predictors were specific leaf area and water retention capacity. When combined with elements such as carbon, phosphorus, calcium, magnesium, and sodium, these characteristics proved to be the best indicators of decomposition in the Restinga. However, the low

predictive power of this model suggests that other biotic and abiotic factors also play a crucial role. The research concludes that the importance of phenolic and tannin compounds is context-dependent.

Keywords: nutrient cycling. tropical forest. decomposition.

Introdução

A decomposição é um processo fundamental em ecossistemas terrestres, ligando a matéria orgânica aos fluxos de carbono e nutrientes. Ela é controlada por uma combinação de fatores abióticos (como o clima) e bióticos (como a qualidade da serrapilheira e a diversidade de decompositores). A importância desses fatores varia conforme o contexto. A qualidade da serrapilheira, determinada por atributos físicos e químicos, é um fator-chave na decomposição em escalas locais e globais. As características químicas influenciam diretamente a decomposição. Concentrações elevadas de nutrientes como N, P, Ca e Na tendem a acelerar o processo, enquanto altas concentrações de compostos estruturais (lignina), compostos secundários (taninos, fenólicos) e altas razões estequiométricas (C:N, C:P) o inibem. Em florestas tropicais, os compostos secundários são particularmente importantes, atuando como uma defesa contra herbivoria e radiação UV. As características físicas são atributos morfológicos que agem de forma direta e indireta. A capacidade de retenção de água, por exemplo, aumenta a decomposição em ambientes com limitação hídrica, como ecossistemas secos. Já a área foliar específica, associada ao espectro econômico da folha, também influencia o processo: folhas com alta área foliar específica geralmente têm mais nutrientes e maior superfície, enquanto aquelas com baixa área foliar específica tendem a ter mais lignina e compostos de defesa. O poder preditivo de uma característica da serrapilheira está intimamente ligado às condições ambientais locais. Em ambientes úmidos, onde a atividade microbiana é o principal motor, as características químicas são mais importantes. Em ambientes secos, onde fatores abióticos limitam o processo, as características físicas tendem a ser mais relevantes. A relevância relativa de ambos os tipos de características em ambientes méxicos, onde fatores bióticos e abióticos coexistem, é crucial. As florestas tropicais, incluindo a Mata Atlântica e a Restinga, uma vegetação de charneca em solos arenosos com baixa disponibilidade de nutrientes e água, são ideais para estudar a importância relativa de características químicas e físicas na decomposição. Neste estudo, foi conduzido um experimento que busca examinar as correlações entre 14 características da serrapilheira de 26 espécies de plantas e sua capacidade de prever a decomposição na Restinga. Foi hipotetizado que as características físicas, como a área foliar específica e a capacidade de retenção de água, juntamente com os compostos fenólicos, seriam preditores importantes devido às condições ambientais da Restinga, marcadas pela limitação de água e nutrientes, chuvas sazonais e alta incidência solar.

Metodologia

A área de estudo, parte de um projeto de longo prazo no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, no Rio Grande do Norte, Brasil, é uma Restinga com vegetação predominantemente arbóreo-arbustiva. O clima é tropical, com temperatura média de 26 °C e uma estação seca. A precipitação média anual de 1.460 mm concentra-se entre março e agosto. Os solos são arenosos, altamente drenados e pobres em nutrientes. Para coletar a serrapilheira, foram utilizadas armadilhas previamente instaladas em três áreas, abrangendo a heterogeneidade local da vegetação. O material foi coletado no pico de entrada de serrapilheira, seco em estufa

e as folhas foram separadas por espécie. A serrapilheira foliar das 26 espécies que mais contribuem para o total anual foi selecionada para um experimento de decomposição de dois anos. O experimento utilizou litterbags (sacos de 0,04 m² com malha de 5 mm) contendo 3 g de serrapilheira foliar. Foram usadas seis réplicas por espécie para cada ano, totalizando 312 sacos. Os sacos foram colocados na estação seca, em outubro de 2017 e 2019, e removidos aproximadamente um ano depois. No laboratório, a serrapilheira remanescente foi limpa, seca e pesada para determinar a massa remanescente da serrapilheira (LMR), expressa em porcentagem. Quarenta sacos danificados foram excluídos das análises. Um conjunto de 14 características químicas e físicas da serrapilheira foi medido para prever a decomposição. As características químicas incluíram a concentração de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), sódio (Na), magnésio (Mg), além das razões estequiométricas C:N, C:P e C:K. Também foram medidos compostos fenólicos e taninos. As características físicas foram a capacidade de retenção de água (WHC) e a área foliar específica (SLA). Para a análise química, as amostras foram trituradas. C, N, P, K, Ca, Mg e Na foram determinados por métodos padrões de análise de solo e material vegetal. Os taninos e compostos fenólicos foram determinados por difusão radial e ensaio de Folín, respectivamente. A SLA foi calculada como a área unilateral da folha dividida por sua massa seca. A WHC foi quantificada como a porcentagem de água que a serrapilheira consegue reter. As análises estatísticas foram realizadas para investigar a relação entre as características da serrapilheira e a decomposição. Primeiro, foi avaliada a multicolinearidade entre as características, e aquelas com um fator de inflação da variância (VIF) acima de cinco foram excluídas. Em seguida, foram utilizados modelos mistos lineares para testar os efeitos das características na decomposição, com a localização da parcela e o ano como fatores aleatórios. O Critério de Informação de Akaike (AICc) foi usado para selecionar o melhor modelo, e o R² marginal para avaliar o poder explicativo. Características como SLA, WHC, N, K, Ca, C:K, C e Mg foram transformadas para atender aos pressupostos de linearidade. Um nível de significância de $p < 0,05$ foi adotado para todas as análises.

Resultados e Discussões

Encontramos uma considerável variabilidade na massa remanescente de serrapilheira (LMR) entre as espécies, com uma média de 67,06%, variando de 30,45% (*S. brasiliensis*) a 87,38% (*H. ciliata*). As características da serrapilheira também variaram entre as espécies, com a área foliar específica (SLA) apresentando a maior variabilidade (141,53%) e o carbono (C) apresentando a menor (16,33%). A capacidade de retenção de água (WHC) apresentou uma variação de 38,24% entre as espécies. Os compostos fenólicos e taninos apresentaram variações de 45,18% e 51,42%, respectivamente, três vezes superiores à variação do carbono total (C). Os micronutrientes estavam entre os traços com maior variação entre as espécies, com o sódio (Na) variando 112,88%, seguido pelo magnésio (Mg) (110,01%), potássio (K) (71,71%) e cálcio (Ca) (49,85%). Os traços comumente medidos, nitrogênio (N) (39,71%) e fósforo (P) (32,02%), apresentaram variação semelhante às razões estequiométricas, C:N (33,74%) e C:P (29,75%). Por fim, a razão C:K variou 66,93% entre as espécies. Observamos que algumas características da serrapilheira apresentaram forte correlação, notadamente N, P, K e as razões C:N, C:P e C:K. Espécies com valores elevados de N, P e K tenderam a apresentar razões C:nutriente mais baixas. Em relação aos compostos de carbono, apenas os compostos fenólicos apresentaram correlações significativas. Espécies com altos valores de compostos fenólicos apresentaram valores baixos de N e K e, conseqüentemente, razões C:N e C:K mais altas. Quanto às características físicas, espécies com altos valores de SLA apresentaram altos valores de WHC e valores baixos de compostos fenólicos e Mg.

Descobrimos que várias características da serrapilheira tiveram efeitos individuais significativos na taxa de decomposição da serrapilheira, expressa como massa remanescente de serrapilheira (LMR). Especificamente, SLA e WHC aumentaram a taxa de decomposição (ou seja, valores mais baixos de LMR). Individualmente, SLA e WHC foram os melhores preditores da decomposição da serrapilheira, explicando 18% e 16% da taxa de decomposição, respectivamente. Além disso, entre os compostos de carbono, apenas os compostos fenólicos afetaram a taxa de decomposição, assim como as razões C:N, C:P e C:K, que reduziram a taxa de decomposição. Por outro lado, os nutrientes N, P, K, Ca e Na aumentaram a taxa de decomposição. O procedimento de seleção de modelos identificou SLA, WHC, C, P, Mg, Na e Ca como os melhores preditores da taxa de decomposição, explicando juntos 31% da variação interespecífica total. Além disso, a contribuição dos efeitos aleatórios, que contabilizaram a variação na taxa de decomposição entre parcelas e anos, explicou 21%. O papel fundamental dos ambientes tropicais na dinâmica global do carbono levou a um aumento do interesse em compreender a dinâmica da decomposição da serrapilheira em florestas tropicais. No entanto, a maioria desses estudos foi realizada em florestas tropicais úmidas, e devido à heterogeneidade da vegetação em ambientes tropicais, extrapolar os resultados para outros tipos de vegetação tropical pode não refletir com precisão sua dinâmica de serrapilheira. Aqui, investigamos a relação entre as características da serrapilheira e sua capacidade de prever a decomposição da serrapilheira em uma vegetação de charneca tropical. As características físicas, capacidade de retenção de água (WHC) e área foliar específica (SLA), foram os melhores preditores individuais para a decomposição da serrapilheira, sendo positivamente associados à decomposição. Essa descoberta é consistente com a literatura anterior, que sugere que espécies com valores mais altos de WHC são mais lábeis e propensas a maior perda de massa. A capacidade de retenção de água, que representa a capacidade de reter moléculas de água e fornecer a umidade necessária para os decompositores, é provavelmente um fator limitante significativo para a decomposição da serrapilheira em nossa área de estudo devido às condições adversas da Restinga, como altas temperaturas e longos períodos de escassez de água. Estudos anteriores demonstraram que o WHC pode afetar a decomposição de duas maneiras: retendo umidade à noite para apoiar a decomposição durante períodos mais secos do dia ou promovendo uma decomposição microbiana mais intensa à noite em espécies com alto WHC. Assim, a serrapilheira com altos valores de WHC pode ajudar a aliviar o estresse térmico e hídrico, criando um micro-habitat que suporta uma comunidade de decompositores ativa. A falta de correlação entre WHC e características químicas sugere que o WHC pode estar mais relacionado a compostos solúveis, desempenhando um papel único na determinação da decomposição da serrapilheira. Além disso, a SLA desempenhou um papel crucial na previsão da decomposição da serrapilheira, como uma característica "integrativa" que engloba atributos importantes relacionados tanto às características químicas quanto físicas. Espécies com alta SLA geralmente têm baixas concentrações de lignina e outros compostos estruturais hidrofóbicos e alto teor de nutrientes, o que aumenta as taxas de decomposição. A ausência de correlação entre SLA e N ou P pode resultar de uma alta reabsorção de nutrientes durante o processo de senescência devido às condições pobres do solo. Observamos correlações entre SLA e compostos fenólicos, Mg e WHC, corroborando descobertas anteriores sobre a relação entre SLA e decomposição da serrapilheira. Além disso, essas correlações podem sugerir o duplo papel da SLA na decomposição da serrapilheira. A correlação entre SLA com WHC e Mg pode indicar o potencial da SLA para promover a decomposição biótica, enquanto a correlação entre SLA e compostos fenólicos pode indicar o potencial da SLA para promover a decomposição abiótica via fotodegradação, já que os compostos fenólicos podem ser uma resposta à alta exposição solar. No entanto, a decomposição mediada por microrganismos

ainda pode ser o principal efeito da SLA na decomposição da serrapilheira, já que as parcelas tinham uma cobertura de dossel superior a 90%. As florestas de Restinga são conhecidas por terem solos arenosos pobres em nutrientes que limitam a disponibilidade de nutrientes, e nesses ambientes, a serrapilheira fornece uma importante fonte de nutrientes para os decompositores. Embora tanto o N quanto o P sejam conhecidos por limitar a decomposição da serrapilheira na Restinga, apenas o P foi identificado como um preditor significativo da decomposição da serrapilheira. O papel principal do P na limitação da decomposição da serrapilheira na Restinga pode estar ligado aos solos ácidos, que reduzem a disponibilidade de P. Além do P, os micronutrientes Mg, Ca e Na foram bons preditores da decomposição da serrapilheira. Esses micronutrientes desempenham um papel fundamental nas atividades dos decompositores em escalas globais. Especificamente, o Ca aumenta a atividade de fungos de podridão branca e minhocas, acelerando a decomposição, e o Mg é necessário para reações enzimáticas e formação de esqueletos. Embora as razões pelas quais o Mg foi significativo apenas no modelo final não estejam claras, isso pode ser devido a interações com outros preditores. O sódio, por outro lado, limita a atividade e abundância de decompositores e é necessário para acessar a energia contida na serrapilheira. O sódio é um nutriente importante para a decomposição, particularmente em ambientes costeiros devido à deposição de aerossóis oceânicos, tornando-o mais comumente disponível para decompositores. Nossas descobertas sugerem que os macros decompositores desempenham um papel importante na decomposição da serrapilheira na Restinga e que considerar nutrientes adicionais além de C, N e P é essencial para compreender melhor a decomposição da serrapilheira. A seleção e o uso das características principais são cruciais para compreender os processos ecossistêmicos. No entanto, um desafio é que a relação entre características e funções ecossistêmicas é frequentemente dependente do contexto. Neste estudo, utilizamos características consideradas relevantes para a decomposição, e nossas descobertas sugerem que SLA, WHC, C, P, Mg, Na e Ca são os melhores preditores da decomposição da serrapilheira na Restinga. Esses resultados sugerem os papéis potenciais dos fatores abióticos e da limitação de nutrientes na decomposição da serrapilheira neste ambiente. No entanto, é importante notar que o melhor modelo explicou 31% da variação na decomposição da serrapilheira, indicando que outros fatores, incluindo características da serrapilheira não medidas e fatores abióticos, podem ser cruciais para compreender plenamente a decomposição na Restinga. De fato, a variação aleatória no modelo explicou 21%, indicando que a heterogeneidade ambiental pode ser relevante para mediar a decomposição da serrapilheira. O papel das características físicas na previsão da decomposição da serrapilheira pode ser imposto pela importância das condições abióticas na determinação da dinâmica da serrapilheira. Alguns estudos destacaram a importância das características associadas ao carbono em ecossistemas tropicais, indicando uma decomposição limitada por energia, com traços de carbono explicando entre 58% e 78% da decomposição. Esse fenômeno foi observado em florestas tropicais úmidas, onde um síndrome de qualidade, caracterizado por escassez de energia (baixo carbono lábil) e inibição (alta concentração de polifenóis) para decompositores, foi identificado. Nosso local de estudo apresenta condições semelhantes, por diferentes aspectos, que também podem levar a uma limitação de energia. Primeiro, o solo jovem e pobre em nutrientes na Restinga pode limitar a disponibilidade de nutrientes, e os solos arenosos com alta taxa de lixiviação podem causar uma perda mais rápida de carbono lábil, levando a uma taxa de escassez de energia, como observado em florestas tropicais úmidas. As condições adversas na Restinga podem aumentar os compostos secundários, que podem inibir a ação dos decompositores. De fato, as espécies em nosso local de estudo apresentam crescimento mais lento com uma estratégia mais ruderal, com pouco investimento em crescimento (ou seja, característica aquisitiva) e mais investimento em longevidade (ou seja, folhas mais duras cheias de compostos estruturais). O

estresse climático e a alta incidência solar aumentam a produção de polifenóis e taninos, que têm baixa reabsorção durante a senescência, e observamos uma alta concentração de compostos fenólicos nas espécies de serrapilheira. Apesar desses aspectos semelhantes, encontramos apenas um efeito fraco dos compostos fenólicos na decomposição da serrapilheira, e nem os compostos fenólicos nem os taninos foram selecionados nos melhores modelos. Essa diferença nos resultados pode ser devido ao desenho do estudo, utilizamos um experimento de decomposição mais realista, no qual espécies naturais se decompueram em seus ambientes naturais, enquanto estudos anteriores que analisaram o papel dos compostos de carbono usaram uma abordagem de jardim comum. Evidências recentes indicam que a decomposição da serrapilheira em um local comum pode exacerbar o papel da qualidade da serrapilheira na decomposição, e para avaliar uma decomposição realista, é necessário analisar a decomposição natural da serrapilheira em um ambiente natural. Assim, o conjunto de características no melhor modelo pode evidenciar um poder preditivo preciso das características da serrapilheira para a decomposição, mas indica que fatores abióticos e características da serrapilheira não medidas podem desempenhar um papel crucial na decomposição da serrapilheira na Restinga. Embora tenhamos medido vários compostos de carbono, estes estavam principalmente ligados à porção refratária. Semelhante às florestas tropicais úmidas, os traços de carbono podem servir como bons preditores para a decomposição em uma vegetação de charneca tropical. No entanto, os compostos de carbono que medimos em nosso estudo podem não ser capazes de testar a porção lábil de carbono e, portanto, avaliar a hipótese de baixa qualidade de carbono. O carbono é um indicador não específico que se refere a compostos de carbono encontrados em maiores concentrações na serrapilheira, geralmente celulose e hemicelulose. Não podemos determinar com precisão se a importância do carbono no melhor modelo está mais relacionada à porção refratária ou lábil. Assim, estudos futuros devem investigar o papel dos compostos de carbono lábil na decomposição da serrapilheira e sua importância em ecossistemas tropicais.

Conclusão

Identificar as características funcionais que melhor preveem a decomposição da serrapilheira na Restinga contribui para desvendar os mecanismos por trás do ciclo de nutrientes nesse ecossistema. Essas descobertas mostraram que as características físicas, área foliar específica (SLA) e capacidade de retenção de água (WHC), foram os melhores preditores individuais da decomposição da serrapilheira, e quando combinadas com carbono (C), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e sódio (Na), foram os melhores preditores da decomposição da serrapilheira na Restinga. Essas características podem indicar o papel de fatores abióticos e bióticos na determinação da decomposição da serrapilheira. No entanto, o baixo poder explicativo dessas características (apenas 31%) sugere que outros fatores também podem ser importantes no ciclo de nutrientes e carbono na Restinga. Além disso, os resultados mostram que compostos secundários (ou seja, compostos fenólicos e taninos) não são bons preditores da decomposição da serrapilheira nesse local de estudo, em contraste com o que foi observado em florestas tropicais úmidas. Em geral, para prever com precisão a decomposição da serrapilheira na Restinga, parece necessário considerar tanto a qualidade da serrapilheira quanto os fatores abióticos.

Referências

Adair, E.C., Parton, W.J., Del Grosso, S.J., Silver, W.L., Harmon, M.E., Hall, S.A., Burke, I.C., Hart, S.C., 2008. Simple three-pool model accurately describes patterns of long term litter decomposition in diverse climates. *Glob. Chang. Biol.* 14, 2636–2660. <https://doi.org/10.1111/j.13652486.2008.01674.x>

Aerts, R., 1997. Climate, Leaf Litter Chemistry and Leaf Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems: A Triangular Relationship. *Oikos* 79, 439–449. <https://doi.org/10.2307/3546886>

Almagro, M., Martínez-López, J., Maestre, F.T., Rey, A., 2017. The Contribution of Photodegradation to Litter Decomposition in Semiarid Mediterranean Grasslands Depends on its Interaction with Local Humidity Conditions, Litter Quality and Position. *Ecosystems* 20, 527–542. <https://doi.org/10.1007/s10021-016-0036-5>

Bakker, M.A., Carreño-Rocabado, G., Poorter, L., 2011. Leaf economics traits predict litter decomposition of tropical plants and differ among land use types. *Funct. Ecol.* 25, 473–483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01802.x>

Canessa, R., Brink, L., Saldaña, A., Rios, R., Mueller, C., Hättenschwiler, S., Prater, I., Tielbörger, K., Bader, M., 2021. Relative effects of climate and litter traits on decomposition change with time, climate and trait variability. *J. Ecol.* 109, 447–458. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13516>

Coq, S., Souquet, J.-M., Meudec, E., Cheynier, V., Hättenschwiler, S., 2010. Interspecific variation in leaf litter tannins drives decomposition in a tropical rain forest of French Guiana. *Ecology* 91, 2080–2091. <https://doi.org/https://doi.org/10.1890/09-1076.1>

de la Riva, E.G., Prieto, I., Villar, R., 2019. The leaf economic spectrum drives leaf litter decomposition in Mediterranean forests. *Plant Soil* 435, 353–366. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3883-3>

Dirks, I., Navon, Y., KANAS, D., DUMBUR, R., Grünzweig, J., 2010. Atmospheric water vapor as driver of litter decomposition in Mediterranean shrubland and grassland during rainless seasons. *Glob. Chang. Biol.* 16, 2799–2812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02172.x>

Flindt, M., Lillebø, A.I., 2005. Determination of Total Nitrogen and Phosphorus in Leaf Litter. *Methods to Study Litter Decompos. A Pract. Guid.* https://doi.org/10.1007/1-4020-3466-0_8

Freschet, G.T., Aerts, R., Cornelissen, J.H.C., 2012. A plant economics spectrum of litter decomposability. *Funct. Ecol.* 26, 56–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01913.x>

García-Palacios, P., Mckie, B.G., Handa, I.T., Frainer, A., Hättenschwiler, S., 2016. The importance of litter traits and decomposers for litter decomposition: A comparison of aquatic and terrestrial ecosystems within and across biomes. *Funct. Ecol.* 30. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12589>

Graça, M., Bärlocher, F., Gessner, M., 2005. *Methods to Study Litter Decomposition*, Libro. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3466-0>

Hättenschwiler, S., Coq, S., Barantal, S., Handa, I.T., 2011. Leaf traits and decomposition in tropical rainforests: revisiting some commonly held views and towards a new hypothesis. *New Phytol.* 189, 950–965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03483.x>

Hättenschwiler, S., Jørgensen, H.B., 2010. Carbon quality rather than stoichiometry controls litter decomposition in a tropical rain forest. *J. Ecol.* 98, 754–763. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01671.x>

Hättenschwiler, S., Vitousek, P.M., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol. Evol.* 15, 238–243. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01861-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01861-9)

Joly, F.-X., Scherer-Lorenzen, M., Hättenschwiler, S., 2023. Resolving the intricate role of climate in litter decomposition. *Nat. Ecol. Evol.* 7, 214–223. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01948-z>

Kaspari, M., Clay, N.A., Donoso, D.A., Yanoviak, S.P., 2014. Sodium fertilization increases termites and enhances decomposition in an Amazonian forest. *Ecology* 95, 795–800. <https://doi.org/https://doi.org/10.1890/13-1274.1>

Kaspari, M., Garcia, M.N., Harms, K.E., Santana, M., Wright, S.J., Yavitt, J.B., 2008. Multiple nutrients limit litterfall and decomposition in a tropical forest. *Ecol. Lett.* 11, 35–43.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01124.x> Krishna, M.P., Mohan, M., 2017. Litter decomposition in forest ecosystems: a review. *Energy, Ecol. Environ.* 2, 236–249. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0064-9> Liu, G., Wang, L., Jiang, L., Pan, X., Huang, Z.-Y., Dong, M., Cornelissen, J., 2017. Specific leaf area predicts dryland litter decomposition via two mechanisms. *J. Ecol.* 106. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12868> Patoine, G., Thakur, M.P., Friese, J., Nock, C., Hönig, L., Haase, J., Scherer-Lorenzen, M., Eisenhauer, N., 2017. Plant litter functional diversity effects on litter mass loss depend on the macro-detritivore community. *Pedobiologia (Jena)*. 65. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.07.003> Rosenfield, M. V, Keller, J.K., Clausen, C., Cyphers, K., Funk, J.L., 2020. Leaf traits can be used to predict rates of litter decomposition. *Oikos* 129, 1589–1596. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/oik.06470> Santiago, L.S., 2007. EXTENDING THE LEAF ECONOMICS SPECTRUM TO DECOMPOSITION: EVIDENCE FROM A TROPICAL FOREST. *Ecology* 88, 1126–1131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1890/06-1841> Santonja, M., Fernandez, C., Gauquelin, T., Baldy, V., 2015. Climate change effects on litter decomposition: intensive drought leads to a strong decrease of litter mixture interactions. *Plant Soil* 393, 69–82. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2471-z> Santonja, M., Fernandez, C., Proffit, M., Gers, C., Gauquelin, T., Reiter, I.M., Cramer, W., Baldy, V., 2017. Plant litter mixture partly mitigates the negative effects of extended drought on soil biota and litter decomposition in a Mediterranean oak forest. *J. Ecol.* 105, 801–815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1365-2745.12711> Talhelm, A., Smith, A., 2018. Litter moisture adsorption is tied to tissue structure, chemistry, and energy concentration. *Ecosphere* 9. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2198> Tan, H., Barret, M., Mooij, M.J., Rice, O., Morrissey, J.P., Dobson, A., Griffiths, B., O’Gara, F., 2013. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the phoD phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biol. Fertil. Soils* 49, 661–672. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0755-5> Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender660 Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, Ü., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J., Villar, R., 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821–827. <https://doi.org/10.1038/nature02403> Yue, K., García-Palacios, P., Parsons, S., Wanqin, Y., Peng, Y., Tan, B., Huang, C., Wu, F., 2018. Assessing the temporal dynamics of aquatic and terrestrial litter decomposition in an alpine forest. *Funct. Ecol.* 32, 2464–2475. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13143>

Anexos

Figura 1-Relação entre a massa de serrapilheira restante (% da massa inicial) (LMR) e as características da serrapilheira foliar para 26 espécies da restinga. As abreviações indicam a área foliar específica (SLA) e a capacidade de retenção de água (WHC).

CÓDIGO: SB0364

AUTOR: ANA PAULA DE BRITO ARAUJO

ORIENTADOR: RENATA GONCALVES FERREIRA

TÍTULO: Perfil comportamental e hematológico de macacos pregos (*Sapajus spp*) resgatados do tráfico e mantidos no centro de triagem IBAMA RN

Resumo

O macaco-prego-barbudo (*Sapajus libidinosus*) é uma espécie resgatada do tráfico que necessita de avaliações de saúde em Centros de Triagem (CETAS) para sua reintrodução. Este estudo investigou a correlação entre parâmetros hematológicos e fatores como sexo, idade e comportamentos de estresse em 44 indivíduos em cativeiro no CETAS-Natal. Foram analisados dados de hemograma e a frequência de comportamentos como estereotípias e autodirigidos. Os resultados rejeitaram as hipóteses 1 e 3 pois não houve diferença significativa entre sexos na série vermelha, nem correlação entre os marcadores sanguíneos e os comportamentos de estresse. A hipótese 2 foi parcialmente corroborada: apenas a contagem de neutrófilos em banda foi significativamente maior em jovens, o que pode ser atribuído ao sistema imunológico em desenvolvimento. A ausência de correlação com o estresse sugere que o ambiente controlado do CETAS, com alimentação garantida e enriquecimento, pode mitigar os indicadores fisiológicos de estresse, mesmo que os comportamentos persistam.

Palavras-chave: Imunologia; Estereotípias; Fisiologia; Autodirigido; CETAS.

TITLE: Behavioral and Hematological Profile of Capuchin Monkeys (*Sapajus spp.*) Rescued from Wildlife Trafficking and Housed at the IBAMA Wildlife Triage Center in Rio Grande do Norte

Abstract

The bearded capuchin monkey (*Sapajus libidinosus*) is a species rescued from illegal trafficking, which requires health assessments at Wildlife Screening Centers (CETAS) for their reintroduction. This study investigated the correlation between hematological parameters and factors such as sex, age, and stress behaviors in 44 captive individuals at the CETAS in Natal. Data from complete blood counts and the frequency of behaviors like stereotypies and self-directed actions were analyzed. The results rejected hypotheses 1 and 3, as there was no significant difference between sexes in the red blood cell series, nor a correlation between blood markers and stress behaviors. Hypothesis 2 was partially supported: only the band neutrophil count was significantly higher in juveniles, which may be attributed to their developing immune system. The lack of correlation with stress suggests that the controlled environment of the CETAS, with a guaranteed food supply and enrichment, may mitigate physiological stress indicators, even if the behaviors persist.

Keywords: Immunology; Stereotypy; Physiology; Auto-directed; CETAS.

Introdução

O macaco-prego-barbudo (*Sapajus libidinosus*) é uma espécie de primata neotropical presente em todas as regiões brasileiras, com exceção do Sul (1). A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) os classifica como Quase Ameaçada (1) e este status de ameaça se deve à caça para o comércio ilegal de animais de estimação (1). Como resultado, muitos são resgatados de cativeiro doméstico, por meio de confiscos ou entregas voluntárias, e frequentemente são encontrados em centros governamentais de resgates de animais silvestres (2). Estes animais podem ser mantidos como cativeiro temporário ou permanentes (zoológicos), mas a prioridade é a reintrodução em áreas naturais de ocorrência da espécie (2). A IUCN recomenda a realização de avaliações comportamentais e de saúde nos primatas pré-soltura (3). Essas avaliações podem ajudar na identificação de problemas como doenças patogênicas ou ferimentos que podem impedir a soltura e/ou sobrevivência dos animais na natureza (4). A idade e a classe sexual dos indivíduos podem influenciar parâmetros hematológicos, assim como fatores locais (geografia, dieta e ambiente), e por isso, a avaliação da saúde animal deve ser comparada com dados da mesma região. Para o nordeste brasileiro são encontrados apenas três estudos que avaliaram a hematologia de *S. libidinosus* (6,9,10). As concentrações de eritrócitos e de hemoglobina, por exemplo, tendem a ser maiores em machos quando comparadas a fêmeas adultas, provavelmente devido à perda de sangue na menstruação e ao efeito do estrogênio, na formação de glóbulos vermelhos, em fêmeas (6,7). Paralelamente, certos parâmetros tendem a diferir entre adultos e jovens, como leucócitos, linfócitos, neutrófilos em banda e eosinófilos sendo maiores em jovens quando comparados a macacos-prego-barbudos adultos (6). Flaiban et al. (2008) encontraram diferenças semelhantes em *Sapajus cay* e *Sapajus nigritus* de vida-livre, com macacos adultos tendo contagens de leucócitos e linfócitos mais baixas do que os jovens (8). As contagens médias de leucócitos tendem a ser maiores em macacos-prego selvagens quando comparadas a outros da mesma espécie em cativeiro devido à maior exposição a patógenos (9). Situações de estresse agudo acarretam mudanças nos parâmetros sanguíneos em animais silvestres, com diminuição nos níveis de linfócitos no sangue periférico e aumento de neutrófilos, monócitos e plaquetas como indicativos de resposta inflamatória, enquanto o aumento de hemácias e hemoglobinas sugere maior oxigenação sanguínea em preparação para resposta de fuga ou luta (9,10). No entanto, ainda não há estudos que avaliem a correlação entre parâmetros hematológicos e comportamentos indicativos de estresse crônico em animais cativos e esse projeto se propõe a iniciar essa investigação. Este estudo propõe novas perspectivas para o conhecimento científico sobre os perfis hematológicos de macacos-prego-barbudos resgatados, investigando a correlação entre os índices fisiológicos e os perfis comportamentais. Com isto, testamos as seguintes hipóteses: 1) as contagens de eritrócitos e as concentrações de hemoglobina são maiores em machos quando comparadas às fêmeas adultas; 2) as contagens de leucócitos, linfócitos, neutrófilos em banda e eosinófilos são maiores em jovens do que em adultos; e 3) os valores de hemoglobina, linfócitos e as taxas NLR (razão neutrófilo/linfócito), MLR (razão monócito/linfócito) e PLR (razão plaqueta/linfócito) são mais elevados em indivíduos que demonstram mais comportamentos indicativos de estresse, sendo estes, comportamentos autodirigidos e de estereotipia. Os resultados desta avaliação poderão auxiliar nas decisões e ações dentro dos Centros de Triagem (IBAMA) e Zoológicos do Nordeste sobre quais animais estão aptos ao programa de reprodução assistida ou de reintrodução.

Metodologia

Foram coletados dados hematológicos, entre março de 2021 a março de 2023, de 44 indivíduos de macacos-prego-barbudo (*Sapajus libidinosus*), sendo estas 22 fêmeas (17 adultas e 5 juvenis) e 22 machos (12 adultos e 10 juvenis). Esses animais são mantidos em estado de cativeiro temporário no Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de Natal (RN) até que estejam reabilitados e aptos à soltura. Os indivíduos avaliados não estiveram em grupos de composição estável durante o período de coleta devido às diferentes idades, habilidades desenvolvidas com relação às reabilitações, níveis de saúde, dentre outros parâmetros de cada animal recebido no centro. As coletas de dados são feitas diariamente no CETAS-Natal, através do método de observação Scan Sample, inseridas em uma planilha geral dos indivíduos acompanhados em cativeiro. Estes mesmos indivíduos foram submetidos a exames de hemograma nos quais foram obtidas taxas de células da série vermelha (hemoglobina e eritrócitos) e da série branca (linfócitos, leucócitos, neutrófilos em banda e eosinófilos) de cada indivíduo. Esses valores foram relacionados às taxas de comportamentos indicativos de estresse (autodirigido e estereotipado) extraídos de uma planilha geral de observações dos indivíduos no CETAS-Natal. A média dos comportamentos autodirigidos e estereotipados foram extraídos da planilha geral, dentro de um intervalo de três meses de observação do animal, em que no primeiro mês constava a data do exame de sangue. Desta forma, é possível avaliar a correlação entre as taxas hematológicas e os padrões dos comportamentos indicativos de estresse. As análises estatísticas foram feitas no *software* gratuito R Studio. Para testar as hipóteses 1 e 2 foram utilizados testes de Shapiro-Wilk para conferir normalidade dos dados, assim como teste de Levene para conferir homogeneidade de variância dos dados. Para confirmar a influência das variáveis testadas, foram utilizados os testes de Wilcoxon, para as amostras de dados considerados não-normais, e o teste-t de Welch para amostras de dados considerados normais. Em todas as análises da hipótese 3, o método estatístico de correlação de Spearman foi utilizado devido à natureza não-normal dos dados, o que confere mais confiabilidade às conclusões obtidas.

Resultados e Discussões

As taxas de eritrócitos nos exames das fêmeas adultas (média = 5,7; desvio padrão = 0,867) e nos machos adultos (média = 5,99; dp = 0,812) não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($t = 0,90784$; dp = 24,795; $p = 0,1864$). Da mesma forma, as taxas de hemoglobina nos exames das fêmeas adultas (média = 13,8; dp = 2,67) e dos machos adultos (média = 14; dp = 3,51) também não apresentaram diferença significativa ($t = 0,22635$; dp = 19,549; $p = 0,4116$), rejeitando então a hipótese 1 levantada inicialmente. As taxas de leucócitos ($t = 1,3021$; dp = 30,922; $p = 0,1012$), linfócitos ($t = 0,95838$; dp = 33,468; $p = 0,1724$) e eosinófilos ($W = 276$; $p = 0,07545$), nos exames dos indivíduos jovens e nos adultos não apresentaram diferenças significativas, rejeitando a hipótese inicial para três das quatro variáveis hematológicas da série branca. Em outro lado, há evidência estatística ($p = 0,047$) para afirmar que a contagem de neutrófilos em banda é maior no grupo de jovens (média = 9094,53; dp = 3549,75) em comparação ao grupo de adultos (média = 7241,45; dp = 3610,04), levando à corroboração parcial da hipótese 2. As taxas de hemoglobina (média = 13,95; dp = 3), de linfócitos (média = 3524; dp = 1877), NLR (média = 3,21; dp = 3), MLR (média = 0,2; dp = 0,19) e PLR (média = 149,45; dp = 153,09), não apresentaram influência significativa nas taxas de comportamentos indicativos de estresse. A hipótese inicial, de que os marcadores fisiológicos seriam maiores em indivíduos com mais comportamentos de estresse, não foi suportada pelos dados. Os comportamentos estereotipados (média = 0,031; dp = 0,073), portanto, não foram relacionados, negativamente ou positivamente, com as taxas de hemoglobina ($S = 13353$; $\rho = 0,059$; $p = 0,3518$),

linfócitos ($S = 16839$; $\rho = -0,186$; $p = 0,8875$), NLR ($S = 13684$; $\rho = 0,036$; $p = 0,4091$), MLR ($S = 17018$; $\rho = -0,199$; $p = 0,9027$) ou PLR ($S = 14053$; $\rho = 0,009$; $p = 0,4751$), não corroborando a hipótese inicial. De maneira similar, os comportamentos autodirigidos (média = 0,088; $dp = 0,072$) não foram relacionados, negativamente ou positivamente, com as taxas de hemoglobina ($S = 11355$; $\rho = 0,199$; $p = 0,0967$), linfócitos ($S = 15289$; $\rho = -0,077$; $p = 0,6914$), NLR ($S = 15252$; $\rho = -0,075$; $p = 0,6854$), MLR ($S = 17074$; $\rho = -0,203$; $p = 0,9071$) ou PLR ($S = 14180$; $\rho = 0,001$; $p = 0,4982$), não corroborando a hipótese inicial. A única taxa significativamente diferente entre os grupos etários comparados consistiu na taxa de neutrófilos em banda, a linha inicial de defesa do sistema imunológico inato contra processos inflamatórios (5, p. 14). Um aumento em sua contagem pode indicar uma sinalização do corpo diante de algum tipo de "alerta" ou como resposta de um sistema imunológico adaptado, menos desenvolvido comparados à adultos. Já a ausência de diferença estatística entre as taxas de comportamentos indicativos de estresse e as taxas hematológicas, em animais na situação de cativeiro, pode estar sendo causada pelo ambiente controlado do CETAS, o que é previsto por estudos que descrevem cativeiros como ambientes de menor exposição à riscos patológicos, comparados aos animais em vida-livre (9). Apesar de estressante pelos espaços limitados, abarcando diariamente grupos de alta densidade, diariamente estes são provisionados e estimulados com enriquecimentos ambientais, podendo diminuir os níveis de estresse comparados aos níveis enfrentados na vida-livre. Portanto é necessário que mais análises sejam feitas investigando a influência dos tipos de reabilitação, nos padrões hematológicos e comportamentais.

Conclusão

Com base neste conjunto de resultados não há evidência estatística para afirmar que exista uma associação entre a frequência dos comportamentos de estresse (autodirigido e estereotípia) e as alterações nos níveis hematológicos, nesta amostra. As variáveis analisadas parecem ser independentes umas das outras, com exceção das maiores taxas de neutrófilos encontrados em indivíduos jovens. A ausência de relação entre indicadores hematológicos e comportamentais indica que sob o ponto de vista clínico os animais estão saudáveis, apesar de requerer intervenções no sentido de melhorar seu bem-estar psicológico.

Referências

1. Martins, A. B.; Fialho, M. S. Jerusalinsky, L.; Valença-Montenegro, M.M., Bezerra, B.M., Laroque, P.O., de Melo, F.R. & Lynch Alfaro, J.W. 2021. *Sapajus libidinosus* (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T136346A192593226. doi:10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T136346A192593226.en
2. 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: de Melo, F. R.; Mourthé, I. M. C. *A Primatologia no Brasil*, vol. 11. Belo Horizonte, MG: Sociedade Brasileira de Primatologia.
3. Baker, L.R. (2002). Guidelines for Nonhuman Primate Re-introductions. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group. 21: 1-32.
4. Moore, R. S.; Wihermanto; Nekaris, K.A.I. (2014). Compassionate conservation, rehabilitation and translocation of Indonesian slow lorises. *Endangered Species Research*. 26: 93-102. doi:10.3354/esr00620
5. Abbas, A. K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de

Janeiro: Elsevier, 2015.

6. Ferreira, V. H. B.; de Paiva Fonseca, E.; das Chagas, A. C. C. S.; Pinheiro, L. G. M.; de Sousa, M. B. C.; da Silva, H. P. A.; Galvão-Coelho, N. L.; Ferreira, R. G. (2020). Personality traits modulate stress responses after enclosure change of captive capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 105111.

doi:10.1016/j.applanim.2020.105111

7. Cardenio, P. A.; Acorda, J. A.; Lastica-Ternura, E. A. (2020). Correlations of serum biochemistry profile with ultrasonic histogram of liver, gallbladder, and kidneys and morphometry of rescued long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of Medical Primatology*. doi:10.1111/jmp.12472

8. Ferreira, A. F.; Queiroga, F. L.; Mota, R. A.; Rêgo, E. W.; Mota, S. M.; Teixeira, M. G.; Colaço, A. (2018). Hematological profile of captive bearded capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*) from Northeastern Brazil. *Ciência Rural*, 48(10). doi:10.1590/0103-8478cr20180065

9. Ribeiro C. L. B.; de Melo-Reis, P. R.; Lemes S. R.; de Araújo, L. A.; de Silva-Júnior, N. J. (2015). Análise hematológica de macacos-prego (*Sapajus libidinosus* Spix, 1923) e bugios (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812) de vida livre no sul do estado de Tocantins, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*. 13(2): 110-114.

10. Sousa, G. A.; Paludo, G. R.; Teixeira, D. S.; Ribeiro, B. M. (2020). Haematological and biochemical parameters of wild capuchin monkeys in Brasília, Federal District - Brazil. *Journal of Medical Primatology*. doi:10.1111/jmp.12468

11. Flaiban, K. K. M. C.; Spohr, K. A. H.; Malanski, L. S.; Svoboda, W. K.; Shiozawa, M. M.; Hilst, C. L. S.; Aguiar, L. M.; Ludwig, G.; Passos, F. C.; Navarro, T. T.; Balarin, M. R. S.; Lisbôa, J. A. N. (2008). Hematologic Values of Free-ranging *Cebus cay* and *Cebus nigrinus* in Southern Brazil. *International Journal of Primatology*, 29(5), 1375–1382.

doi:10.1007/s10764-008-9290-5

CÓDIGO: SB0371

AUTOR: JOAO VICTOR FELIX SANTIAGO

ORIENTADOR: JEFERSON DE SOUZA CAVALCANTE

TÍTULO: Efeitos da ingestão de Ayahuasca no ritmo de atividade/repouso de ratos e saguis

Resumo

O sistema de temporização circadiana (STC) gera e sincroniza ritmos de ~24 h, essenciais para funções fisiológicas e comportamentais. Em mamíferos, inclui o núcleo supraquiasmático (NSQ), o folheto intergeniculado (FIG) em roedores ou núcleo pré-geniculado (NPG) em primatas, além de vias sincronizadoras. O NSQ é o principal marca-passo: sua lesão elimina ritmos, e seu transplante os restaura. O FIG/NPG integra sinais fóticos e não-fóticos, retransmitindo-os ao NSQ pelo trato genículo-hipotalâmico. O envelhecimento compromete a circuitaria do STC, alterando ritmos biológicos e aumentando a vulnerabilidade a doenças, o que torna a manutenção funcional desses circuitos foco da gerontologia. Nesse cenário, a neurociência dos psicodélicos tem se destacado, com a ayahuasca, bebida preparada de Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis. Seus princípios ativos (DMT e β -carbolinas) atuam como agonistas serotoninérgicos, produzindo alterações perceptivas, como mudanças na percepção do tempo. Este projeto investiga os efeitos da ingestão periódica de ayahuasca sobre a atividade locomotora e o ritmo atividade/repouso de ratos jovens e idosos, analisando fase, período e amplitude, além de alterações neuroquímicas e morfológicas no NSQ, FIG/NPG e conexões. Hipotetiza-se que a ayahuasca module a plasticidade neural do STC, integrando cronobiologia, envelhecimento e neurociência psicodélica.

Palavras-chave: Ayahuasca, STC, cronobiologia, Serotonina, neurociência psicodélica.

TITLE: Effects of Ayahuasca Ingestion on the Activity/Rest Rhythm of Rats and marmosets

Abstract

The circadian timing system (CTS) generates and synchronizes ~24 h rhythms, essential for physiological and behavioral functions. In mammals, it includes the suprachiasmatic nucleus (SCN), the intergeniculate leaflet (IGL) in rodents or pregeniculate nucleus (PGN) in primates, and synchronizing pathways. The SCN is the main pacemaker: its lesion abolishes rhythms, and its transplant restores them. The IGL/PGN integrates photic and non-photoc signals, relaying them to the SCN via the geniculohypothalamic tract. Aging compromises CTS circuitry, altering biological rhythms and increasing vulnerability to disease, making the

preservation of these circuits a focus of gerontology. In this context, psychedelic neuroscience has gained attention, especially ayahuasca, a brew prepared from *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. Its active principles (DMT and β -carbolines) act as serotonergic agonists, producing perceptual alterations such as changes in time perception. This project investigates the effects of periodic ayahuasca ingestion on locomotor activity and the activity/rest rhythm of young and aged rats, analyzing phase, period and amplitude, as well as neurochemical and morphological changes in the SCN, IGL/PNG, and their connections. It is hypothesized that ayahuasca modulates neural plasticity within the CTS, integrating chronobiology, aging, and psychedelic neuroscience.

Keywords: Ayahuasca, STC, Serotonin, cronobiology, psychedelic neuroscience.

Introdução

O sistema de temporização circadiana (STC) é responsável pela geração e sincronização dos ritmos circadianos que são oscilações endógenas manifestadas pelos seres vivos para a maioria das funções e comportamentos, com período em torno de 24 horas. Esse sistema, em roedores é composto por estruturas neurais interligadas, o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo, o folheto intergeniculado (FIG) do tálamo, vias sincronizadoras e efetores comportamentais. O NSQ tem sido descrito como o principal marca-passo circadiano em diversas espécies de mamíferos, uma vez que a lesão dessa estrutura deixa o animal arritmico para um conjunto de funções homeostáticas circadianas, e o seu transplante pode restabelecer o ritmo nesses animais lesionados. O FIG parece estar envolvido na integração de informações fóticas e não-fóticas retransmitindo-as ao NSQ, via o TGH. O STC, como um todo, permite que o organismo tenha uma organização temporal interna ordenada, o que propicia a execução adequada dos mecanismos fisiológicos e comportamentais trazendo homeostasia para o organismo. A “neurociência psicodélica” ou “neurociência dos psicodélicos” tem ganhado destaque importante e crescente em diversas áreas que abordam o sistema nervoso. Entre essas substâncias podemos destacar a Ayahuasca, uma bebida alucinógena produzida pela fervura do cipó *Banisteriopsis caapi* com o caule do arbusto *Psychotria viridis*. Essa substância é agonista do sistema serotoninérgico, promovendo alterações nas funções cerebrais. Entre os principais efeitos dessas substâncias se encontra mudanças na percepção de tempo, de cores, de luminosidade, de realidade e de memória.

Metodologia

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas jovens (3 meses) e idosos (16 meses), totalizando 384 animais (192 jovens e 192 idosos), alocados em gaiolas plásticas em racks ventilados, com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro (LD) de 12:12h (luz às 6:30–18:30). O número amostral foi definido por cálculo no software G*Power (erro tipo I = 5%; tipo II = 95%). Os animais foram submetidos a único ensaio e eutanasiados por sobredose anestésica seguida de perfusão transcardíaca, em conformidade com a CEUA-UFRN. Além dos roedores, foram incluídos primatas não humanos (*Callithrix jacchus*), machos e fêmeas, jovens (2–4 anos) e idosos (>6,5 anos), provenientes do Núcleo de Primatologia da UFRN. Foram incluídos apenas animais saudáveis, não pertencentes ao mesmo grupo familiar, avaliados por médico veterinário quanto à saúde geral e funcionalidade visual. Receberam suplementação vitamínica antes e durante os experimentos. Os primatas foram mantidos em salas controladas de temperatura e umidade, em gaiolas de

ferro (74×60×89 cm) com enriquecimento ambiental (poleiros, redes, caixas ninho), em contato acústico e olfativo, mas não visual. A alimentação ocorreu duas vezes ao dia em horários irregulares, além de água, ração específica e frutas secas ad libitum. A atividade locomotora foi registrada por sensores infravermelhos acoplados às gaiolas, conectados a software para análise. A ayahuasca utilizada foi preparada pelo templo da Barquinha (Ji-Paraná, RO), a partir de Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis, fervidos por cerca de 60h. A dosagem adotada foi de 1,67 mL/300g de peso corporal, administrada por gavagem nos dias D1, D12, D23 e D34. O grupo controle recebeu salina em volume equivalente. Para avaliação comportamental, utilizou-se o teste de campo aberto, amplamente empregado na análise de atividade locomotora e comportamento ansioso (Prut & Belzung, 2003). O aparato circular (60×40 cm para ratos; 90×65 cm para primatas), dividido em áreas interna e externa, foi monitorado por câmera conectada ao software Anymaze. Cada animal foi avaliado individualmente por 10 minutos, registrando: (1) distância percorrida, (2) velocidade média e (3) tempo em cada subárea. Os testes ocorreram 10 min antes da administração da ayahuasca (basal) e 2h10 após, por até 2h adicionais. Durante o experimento, os animais foram submetidos a diferentes regimes de iluminação: 12:12h claro/escuro (entre A1–A2 e A3–A4); Escuro constante por 10 dias (entre A2–A3), para avaliação do ritmo endógeno em livre curso; 10:14h claro/escuro (após A4), para análise de ressincronização e atraso de fase. Cada grupo (experimental e controle, machos e fêmeas) foi testado separadamente. A atividade locomotora foi registrada continuamente por sensores infravermelhos e analisada pelos softwares Aschoff e El Temps, avaliando: período, amplitude, mesor, alfa, acrofase, variabilidade intradiária (IV) e percentual de variância (%V). Nas fêmeas, acompanhou-se o ciclo estral por uma semana para controle hormonal. Após os experimentos, parte dos animais foi destinada à análise histológica e imuno-histoquímica dos principais componentes do sistema de temporização circadiana (STC): núcleo supraquiasmático (NSQ) e folheto intergeniculado (FIG). Foram avaliados marcadores neuroquímicos (NPY, VIP, vasopressina, GABA, serotonina e receptores 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2C) e proteínas relacionadas à morfologia celular e plasticidade (CB, PV, CR, GFAP, NeuN, BDNF, S100, IBA1, BMAL, PER). Secções coradas por Nissl permitiram análise citoarquitetônica. Os cérebros foram perfundidos, fixados em paraformaldeído 4%, criopreservados em sacarose 30% e seccionados a 30 µm em criostato. As lâminas foram processadas por imuno-histoquímica utilizando anticorpos primários e secundários específicos, sistema de amplificação avidina-biotina e revelação por DAB. As imagens foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse Ni e analisadas no software ImageJ, com contagens celulares cegas e análises de densitometria óptica (DOR). Para quantificação, foram utilizadas múltiplas secções do NSQ em diferentes níveis (rostral, médio, caudal), normalizadas a áreas controle do mesmo tecido. A análise estatística incluiu o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre grupos e correlações pelo teste de Spearman (r). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Com base na literatura científica disponível, é possível antecipar uma série de resultados decorrentes do estudo sobre os efeitos da ayahuasca, bebida que combina a dimetilriptamina (DMT) e β -carbólinas, sobre o ritmo de atividade e repouso e sobre os parâmetros neuroquímicos e neuromorfológicos do sistema de temporização circadiano em ratos e saguis, jovens e idosos. Espera-se que os animais tratados com a substância apresentem modificações perceptíveis no padrão locomotor, refletindo alterações no ritmo de atividade e repouso, especialmente em parâmetros como amplitude, variabilidade intradiária e sincronização. Tais

alterações devem ser mais evidentes em animais idosos, cuja vulnerabilidade às disfunções do sistema circadiano é maior devido ao processo natural de senescência, podendo se manifestar em forma de maior fragmentação rítmica ou de dificuldade de ressincronização frente a manipulações do ciclo claro-escuro. É também esperado que as diferenças etárias desempenhem um papel determinante nos efeitos observados. Animais jovens, por apresentarem maior plasticidade neural, provavelmente exibirão maior capacidade de adaptação frente à ação da ayahuasca, respondendo com ritmos mais estáveis e reorganizados. Já os idosos podem demonstrar respostas mais heterogêneas: em alguns casos, poderá haver melhora na consolidação rítmica, decorrente da ação serotoninérgica moduladora, mas em outros, pode haver maior perturbação do ritmo em função da já existente degeneração neuronal no sistema de temporização circadiano. Além da variável etária, as diferenças sexuais também se apresentam como fatores de interesse, visto que a serotonina e os hormônios sexuais interagem na modulação dos ritmos e estados afetivos. Assim, é plausível que machos e fêmeas apresentem respostas distintas, tanto no comportamento locomotor quanto no nível neuroquímico, especialmente porque, no caso das fêmeas, o ciclo estral influencia na dinâmica neuroendócrina. No campo da neuroquímica, espera-se observar alterações significativas na densidade e na distribuição de neurotransmissores e neuromoduladores nos núcleos supraquiasmático e geniculado, tais como serotonina, VIP, VP, NPY e GABA. Além disso, devem ocorrer modificações na expressão de receptores serotoninérgicos, como 5-HT1A, 5-HT2A e 5-HT2C, receptores já associados à plasticidade neural induzida por psicodélicos. No aspecto morfológico, é plausível identificar remodelamento sináptico e modulação glial, observáveis em mudanças na expressão de proteínas como GFAP, NeuN, calbindina, parvalbumina e calretinina. No caso de animais idosos, a administração da ayahuasca pode inclusive modular processos inflamatórios, alterando a expressão de marcadores como IL-6, S-100 e IBA1, o que poderá tanto reduzir quanto intensificar a neuroinflamação característica da senescência. A discussão em torno desses resultados deve ser organizada a partir de três eixos principais: os efeitos comportamentais nos ritmos circadianos, as implicações neuroquímicas e neuromorfológicas e a relevância translacional e clínica. Do ponto de vista comportamental, a serotonina desempenha papel modulador importante sobre a sensibilidade do núcleo supraquiasmático à luz e participa de forma ativa na regulação do ciclo sono-vigília. Considerando que a ayahuasca é um agonista serotoninérgico, é esperado que os animais tratados apresentem mudanças claras na amplitude e regularidade do ritmo atividade/repouso. Em animais jovens, a substância poderá facilitar a sincronização do sistema circadiano frente a estímulos fóticos e não fóticos, promovendo maior estabilidade rítmica. Já nos idosos, os efeitos podem se dar em duas direções: melhora da ritmicidade, caso a ayahuasca compense déficits serotoninérgicos, ou maior fragmentação, caso a sobrecarga serotoninérgica interaja negativamente com circuitos já degenerados. Tais achados dialogam com pesquisas que relacionam o uso de psicodélicos a ganhos cognitivos e à reorganização da percepção temporal em humanos, mas acrescentam um novo elemento ao sugerirem uma ação direta sobre o tempo biológico. Em relação às implicações neuroquímicas e neuromorfológicas, a análise imuno-histoquímica deve revelar alterações importantes no conteúdo neuroquímico do sistema de temporização circadiano. Modificações nos neurotransmissores clássicos e nos receptores serotoninérgicos reforçam a ideia de que a ayahuasca não atua apenas em áreas tradicionalmente associadas à emoção e à cognição, como hipocampo e amígdala, mas também em núcleos diretamente envolvidos na temporização circadiana. No nível morfológico, a bebida pode induzir plasticidade neural, manifestada em maior arborização dendrítica, reorganização de fibras serotoninérgicas e modulação da atividade glial. Esses efeitos já foram observados em estudos com outras substâncias psicodélicas, como LSD e

psilocibina, e fortalecem a hipótese de que a ayahuasca poderia atenuar déficits relacionados ao envelhecimento. Além disso, a substância pode impactar processos inflamatórios e marcadores de estresse celular, incluindo BDNF, PER, BMAL e IL-6. Caso os resultados indiquem redução da neuroinflamação e aumento da plasticidade neuronal, a ayahuasca poderá ser considerada uma candidata promissora em terapias voltadas ao envelhecimento saudável. Do ponto de vista translacional e clínico, a confirmação dos efeitos da ayahuasca sobre o sistema de temporização circadiano em animais abre perspectivas significativas. Primeiramente, essa substância poderia ser explorada como estratégia terapêutica em distúrbios do sono e do ritmo circadiano, como insônia, jet lag, transtornos decorrentes do trabalho em turnos e, sobretudo, em idosos que sofrem com a fragmentação rítmica. Além disso, no campo das doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, que apresentam desorganização circadiana precoce, a ayahuasca poderia ser investigada como intervenção complementar para melhorar a qualidade de vida. Outro ponto relevante é o da saúde mental, já que evidências apontam efeitos antidepressivos e ansiolíticos da bebida. Se for comprovado que ela também atua reorganizando ritmos biológicos, isso ampliará a compreensão de sua eficácia, considerando que depressão e ansiedade estão intimamente associadas a distúrbios circadianos. Em síntese, os resultados esperados convergem para a ideia de que a ayahuasca, por sua ação serotoninérgica, pode modular os ritmos circadianos em roedores e primatas, promover plasticidade neural nos componentes centrais do sistema de temporização, interagir de maneira diferenciada em animais jovens e idosos, assim como entre machos e fêmeas, e abrir novas perspectivas clínicas no tratamento de distúrbios do sono, no combate a efeitos do envelhecimento e na abordagem de transtornos psiquiátricos. A discussão plausível reforça que a ayahuasca ultrapassa seu papel tradicional de agente alucinógeno e se coloca como ferramenta neurocientífica para a compreensão da integração entre neurotransmissores, plasticidade neural, envelhecimento e ritmos biológicos. Ao mesmo tempo, destaca-se a necessidade de cautela ética e científica na transição para modelos humanos, já que a substância atua em múltiplos sistemas fisiológicos e sua segurança em longo prazo ainda precisa ser amplamente investigada em contextos controlados.

Conclusão

A conclusão deste trabalho aponta para a compreensão de que a ayahuasca, bebida tradicionalmente associada a contextos ritualísticos e religiosos, assume uma dimensão científica inovadora ao ser investigada em sua interação com o sistema de temporização circadiano. Os resultados esperados sugerem que a substância, por sua ação agonista nos receptores serotoninérgicos, pode exercer influência significativa sobre os ritmos biológicos de atividade e repouso, bem como induzir alterações neuroquímicas e morfológicas em estruturas centrais do relógio biológico, como o núcleo supraquiasmático e o núcleo pré-geniculado. Esses achados são particularmente relevantes porque ampliam o campo de conhecimento sobre os efeitos de psicodélicos para além da percepção subjetiva do tempo e da realidade, indicando que tais substâncias podem agir diretamente sobre o “tempo biológico” dos organismos. Outro aspecto fundamental deste estudo é a consideração das variáveis idade e sexo, que permitem avaliar como o processo de senescência e a influência hormonal modulam a resposta à ayahuasca. Essa abordagem reforça a importância de compreender não apenas os efeitos gerais da substância, mas também as nuances individuais e biológicas que podem determinar sua eficácia ou riscos potenciais. Em animais jovens, espera-se uma maior plasticidade neural e reorganização rítmica, enquanto nos idosos os efeitos podem ser mais heterogêneos, revelando tanto potenciais benefícios quanto possíveis

agravos da fragmentação rítmica já existente. As implicações desse estudo transcendem o campo experimental e alcançam relevância translacional. Se comprovada a capacidade da ayahuasca em modular os ritmos circadianos, abrem-se caminhos para novas estratégias terapêuticas em distúrbios do sono, em condições associadas ao envelhecimento e em doenças neurodegenerativas, além de ampliar a compreensão de seus efeitos já observados em transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade. Nesse sentido, a pesquisa aqui proposta não apenas contribui para a neurociência psicodélica, mas também reforça o potencial da ayahuasca como ferramenta científica e clínica de grande impacto. Contudo, é preciso reconhecer que este é um campo ainda inicial, com muitas lacunas a serem preenchidas. Os efeitos de longo prazo da ayahuasca sobre os ritmos biológicos, a segurança de seu uso repetido em diferentes populações e a compreensão detalhada dos mecanismos neuroquímicos envolvidos são aspectos que demandam investigações futuras. Além disso, a transposição de achados em modelos animais para humanos deve ser feita com cautela, considerando as complexidades éticas, culturais e fisiológicas envolvidas. Portanto, a principal conclusão deste trabalho é que a ayahuasca tem potencial para atuar não apenas como substância psicodélica de interesse terapêutico em saúde mental, mas também como modulador dos ritmos circadianos e da plasticidade neural, em especial no contexto do envelhecimento.

Referências

- AUSTAD, S. N. The comparative biology of mitochondrial function and the rate of aging. *Integrative and Comparative Biology*, 2018. v. 58, n. 3, p. 559–566.
- BENITAH, S. A.; WELZ, P.-S. Circadian regulation of adult stem cell homeostasis and aging. *Cell Stem Cell*, 2020. v. 26, n. 6, p. 817–831.
- CAMERON, L. P.; BENSON, C. J.; DUNLAP, L. E.; OLSON, D. E. Effects of N,N-Dimethyltryptamine on rat behaviors relevant to anxiety and depression. *ACS Chemical Neuroscience*, 2018. v. 9, p. 1582–1590.
- CLEELAND, C.; PIPINGAS, A.; SCHOLEY, A.; WHITE, D. Neurochemical changes in the aging brain: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2019. v. 98, p. 306–319.
- CURRAN, J. A.; BUHL, E.; TSANEVA-ATANASOVA, K.; HODGE, J. J. Age-dependent changes in clock neuron structural plasticity and excitability are associated with a decrease in circadian output behavior and sleep. *Neurobiology of Aging*, 2019. v. 77, p. 158–168.
- EEZA, M. N.; SINGER, R.; HÖFLING, C.; MATYSIK, J.; DE GROOT, H. J.; ROßNER, S.; ALIA, A. Metabolic profiling of suprachiasmatic nucleus reveals multifaceted effects in an Alzheimer's disease mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2021. v. 81, n. 2, p. 797–808.
- ENGELBERTH, R. C. G.; AZEVEDO SILVA, K. D.; FIUZA, F. P.; SOARES, J. G.; COSTA, M. S.; LIMA, R. R. et al. Retinal, NPY- and 5-HT inputs to the aged suprachiasmatic nucleus in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience Research*, 2017. v. 121, p. 54–59.

GONÇALVES, F. B.; GONÇALVES, B. S.; CAVALCANTE, J. S.; AZEVEDO, C. V. Aging-related changes on social synchronization of circadian activity rhythm in a diurnal primate (*Callithrix jacchus*). *Chronobiology International*, 2020. v. 37, n. 7, p. 980–992.

GONZÁLEZ-LUNA, I. A.; JUÁREZ-TAPIA, C.; AGUILAR-VÁZQUEZ, A.; ARNOLD, E.; DÍAZ-CINTRA, S.; MIRANDA-ANAYA, M.; DÍAZ-MUÑOZ, M. Changes in 24 h rhythmicity of spontaneous locomotor activity in the triple transgenic mouse for Alzheimer's disease (3xTg-AD) in a jet lag protocol: correlations with retinal sensitivity. *Journal of Circadian Rhythms*, 2021. v. 19.

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. *Biology*, 2019. v. 8, n. 13, p. 8010013.

HOOD, S.; AMIR, S. Neurodegeneration and the circadian clock. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2017. v. 9, p. 170.

KHAN, S. S.; SINGER, B. D.; VAUGHAN, D. E. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*, 2017. v. 16, n. 4, p. 624–633.

KOEN, J. D.; RUGG, M. D. Neural dedifferentiation in the aging brain. *Trends in Cognitive Sciences*, 2019. v. 23, n. 7, p. 547–559.

KOEN, J. D.; HAUCK, N.; RUGG, M. D. The relationship between age, neural differentiation, and memory performance. *Journal of Neuroscience*, 2019. v. 39, n. 1, p. 149–162.

LIU, F.; CHANG, H. C. Physiological links of circadian clock and biological clock of aging. *Protein & Cell*, 2017. v. 8, n. 7, p. 477–488.

PATTON, A. P.; HASTINGS, M. H. The suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 2018. v. 28, p. R803–R825.

PROCHAZKOVA, L.; LIPPEIT, D. P.; COLZATO, L. S.; KUCHAR, M.; SJOERDS, Z.; HOMMEL, B. Exploring the effect of microdosing psychedelics on creativity in an open-label natural setting. *Psychopharmacology*, 2018. v. 235, p. 3401–3413.

RAMIS, M. R.; SARUBBO, F.; MORANTA, D.; TEJADA, S.; LLADÓ, J.; MIRALLES, A.; ESTEBAN, S. Neurochemical and cognitive beneficial effects of moderate physical activity and catechin in aged rats. *Antioxidants*, 2021. v. 10, n. 4, p. 621.

RANA, B. K.; PANIZZON, M. S.; FRANZ, C. E.; SPOON, K. M.; JACOBSON, K. C.; XIAN, H.; ANCOLI-ISRAEL, S.; LYONS, M.; KREMEN, W. S. Association of sleep quality on memory-related executive functions in middle age. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 2018. v. 24, n. 1, p. 67–76.

SANTANA, N. N. M.; BARROS, M. A. S.; MEDEIROS, H. H. A.; SANTANA, M. A. D.; SILVA, L. L.; MORAIS, P. L. A. G. F. V. L.; CAVALCANTE, J. S.; LIMA, R. R. M.; CAVALCANTE, J. C.; COSTA, M. S. M. O.; ENGELBERTH, R. C. J. G.; NASCIMENTO, J. R. E. S. The suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the flat-faced fruit-

eating bat (*Artibeus planirostris*): retinal projections and neurochemical anatomy. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2018. v. 12, Artigo 36.

SILVA, F. S.; SILVA, E. A. S.; SOUSA, J. R. G. M.; MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P.; SOARES-RACHETTI, V. P.; ARAÚJO, D. B.; SOUSA, M. B. C.; LOBÃO-SOARES, B.; HALLAK, J.; GALVÃO-COELHO, N. L. Acute effects of ayahuasca in a juvenile non-human primate model of depression. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 2019. v. 41, n. 4, p. 280–288.

STALLONE, G.; INFANTE, B.; PRISCIANDARO, C.; GRANDALIANO, G. Mtor and aging: An old fashioned dress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. v. 20, n. 11, p. 2774.

WANG, Z.; ZHANG, Y.; DONG, L.; ZHENG, Z.; ZHONG, D.; LONG, X.; YAO, D. Effects of morning blue-green 500 nm light therapy on cognition and biomarkers in middle-aged and older adults with subjective cognitive decline and mild cognitive impairment: study protocol for a randomized controlled trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2021. v. 83, n. 4, p. 1521–1536.

ZHAO, J.; WARMAN, G. R.; CHEESEMAN, J. F. The functional changes of the circadian system organization in aging. *Ageing Research Reviews*, 2019. v. 52, p. 64–71.

FIUZA, F. P.; SILVA, K. D.; PESSOA, R. A.; PONTES, A. L.; CAVALCANTI, R. L.; PIRES, R. S. et al. Age-related changes in neurochemical components and retinal projections of rat intergeniculate leaflet. *Age*, 2016. v. 38, n. 1, p. 4.

GONÇALVES, F. B.; BORGES, G. R.; GONÇALVES, B. S.; CAVALCANTE, J. S.; MENEZES, A. A.; AZEVEDO, C. V. Evidence for age-related changes in the circadian activity rhythm of the diurnal primate *Callithrix jacchus*: a case report. *Biological Rhythm Research*, 2016. v. 47, n. 3, p. 395–399.

OSÓRIO, F. L.; SANCHES, R. F.; MACEDO, L. R.; SANTOS, R. G.; MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P.; WICHERT-ANA, L. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2015. v. 37, p. 13–20.

SANTOS, R. G.; OSÓRIO, F. L.; CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2016. v. 38, p. 65–72.

LI, S. C. Neuromodulation and developmental contextual influences on neural and cognitive plasticity across the lifespan. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2013. v. 37, n. 9, p. 2201–2218.

LI, S. C.; RIECKMANN, A. Neuromodulation and aging: implications of aging neuronal gain control on cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 2014. v. 29, p. 148–158.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. *Cell*, 2013. v. 153, n. 6, p. 1194–1217.

ENGELBERTH, R. C. G.; SILVA, K. D. A.; AZEVEDO, C. V. D. M.; GAVIOLI, E. C.; SANTOS, J. R. D.; SOARES, J. G. et al. Morphological changes in the suprachiasmatic

nucleus of aging female marmosets (*Callithrix jacchus*). *BioMed Research International*, 2014.

HANNA, L.; WALMSLEY, L.; PIENAAR, A.; HOWARTH, M.; BROWN, T. M. Geniculohypothalamic GABAergic gate suprachiasmatic nucleus responses to retinal input. *Journal of Physiology*, 2017. v. 595, n. 11, p. 3621–3649.

ROBERTS, D. E.; KILLIANY, R. J.; ROSENE, D. L. Neuron numbers in the hypothalamus of the normal aging rhesus monkey: stability across the adult lifespan and between the sexes. *Journal of Comparative Neurology*, 2012. v. 520, n. 6, p. 1181–1197.

CÓDIGO: SB0373

AUTOR: MARIA EDUARDA CAVALCANTE FERNANDES TELES

ORIENTADOR: DANIEL CARLOS FERREIRA LANZA

TÍTULO: O mecanismo de ação das proteínas E6 e E7 do HPV de baixo risco

Resumo

Introdução: O Papilomavírus Humano (HPV) de baixo risco, especialmente os tipos 6 e 11, está associado a verrugas genitais e papilomatose respiratória recorrente. Embora não relacionados a neoplasias, esses vírus utilizam as proteínas E6 e E7 para modular apoptose, ciclo celular e resposta ao dano ao DNA (DDR), favorecendo a persistência da infecção. **Metodologia:** Foi realizada busca sistemática nas bases PubMed, Scopus e ScienceDirect, incluindo artigos até abril de 2025, com termos relacionados a apoptose, diferenciação celular, hipermetilação e DDR. Incluíram-se estudos sobre mecanismos do HPV de baixo risco e excluíram-se trabalhos focados apenas em HPVs de alto risco. Complementarmente, análises in silico foram conduzidas: interações proteína-proteína (BIOGRID), anotação funcional (UniProt), alinhamento (MUSCLE v5), modelagem estrutural (IBS, AlphaFold, UCSF Chimera) e predição de estrutura secundária (NPS@). **Resultados:** Dos 254 artigos identificados, 40 foram selecionados, sendo 16 sobre mecanismos moleculares. Verificou-se que E6 interage com p53 e degrada BAK, bloqueando apoptose, enquanto E7 inativa pRb, promovendo progressão celular. Apesar de redes de interação menos densas que nos HPVs de alto risco, modulam vias críticas à persistência viral. Modelagens revelaram conservação de domínios funcionais (LXXLL, ZnF, LXCXE), com variações sutis ligadas ao baixo potencial oncogênico. **Conclusão:** HPVs de baixo risco afetam vias regulatórias além das lesões benignas.

Palavras-chave: Vírus; Mecanismo de ação viral do HPV; Proteínas

TITLE: The mechanism of action of low-risk HPV E6 and E7 proteins

Abstract

Introduction: Low-risk Human Papillomavirus (HPV), mainly types 6 and 11, is associated with genital warts and recurrent respiratory papillomatosis. Although not directly linked to malignancies, these viruses express E6 and E7 proteins that modulate apoptosis, cell cycle control, and the DNA damage response (DDR), supporting viral persistence. **Methodology:** A systematic search was conducted in PubMed, Scopus, and ScienceDirect up to April 2025, using terms related to apoptosis, differentiation, hypermethylation, and DDR. Studies on low-risk HPV mechanisms were included, while those focused exclusively on high-risk types were excluded. Complementary in silico analyses comprised protein-protein interactions (BIOGRID), functional annotation (UniProt), multiple alignment (MUSCLE v5), structural modeling (IBS, AlphaFold, UCSF Chimera), and secondary structure prediction (NPS@). **Results:** From 254 articles identified, 40 were selected, with 16 specifically addressing molecular mechanisms. E6 was found to interact with p53 and degrade BAK, blocking apoptosis, while E7 inactivated pRb, promoting cell cycle progression. Despite less complex interaction networks compared to high-risk HPVs, low-risk types modulated critical

host pathways. Structural modeling revealed conserved domains (LXXLL, ZnF, LXCXE) with subtle variations associated with lower oncogenic potential. **Conclusion:** Low-risk HPVs affect host regulatory pathways beyond benign lesion development.

Keywords: Virus; Viral mechanism of action of HPV; Proteins

Introdução

O Papilomavírus Humano (HPV) compreende mais de 200 tipos, classificados em alto e baixo risco conforme seu potencial oncogênico. Os tipos de baixo risco, como HPV6 e HPV11, estão associados a lesões benignas, incluindo verrugas genitais e papilomatose respiratória recorrente (RRP). Embora não estejam diretamente ligados a cânceres, têm grande impacto em saúde pública, afetando a qualidade de vida dos pacientes (Donovan & Callander, 2018; Schmeler & Sturgis, 2016). A patogênese envolve interação entre genes virais e o ambiente celular. As proteínas E6 e E7 desempenham papel central, modulando apoptose, ciclo celular e resposta ao dano ao DNA (DDR). A E6 interage com p53, mas com menor afinidade que em HPVs de alto risco, limitando a degradação dessa proteína. Ainda assim, inibe apoptose e favorece a sobrevivência das células infectadas. Estudos também mostram que E6 pode degradar a proteína pró-apoptótica BAK após exposição a UV-B, prevenindo a morte celular (Uehara et al., 2021). A E7 liga-se à proteína pRb, liberando os fatores E2F e promovendo a progressão do ciclo celular, essencial para a replicação viral (Doorbar, 2016). Além disso, há evidências de que HPVs de baixo risco suprimem o DDR, especialmente quando coexpressos com o oncogene viral LMP-1 do EBV, o que aumenta mutagênese sem induzir transformação maligna. Assim, mesmo com baixo potencial oncogênico, os HPVs de baixo risco alteram vias celulares críticas, garantindo persistência viral e impacto clínico relevante.

Metodologia

Para investigar os mecanismos moleculares do Papilomavírus Humano (HPV) de baixo risco, foi realizada uma busca sistemática nas bases PubMed, Scopus e ScienceDirect, incluindo artigos até abril de 2025. Foram utilizados termos relacionados a apoptose, diferenciação celular, hipermetilação, ciclo celular e resposta ao dano no DNA (DDR). Foram incluídos estudos originais e revisões sobre HPV6 e HPV11, excluindo trabalhos focados apenas em HPVs de alto risco. Além da revisão bibliográfica, foram conduzidas análises *in silico*, envolvendo: BIOGRID, para mapear interações proteína-proteína das E6 e E7; UniProt, para anotação funcional; MUSCLE v5, para alinhamento múltiplo de sequências; IBS, AlphaFold e UCSF Chimera, para modelagem estrutural e análise tridimensional; NPS@, para predição de estrutura secundária. Foram comparados os perfis de interação das proteínas E6 e E7 de HPVs de baixo (6 e 11) e alto risco (16 e 18), com construção de mapas de interação, diagramas de Venn e modelagens estruturais para identificar domínios conservados (LXXLL, ZnF e LXCXE). Essa abordagem integrada permitiu destacar diferenças quantitativas e qualitativas entre variantes de baixo e alto risco, esclarecendo como HPVs de baixo risco modulam processos celulares sem induzir transformação maligna.

Resultados e Discussões

A busca sistemática em PubMed, Scopus e ScienceDirect identificou 254 artigos, dos quais 40 foram selecionados para leitura integral e 16 incluídos na análise final. A evolução

temporal mostrou um aumento progressivo das publicações sobre HPV de baixo risco, especialmente a partir de 2022, refletindo maior interesse científico nos mecanismos moleculares dessas variantes (Fig. 1A, 1B).

As análises *in silico* revelaram que os HPVs de baixo risco (6 e 11) apresentam redes de interação proteína-proteína menos densas em comparação aos de alto risco (16 e 18). Enquanto a E6 do HPV6 interage com 58 proteínas e a do HPV11 com 22, a E6 do HPV16 conecta-se a 722 e a do HPV18 a 351. Resultados semelhantes foram observados para E7: HPV6 (127 interações) e HPV11 (235) contra HPV16 (509) e HPV18 (117) (Fig. 2A–2J). Essa diferença quantitativa sustenta a hipótese de que a densidade de interações está diretamente ligada ao potencial oncogênico.

Apesar de menos complexas, as redes de baixo risco mantêm alvos celulares relevantes. A E6 interage com TP53, EP300, UBE3A e MYC, modulando apoptose e transcrição, enquanto a E7 se conecta a RB1, E2F1, CDKN1A e PCNA, influenciando o ciclo celular. O diagrama de Venn (Fig. 3) evidenciou funções compartilhadas entre E6 e E7, como regulação do ciclo e apoptose, além de funções exclusivas que destacam a especialização de cada proteína viral.

Na análise estrutural linear, observou-se que a E6 conserva os domínios clássicos: região N-terminal, dois dedos de zinco (ZnF1 e ZnF2), motivo LXXLL e região C-terminal (Fig. 4A). Já a E7 apresentou a região rica em resíduos, o motivo LXCXE (responsável pela ligação à pRb), um domínio ZnF e porções C-terminais flexíveis (Fig. 4B). Essas estruturas confirmam que os HPVs de baixo risco preservam os elementos mínimos para modular vias celulares, mas com menor capacidade transformadora que os de alto risco.

As modelagens tridimensionais confirmaram essas diferenças. As E6 de baixo risco mostraram estruturas mais simples, com menor compactação e interfaces menos eficientes para degradação de p53. Já as variantes de alto risco apresentaram conformações robustas, com maior acessibilidade ao motivo LXXLL e maior capacidade de recrutar E6AP, explicando sua ação oncogênica. Para a E7, as variantes 6 e 11 exibiram regiões C-terminais desordenadas, relacionadas a um potencial transformador limitado, enquanto as variantes 16 e 18 mostraram regiões N-terminais mais compactas, favorecendo a inativação de pRb.

De forma integrada, os achados demonstram que os HPVs de baixo risco compartilham os mesmos mecanismos centrais dos de alto risco — modulação da apoptose, ciclo celular e DDR —, mas de maneira menos intensa. A menor densidade de interações, a plasticidade estrutural mais flexível e a exposição reduzida de motivos funcionais explicam porque essas variantes conseguem persistir sem induzir transformação maligna.

Esses resultados reforçam a necessidade de considerar os HPVs de baixo risco não apenas como agentes de lesões benignas, mas como vírus com mecanismos moleculares sofisticados que afetam a biologia celular do hospedeiro. A compreensão dessas diferenças pode orientar tanto o desenvolvimento de terapias antivirais direcionadas quanto a distinção entre manifestações benignas e malignas, contribuindo para estratégias de prevenção e manejo clínico mais eficazes.

Conclusão

O presente estudo evidenciou que os HPVs de baixo risco, particularmente os tipos 6 e 11, embora classicamente associados a manifestações clínicas benignas, como verrugas genitais e

papilomatose respiratória recorrente, apresentam mecanismos moleculares altamente sofisticados e em parte convergentes com os HPVs de alto risco. Através da integração de dados estruturais, funcionais e interacionais das proteínas virais E6 e E7, foi possível demonstrar que esses vírus de baixo risco interferem significativamente na apoptose, no ciclo celular e na resposta ao dano ao DNA (DDR). As análises estruturais realizadas por meio de modelagem tridimensional com o AlphaFold, integradas a dados funcionais extraídos de bases especializadas e estudos de alto impacto, mostraram que as proteínas E6 e E7 dos HPVs de baixo risco mantêm domínios funcionais críticos como ZnF, LXXLL e LXCXE, ainda que com menor exposição ou estabilidade quando comparadas às suas contrapartes oncogênicas. As evidências aqui reunidas também apontam para eventos de hipermetilação e expressão aumentada de oncogenes virais como potenciais mecanismos de evasão imunológica e persistência epitelial. Adicionalmente, o estudo identificou que as diferenças conformacionais entre os tipos 6 e 11, mesmo dentro da mesma classificação de risco, refletem potenciais variações funcionais que podem influenciar a patogênese e a resposta do hospedeiro. Tais achados sustentam a hipótese de que a baixa oncogenicidade desses tipos não decorre da ausência de mecanismos moleculares relevantes, mas possivelmente de menor eficácia, estabilidade e sinergismo entre esses mecanismos. Por fim, os resultados reforçam a necessidade de reavaliar o papel clínico e imunobiológico dos HPVs de baixo risco, bem como de expandir os estudos funcionais e estruturais dessas variantes, que permanecem subexploradas. A compreensão aprofundada das estratégias moleculares utilizadas por esses vírus poderá abrir novas possibilidades para intervenções terapêuticas e estratégias de vigilância clínica mais eficazes.

Referências

- DONOVAN, B.; CALLANDER, D. Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: The benefits of quadrivalent human papillomavirus vaccination continue to accrue. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 217, p. 177–178, 2018. Disponível em: https://consensus.app/papers/juvenileonset-recurrent-respiratory-papillomatosis-the-donovan-callander/4a67fb729a5b5b90a9e296d181e7bb21/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.
- HANFT, W. et al. Sexually transmitted human papillomavirus and related sequelae. *Clinical Microbiology Reviews*, 2025. Disponível em: https://consensus.app/papers/sexually-transmitted-human-papillomavirus-and-related-hanft-karita/5275f1bd17f95bc1aba522b8b7fff497/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.
- SCHMELER, K.; STURGIS, E. Expanding the benefits of HPV vaccination to boys and men. *The Lancet*, v. 387, p. 1798–1799, 2016. Disponível em: https://consensus.app/papers/expanding-the-benefits-of-hpv-vaccination-to-boys-and-men-schmeler-sturgis/414865e4fd955593807f37f99214135e/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.
- DOORBAR, J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *The Journal of Pathology*, v. 238, 2016. Disponível em: https://consensus.app/papers/model-systems-of-human-papillomavirus-associated-doorbar/27e42e99a4c75f418cabb896aef64464/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

UEHARA, K. et al. Co-expression of low-risk HPV E6/E7 and EBV LMP-1 leads to precancerous lesions by DNA damage. BMC Cancer, v. 21, 2021. Disponível em: https://consensus.app/papers/coexpression-of-lowrisk-hpv-e6e7-and-ebv-lmp1-leads-to/c4e44ce2138c5b59ac549705b30a727e/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

DREWS, C. M.; CASE, S.; VANDE POL, S. V. E6 proteins from high-risk HPV, low-risk HPV, and animal papillomaviruses activate the Wnt/ β -catenin pathway through E6AP-dependent degradation of NHERF1. PLOS Pathogens, 2019. Disponível em: https://consensus.app/papers/e6-proteins-from-highrisk-hpv-lowrisk-hpv-and-animal-drews-case/2f98ce93048456919e2f35f99dc09c62/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

EBNER, F. A. et al. A ubiquitin variant-based affinity approach selectively identifies substrates of the ubiquitin ligase E6AP in complex with HPV-11 E6 or HPV-16 E6. The Journal of Biological Chemistry, v. 295, p. 15070–15082, 2020. Disponível em: https://consensus.app/papers/a-ubiquitin-variantbased-affinity-approach-selectively-ebner-sailer/cc831bc28b1d5730b4f3d6fa604d54be/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

GILL, S. et al. The carcinogenic potential of E6 & E7 genes of high-risk HPV compared with E6, E7 genes of low-risk HPV in human cervical cancer: A review, 2014. Disponível em: https://consensus.app/papers/the-carcinogenic-potential-of-e6-e7-genes-of-highrisk-hpv-gill-jana/2a40f8a629e2510bb3a9804af10b2dcd/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

UNDERBRINK, M. et al. E6 proteins from low-risk human papillomavirus types 6 and 11 are able to protect keratinocytes from apoptosis via Bak degradation. The Journal of General Virology, v. 97, n. 3, p. 715–724, 2016. Disponível em: https://consensus.app/papers/e6-proteins-from-lowrisk-human-papillomavirus-types-6-and-underbrink-dupuis/3cced1c9c3dc5cef529d120fcd9f75/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

STICH, J. et al. Epigenetic silencing of interferon response genes during high-risk HPV-mediated carcinogenesis. Scientific Reports, 2016. Disponível em: https://consensus.app/papers/epigenetic-silencing-of-interferon-response-genes-during-stich-decarolis/6c18898616ea5bca8d25ec1aefdb5e5c/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

ESTÊVÃO, D. et al. The role of HPV oncoproteins in cervical carcinogenesis and epigenetic alterations. Cancer Letters, 2019. Disponível em: https://consensus.app/papers/the-role-of-hpv-oncoproteins-in-cervical-carcinogenesis-estevao-pereira/f5e199df1ed0d0d6a345f8fbb8ed26df/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

CICCHINI, L. et al. High-risk HPV E6 oncoproteins target the antiviral defense protein ADAR1. PLOS Pathogens, 2017. Disponível em: https://consensus.app/papers/highrisk-hpv-e6-oncoproteins-target-the-antiviral-cicchini-zanier/44c1c173f6178be418dbd66d474e213b/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

MURAKAMI, I. et al. Human papillomavirus E7 maintains high expression of E2F-responsive genes by blocking p130-mediated repression. The Journal of Virology, 2019. Disponível em: https://consensus.app/papers/human-papillomavirus-e7-maintains-high-expression-murakami-tang/6713b70dfadf29c6a8e4bce5ec68f6e6/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

SAUNDERS-WOOD, T. et al. Evolutionary conservation of papillomavirus E6 proteins' modulation of the Notch pathway. mBio, 2022. Disponível em:

https://consensus.app/papers/evolutionary-conservation-of-papillomavirus-e6-proteins-saunderswood-downey/96d9c1ec0c2a52cce531f7e0d04ce8e3/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

SANG, B.; BARBOSA, M. Single amino acid substitutions in “low-risk” human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the “high-risk” HPV E7 oncoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 17, p. 8063–8067, 1992. Disponível em: https://consensus.app/papers/single-amino-acid-substitutions-in-lowrisk-human-sang-barbosa/1dc187484b775881b7e4f73e0c39bed8/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

SCHMITT, A. et al. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *Journal of Virology*, v. 68, p. 7051–7059, 1994. Disponível em: https://consensus.app/papers/comparison-of-the-properties-of-the-e6-and-e7-genes-of-low-and-schmitt-harry/0ae133c59ded57e99fd600602ba0c395/?utm_source=chatgpt. Acesso em: 23 abr. 2025.

Anexos

Fig. 1A. Distribuição temporal dos artigos identificados sobre HPV de baixo risco ao longo do período de 1990 a 2025.

Fig.1B. O diagrama representa as etapas de identificação, triagem, extração e análise de dados dos estudos incluídos.

Fig.2A. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E6 do HPV6.

Fig.2B. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E6 do HPV11.

Fig.2C. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E6 do HPV16.

Fig. 2D. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E6 do HPV18.

Fig.2E. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E7 do HPV6.

Fig. 2F. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E7 do HPV11.

Fig. 2G. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E7 do HPV16.

Fig. 2H. Rede de interação proteína-proteína da oncoproteína E7 do HPV18.

Figura 2I. Número de proteínas interagentes com a proteína E6 em diferentes tipos de HPV.

Figura 2J. Número de proteínas interagentes com a proteína E7 em diferentes tipos de HPV.

Fig. 3. Diagrama de Venn representando os mecanismos de ação associados às proteínas E6 (vermelho) e E7 (verde) do Papilomavírus Humano de baixo risco.

Fig.4A Comparação da organização dos domínios funcionais da proteína E6 nos tipos HPV6, HPV11, HPV16 e HPV18.

Fig. 4B.Comparação da organização dos domínios funcionais da proteína E7 nos tipos HPV6, HPV11, HPV16 e HPV18.

CÓDIGO: SB0375

AUTOR: RAISSA GABRIELLY NASCIMENTO MATIAS

COAUTOR: HÉLIDA MARAVILHA DANTAS E SOUSA ALMEIDA

ORIENTADOR: ALIANDA MAIRA CORNELIO DA SILVA

TÍTULO: A ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO E ANSIEDADE PROVOCADA POR EXPOSIÇÃO A ESTÍMULOS AVERSIVOS É MODULADA POR NEUROTRANSMISSORES CANABINÓIDES? UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA.

Resumo

Diante de estímulos aversivos, é comum a ativação de mecanismos defensivos que podem incluir uma redução temporária na sensibilidade à dor, conhecida como analgesia induzida pelo medo ou ansiedade. Isto é importante para a evolução e envolve diversos sistemas neuroquímicos. Para elucidar o envolvimento do sistema endocanabinóide, este trabalho é uma revisão sobre o papel dos neurotransmissores canabinóides na modulação da antinocicepção induzida por medo e ansiedade. Então, foi adotada uma metodologia de busca integrativa em bases como 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 endocanabinóides, 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 canabinóide 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 dor e emoção, revelando como a exposição a estímulos aversivos 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 is common, which may include a temporary reduction in pain sensitivity, known as fear- or anxiety-induced analgesia. This is important for evolution and involves several neurochemical systems. To

elucidate the involvement of the endocannabinoid system, this work is a review of the role of cannabinoid neurotransmitters in modulating fear- and anxiety-induced antinociception. Therefore, an integrative search methodology was adopted using databases such as PubMed, Scopus, and Web of Science, with well-defined inclusion, exclusion, and eligibility criteria. The studies had their data collected, and the risk of methodological bias assessed. It was observed that endocannabinoids, such as anandamide and 2-arachidonoylglycerol, modulate pain, particularly through the CB1 receptor, in key areas such as the amygdala, hypothalamus, periaqueductal gray matter and spinal cord. The tests that demonstrated activation of the cannabinoid system were: immobilization stress, foot shock, and swimming stress as aversive stimuli and nociceptive tests such as the formalin test, hot plate test, plantar test, and tail flick test. The data gathered enable a broader understanding of the interaction between pain and emotion, revealing how exposure to aversive stimuli can modulate the neurobiological circuits of nociception.

Keywords: Cannabinoids; Endocannabinoids; Antinociception; Fear; Anxiety.

Introdução

Os animais, assim como os seres humanos, respondem de forma distinta a diferentes estímulos, principalmente aqueles com potencial ameaçador. Diante de situações inatas ou aprendidas de ameaça, é comum a manifestação de comportamentos defensivos (luta, fuga, congelamento, vocalizações) e respostas neurovegetativas (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 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, sabendo-se que a dor é uma das principais causas de sofrimento e uma queixa frequente nos serviços de saúde e que processos traumáticos podem interferir na sua percepção, investigar e explicar o impacto desses eventos aversivos na percepção da dor auxilia no entendimento dos impactos fisiológicos de eventos traumáticos no sistema nervoso[13,14]. É conhecida a participação da neurotransmissão opióide, no entanto, o envolvimento dos neurotransmissores canabinóides ainda precisa ser elucidado. Nesse sentido, torna-se possível estabelecer novas estratégias para manejo assertivo da dor, especialmente em casos associados ao estresse emocional[15].

Diante disso, o presente estudo propõe revisar a literatura científica para responder à questão: a antinociceção induzida pelo medo e ansiedade, em modelos etológicos 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

Foi aplicada a metodologia de revisão integrativa da literatura conforme o guia de DHOLLANDE e colaboradores (2021). A sua escrita seguiu as orientações do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Page et al., 2021), conforme recomendação da literatura científica (MOHAMED; SALSBERG; KELLY, 2023; OERMANN; KNAFL, 2021; DHOLLANDE et al., 2021)[16,17,18].

Estratégia de busca

As bases de dados Pubmed, Scopus e Web of Science foram consultadas em 2023. A fórmula considerada para a busca foi: “fear-induced antinociception” or “stress-induced hyperalgesia” or “stress-induced analgesia” or “stress-induced antinociception” and (“cannabinoid” or “anandamide”, “tetrahydrocannabinol” or “2-arachidonoyl glycerol” or “THC”).

CrITÉRIOS de seleção

Os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados durante a leitura dos títulos e resumos. Os critérios de inclusão foram: publicações indexadas nas bases PubMed, Web of Science e/ou Scopus, contendo no título ou resumo os termos-chave definidos; e estudos publicados a partir do ano 2000. Já os critérios de exclusão foram: a não abordagem de métodos experimentais em animais, estudos publicados como capítulos de livro, teses e resumos de eventos e que não estavam disponíveis na íntegra em inglês.

Esta etapa foi realizada de forma independente duplo-cega, por dois pesquisadores, utilizando a plataforma online Rayyan, e as divergências foram resolvidas por um terceiro avaliador. Em seguida, os estudos selecionados foram lidos na íntegra para verificação da elegibilidade, em que foram desconsiderados os estudos que não investigavam simultaneamente as duas temáticas centrais: antinociceção e/ou hiperalgesia associadas a estresse, medo ou ansiedade, e o sistema endocanabinóide; ou que não respondiam em seus resultados à questão norteadora da presente revisão.

Coleta e extração de dados

Dois pesquisadores extraíram os dados dos principais desfechos, bem como as seguintes informações tabuladas: título do artigo, autor, data de publicação, objetivos, resultados, testes aversivos e nociceptivos utilizados. Também foram extraídos dados acerca de fármacos e moléculas canabinóides estudadas, e outros sistemas de neurotransmissão que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo identificado. Esse processo foi realizado por meio da leitura completa dos artigos selecionados e revisados por um terceiro pesquisador.

Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés

A qualidade metodológica dos estudos foi avaliada por meio da Escala de Qualidade Metodológica (EMQ) (Chacón-Moscoso et al., 2023). 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 também 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

Cento e sete estudos foram encontrados por meio de buscas em bases de dados eletrônicas. Destes, trinta e dois estudos duplicados foram removidos por ferramentas automáticas. Setenta e cinco estudos foram submetidos à revisão de títulos e resumos, e trinta e oito foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão. Trinta e sete estudos foram considerados na íntegra, e sete estudos foram excluídos por atenderem aos critérios de exclusão. Quatro estudos foram excluídos por não atenderem aos critérios de elegibilidade. Portanto, vinte e seis estudos foram eleitos para coleta e análise de dados, conforme relatado na Figura 1, utilizando o fluxograma Prisma.

Figura 1 - Fluxograma Prisma mostrando o caminho metodológico seguido.

O risco de viés de cada artigo foi avaliado individualmente, utilizando três tipos de validade, como informado na seção de metodologia. Na validade externa, foram avaliados os critérios de seleção, a perda de unidades amostrais e o tratamento de dados faltantes, na qual a média dos estudos avaliados foi $0,7 \pm 0,26$. Na validade interna foram avaliados o tipo de delineamento do estudo, o momento das medidas e as técnicas de controle utilizadas; a média obtida foi de $0,95 \pm 0,89$. A validade de construtor, o qual a média obtida foi de 1, verificou a padronização das variáveis e definições de resultados. No geral, e de acordo com o cálculo indicado pelo MQS, 11,5 % possui moderado risco de viés e 88,5% baixo risco de viés. Essas informações estão resumidas na Figura 2, pelo gráfico da análise qualitativa de evidências e risco de viés gerado por Robvis.

Figura 2 - Gráfico com os resultados da análise de risco de viés dos estudos selecionados.

Nesse sentido, uma visão geral dos modelos experimentais revela serem predominantes as espécies de ratos e camundongos sendo 65,4% e 34,6%, respectivamente. Não houve aumento progressivo na proporção de estudos ao longo dos anos, com uma distribuição relativamente estável entre 2004 e 2020. O ano de 2020 apresentou o maior número de publicações (n=04), enquanto os demais anos contaram com um, dois ou três estudos. As principais características desses estudos incluídos na revisão estão listadas no Quadro 1.

Os testes de estresse, ansiedade e medo se subdividiram em físico, comportamental e farmacológico, enquanto os nociceptivos variaram em químico, mecânico, térmico e misto. Desse modo, o teste de estresse mais utilizado foi o de choque nas patas, presente em 57,7% dos estudos. Os endocanabinóides desempenham um papel modulador significativo no condicionamento contextual do medo com o choque nas patas, a análise dos estudos revelou que eles atuam principalmente por meio dos receptores canabinóides CB1 no encéfalo para influenciar a aquisição, a recordação, a extinção e a generalização de memórias de medo associadas ao contexto em que o choque nas patas ocorre.

A literatura traz que o bloqueio dos receptores CB1 aumenta a aquisição do comportamento de congelamento (uma resposta de medo) durante o condicionamento contextual de medo com choque nas patas, indicando que a sinalização endocanabinoide normalmente restringe o aprendizado do medo para evitar respostas excessivas[19,20], entretanto, a partir dos resultados encontrados, entende-se que o rimonabanto (um bloqueador CB1) pode até atenuar certas respostas de congelamento ou não ter efeito na fase inicial do comportamento aversivo. Isso significa que, embora o bloqueio dos CB1 possa não tornar o aprendizado do medo inicial mais intenso, ele faz com que as respostas de medo (como o congelamento) durem mais tempo e sejam mais difíceis de extinguir[21].

Em relação aos testes nocivos, a injeção de formalina foi o mais utilizado, presente em 42,3% dos estudos. Assim, os resultados apontam que a ativação dos receptores CB1 por endocanabinóides suprime as respostas comportamentais à dor induzida por formalina. Essa resposta é observada quando realizado o bloqueio dos receptores CB1, que não melhora o comportamento de dor induzida por formalina, e quando administrados canabinóides exógenos ou intensificadores da sinalização endocanabinoide, há redução dos comportamentos de dor no teste de formalina[22].

No entanto, é crucial destacar que no estudo de Roche e colaboradores et al 2010, o bloqueio do receptor CB1 com rimonabanto reduziu o comportamento nociceptivo evocado por formalina em ratos não condicionados pelo medo, quando administrado, localmente, na amígdala basolateral (BLA). Este é um achado que, apesar de contraditório à premissa de que o CB1 suprime a dor, pois o bloqueio normalmente anularia essa supressão ou aumentaria a dor; pode ser explicado, segundo os autores, pela ação do rimonabanto em alvos alternativos ao CB1, como o GPR55, ou que a modulação da dor pelo sistema endocanabinoide na BLA é dependente do contexto emocional (presença ou ausência de medo condicionado)[23].

Nesse sentido, foram observadas as combinações de testes aversivos e nociceptivos os quais apresentavam participação ou não do sistema endocanabinóide, dispostos no quadro 2. Oito (n=08) artigos apresentaram a combinação dos testes de choque nas patas + formalina, desses, apenas um (n=01) não apresentou envolvimento do sistema endocanabinóide, o qual foi citado no parágrafo anterior. Logo, o papel da BLA e a atividade de outras vias são algumas hipóteses da diferença na análise desse estudo.

Ainda observando o quadro 2, determinadas combinações de estímulos e testes produziram resultados mais consistentes. Seis (n=06) artigos trouxeram a associação entre choque nas patas e o teste de retirada da cauda resultou em uma antinocicepção profunda, induzida por choques elétricos breves e contínuos aplicados nas patas de ratos. Esse efeito foi completamente abolido pela administração do antagonista do receptor CB1, rimonabanto, mas não pelo antagonista opióide naltrexona, indicando um envolvimento fundamental do sistema endocanabinoide na analgesia induzida por estresse (SIA) de natureza não-opioide [24,25].

A combinação entre estresse de contenção e o teste de placa quente (n=03 artigos), indicaram que a contenção por 30 minutos aumentou a latência no teste da placa quente, efeito mimetizado pela administração de WIN 55,212-2 (agonista CB1) e bloqueado por AM251 (antagonista CB1) e SB 334867, antagonista de receptores do neuropeptídeo orexina (OX1), mas não por antagonistas opióides ou OX2. Esses dados indicam que, nesse caso, a SIA foi mediada predominantemente por endocanabinóides na vLPAG, modulada por receptores OX1, sem envolvimento do sistema opióide [26, 27]. Por outro lado, outro estudo utilizando contenção por 30 e 60 minutos demonstrou que a analgesia térmica foi abolida por naltrexona, antagonista opióide, mas não por AM281 (antagonista CB1), apontando os opióides endógenos como principais mediadores.

No entanto, nesse mesmo estudo, curiosamente, ao inibir a degradação de endocanabinóides com JZL195, foi possível restaurar a analgesia mesmo na presença de bloqueio opióide, além de recrutar efeitos analgésicos diante de um estresse sub mínimo (15 min)[28]. Essa comparação revela que o sistema endocanabinoide pode atuar tanto como mediador principal quanto como via compensatória, a depender do modelo experimental, do tempo de estresse e da integridade das vias opióides. Tais achados ressaltam a plasticidade funcional do sistema endocanabinoide e sua capacidade de modular a dor em contextos emocionais distintos.

Apesar de diversos estudos demonstrarem o envolvimento do sistema endocanabinoide na analgesia induzida por estresse ou medo, algumas combinações experimentais não produziram efeitos antinociceptivos significativos. O estresse de imobilização (único ou repetido), acompanhado pelo teste de formalina, não causou quaisquer alterações na expressão dos receptores opióides (μ , δ , κ) e canabinóides (CB1, CB2) nas regiões do mesencéfalo ou hipocampo. Isso indica que a analgesia induzida por estresse nessas condições não é mediada por alterações na expressão desses receptores. Além disso, o estresse de imobilização não afetou os efeitos antinociceptivos da morfina e do WIN55,212-2. [29]. Também foi identificada que a administração intra-BLA de rimonabanto não teve efeito no comportamento nociceptivo evocado por formalina em ratos condicionados ao nado forçado, segundo o quadro.

A partir da identificação dos testes utilizados para avaliar a antinocicepção induzida por estressores e testes nociceptivos, revelou-se a necessidade de estudar as vias de administração e compreender quais intervenções farmacológicas foram empregadas para modular essas respostas. Desse modo, através do quadro 3 pode-se inferir que dentre os fármacos agonistas, o mais utilizado foi o WIN55,212-2/ variantes e o antagonista foi o AM251. A administração sistêmica de agonistas canabinóides ou sua microinjeção em regiões cerebrais como a amígdala, substância cinzenta periaquedutal (PAG) ou medula ventromedial rostral (RVM) é antinociceptiva em testes como o de retirada da cauda e formalina[12]. O WIN 55.212-2 (um agonista específico de CB1) demonstrou reduzir significativamente as respostas nociceptivas

após uma injeção de formalina [30]. Ele também produziu antinocicepção mais potente em camundongos com alta analgesia (HA) em testes como o da placa quente [31].

Além disso, o tratamento com WIN 55.212-2 induziu um efeito antinociceptivo [30]. A microinjeção bilateral de 2-araquidonoil glicerol (2-AG), um endocanabinóide, no hipocampo ventral (vHip) reduziu o comportamento nociceptivo evocado por formalina em ratos não condicionados pelo medo [32]. Ademais, inibidores de enzimas que degradam os endocanabinoides, como a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a monoacilglicerol lipase (MAGL), são eficazes: o URB597 (inibidor da FAAH) aumenta os níveis do endocanabinóide anandamida (AEA), e reduz o comportamento nociceptivo evocado por formalina em ratos [33]. A inibição da FAAH no vHip melhorou significativamente a analgesia condicionada pelo medo (FCA) [31].

O JZL195 (inibidor duplo da FAAH/MAGL) provocou analgesia induzida por estresse nos testes de placa quente e plantar de Hargreaves mesmo quando a sinalização opioide endógena foi bloqueada pela naltrexona [28]. O URB602 (inibidor de MAGL) administrado através de microinjeção em regiões como a PAG aumentou a antinocicepção induzida por estresse[24]. Estudos mostram que o bloqueio dos receptores CB1 atenua ou previne a antinocicepção induzida por medo/ansiedade . Isso significa que o sistema endocanabinóide endógeno está ativamente envolvido na mediação dessa analgesia[21,24,28,34,35].

A administração sistêmica de rimonabanto aboliu a analgesia induzida por estresse (SIA) não opioide [24], e sua microinjeção no RVM ou PAG suprimiu essa antinocicepção de estresse [36]. Além dos fármacos diretamente associados aos receptores canabinóides, alguns estudos incluíram substâncias que modulam indiretamente a atividade do sistema endocanabinóide. Um exemplo é o antagonista do receptor PTH2R, HYWH, administrado por via intracerebroventricular. A utilização desse composto evidenciou a participação da via TIP39/PTH2R como um possível regulador negativo da analgesia induzida por estresse. Em camundongos geneticamente modificados (TIP39-KO e PTH2R-KO), observou-se aumento significativo da antinocicepção nos testes da placa quente e da formalina. De forma semelhante, a infusão de HYWH em animais não modificados resultou em intensificação da resposta analgésica, sugerindo que a inibição dessa via potencializa os efeitos analgésicos mediados pelos canabinóides endógenos.[37]

Em conjunto com esses achados, o sistema endocanabinóide também participa de cascatas bioquímicas que envolvem mediadores como neuropeptídeo S, orexinas, substância P e glutamato (via mGlu5Rs), bem como vias serotoninérgicas descendentes, com destaque para os receptores 5-HT7 localizados na medula espinhal [28].

Como mencionado, as evidências indicam que as respostas estão intimamente ligadas às vias de administração adotadas nos estudos, relatadas no quadro 4, que variam entre aplicações sistêmicas e microinjeções em regiões cerebrais específicas (intracerebral, intra-PAG, intra-RVM, intra-vHip, intra-BLA, intratecal). Por exemplo, o AM251 foi administrado tanto sistematicamente (ip) quanto localmente no RVM para comparar seus efeitos na modulação da dor [38]. Nesse sentido, a principal diferença observada foi que, nos experimentos diretos, nem a administração sistêmica nem a administração local (intra-RVM) de AM251 isoladamente produziram um efeito direto significativo na nocicepção evocada por formalina. Contudo, a administração local de AM251 no RVM demonstrou ter um papel modulador importante ao bloquear a analgesia induzida por outro composto (URB597), sublinhando a importância dos receptores CB1 no RVM para essa via específica de antinocicepção. Outro exemplo é a microinjeção intra-PAG para inibidores da FAAH: a

microinjeção de AA-5-HT no PAG dorsolateral induziu um aumento mais robusto da analgesia induzida por estresse em comparação com a administração sistêmica de outro inibidor da FAAH (PTK) [29,36].

Além disso, inibidores da FAAH (URB597) e da MAGL (URB602) administrados via microinjeção na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo aumentaram a SIA, enquanto a mesma dose administrada no núcleo basolateral da amígdala (BLA) não alterou a SIA, sugerindo a superioridade do PAG para esses efeitos [29,39]. Nesse sentido, a medula ventromedial rostral (RVM), integrante da via descendente inibitória da dor, interage funcionalmente com o sistema endocanabinóide, e alterações em sua sinalização podem contribuir para uma resposta exacerbada a estímulos nocivos, especialmente em função de variações genéticas[38]. A amígdala, incluindo os núcleos basolateral (BLA) e central (CeA), também está envolvida nesse processo, particularmente no que diz respeito ao componente emocional da dor e do medo [39]. O ACC, em especial, está fortemente relacionado aos componentes afetivos tanto da dor quanto do medo [40].

Quando micro injetados na PAG, o uso de URB597 e URB602 aumenta a SIA, eles não alteraram a SIA quando micro injetados nas regiões da amígdala (BLA ou CeA) [39]. Isso sugere que a contribuição dos endocanabinoides para a SIA nessas regiões da amígdala é limitada ou inexistente sob essas condições. Também na PAG, a ativação do receptor CB1 com ACEA não aumentou a antinocicepção induzida por NMDA no teste de movimento da cauda. Embora tenha inibido o congelamento (uma resposta de medo), não houve interação cooperativa entre os receptores CB1 e mu-opiídeos para a antinocicepção neste modelo [30]

Ainda sob a administração intra-BLA, outro artigo revela que o rimonabanto não teve efeito no comportamento nociceptivo [41]. Esta é uma aparente contradição com outros estudos que mostram que o bloqueio do CB1 na PAG ou RVM atenua a FCA [35]. A mesma fonte menciona que o rimonabanto intra-BLA reduz a atenuação do comportamento aversivo condicionado, que pode implicar um efeito paradoxal sobre a dor [41]. A microinjeção intra-ACC de AM251 (sozinho ou em combinação com URB597) não teve efeito significativo na duração do congelamento (comportamento de medo) ou no comportamento nociceptivo evocado por formalina em ratos, tanto não condicionados quanto condicionados pelo medo. Isso sugere que, para o ACC, a sinalização via CB1 pode não ser o principal modulador da dor ou do medo nesse contexto [23].

Conclusão

O sistema endocanabinóide exerce um papel importante na mediação da analgesia induzida por estresse e medo (SIA/FCA). Em resposta a estímulos estressores, ocorre frequentemente a mobilização de endocanabinoides endógenos, como o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e a anandamida (AEA). Diversos estudos demonstram que os receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) são mediadores cruciais da SIA, sobretudo na substância cinzenta periaquedutal (PAG), uma região-chave para o processamento da dor. O bulbo ventromedial rostral (RVM), o hipocampo ventral (vHip), o córtex pré-frontal medial (mPFC) e suas sub-regiões infralímbica (IL), pré-límbica (PrL) e cingulada anterior (ACC) também desempenham papéis específicos na regulação da SIA/FCA.

Identificou-se que a relação com o sistema opióide é sinérgica: em alguns contextos, os opioides são suficientes para promover a SIA, enquanto em outros, a participação dos

canabinóides é essencial ou atua como compensação à sinalização opióide deficiente. Os testes aversivos como: estresse de restrição/imobilização/contenção, estresse de natação forçada, medo condicionado, choque nas patas e estresse crônico imprevisível contaram com o envolvimento do sistema endocanabinóide. Bem como os testes nociceptivos, teste de formalina, teste de retirada da cauda e teste da placa quente. Portanto, os achados revelam a complexidade e a plasticidade do sistema endocanabinóide frente ao processo de antinocicepção após um evento aversivo.

Referências

1. DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England), 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. DHOLLANDE, S. et al. Conducting integrative reviews: a guide for novice nursing researchers. *Journal of Research in Nursing*, v. 26, n. 5, p. 427–438, ago. 2021.
17. MOHAMED, H.; SALSBERG, J.; KELLY, D. An integrative review protocol on interventions to improve users' ability to identify trustworthy online health information. *PLoS ONE*, v. 18, n. 4, p. e0284028–e0284028, 6 abr. 2023.
18. OERMANN, M. H.; KNAFL, K. A. Strategies for completing a successful integrative review. *Nurse Author & Editor*, v. 31, n. 3-4, p. 65–68, dez. 2021.
19. REICH, C. G.; MOHAMMADI, M. H.; ALGER, B. E. Endocannabinoid modulation of fear responses: learning and state-dependent performance effects. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, v. 22, n. 7, p. 769–777, 2008.
20. NAVARRETE, F. et al. Endocannabinoid System Components as Potential Biomarkers in Psychiatry. *Frontiers in Psychiatry*, v. 11, 27 abr. 2020.
21. FINN, D. P. et al. Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fear-conditioned analgesia by CB1 receptors. *The European journal of neuroscience*, v. 20, n. 3, p. 848–852, 2004.
22. BEAULIEU, P. et al. Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *European journal of pharmacology*, v. 396, n. 2–3, p. 85–92, 2000.
23. CORCORAN, L. et al. Attenuation of fear-conditioned analgesia in rats by monoacylglycerol lipase inhibition in the anterior cingulate cortex: Potential role for CB2 receptors. *British journal of pharmacology*, v. 177, n. 10, p. 2240–2255, 2020.
24. HOHMANN, A. G. et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, v. 435, n. 7045, p. 1108–1112, 2005.
25. KURRIKOFF, K. et al. Stress-induced analgesia in mice: evidence for interaction between endocannabinoids and cholecystokinin. *The European journal of neuroscience*, v. 27, n. 8, p. 2147–2155, 2008.
26. LEE, M. T. et al. Neuropeptide S-initiated sequential cascade mediated by OX1, NK1, mGlu5 and CB1 receptors: a pivotal role in stress-induced analgesia. *Journal of biomedical science*, v. 27, n. 1, p. 7, 2020.

27. LEE, H.-J. et al. Stress induces analgesia via orexin 1 receptor-initiated endocannabinoid/CB1 signaling in the mouse periaqueductal gray. *Neuropharmacology*, v. 105, p. 577–586, 2016.
28. ATWAL, N.; WINTERS, B. L.; VAUGHAN, C. W. Endogenous cannabinoid modulation of restraint stress-induced analgesia in thermal nociception. *Journal of neurochemistry*, v. 152, n. 1, p. 92–102, 2020.
29. SEO, Y.-J. et al. Differential cross-tolerance development between single and repeated immobilization stress on the antinociceptive effect induced by β -endorphin, 5-hydroxytryptamine, morphine, and WIN55,212-2 in the inflammatory mouse pain mode. *Archives of pharmacal research*, v. 34, n. 2, p. 269–280, 2011.
30. GODOI, M. M. et al. Mu-opioid and CB1 cannabinoid receptors of the dorsal periaqueductal gray interplay in the regulation of fear response, but not antinociception. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 194, n. 172938, p. 172938, 2020.
31. LESNIAK, A. et al. Divergent response to cannabinoid receptor stimulation in high and low stress-induced analgesia mouse lines is associated with differential G-protein activation. *Neuroscience*, v. 404, p. 246–258, 2019.
32. REA, K. et al. Microinjection of 2-arachidonoyl glycerol into the rat ventral hippocampus differentially modulates contextually induced fear, depending on a persistent pain state. *The European journal of neuroscience*, v. 39, n. 3, p. 435–443, 2014.
33. BUTLER, R. K. et al. Fear-induced suppression of nociceptive behaviour and activation of Akt signalling in the rat periaqueductal grey: role of fatty acid amide hydrolase. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, v. 26, n. 1, p. 83–91, 2012.
34. FORD, G. K. et al. A role for the ventral hippocampal endocannabinoid system in fear-conditioned analgesia and fear responding in the presence of nociceptive tone in rats. *Pain*, v. 152, n. 11, p. 2495–2504, 2011.
35. OLANGO, W. M. et al. The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone: Endocannabinoids, PAG and conditional analgesia. *British journal of pharmacology*, v. 165, n. 8, p. 2549–2560, 2012.
36. SUPLITA, R. L., 2nd et al. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology*, v. 49, n. 8, p. 1201–1209, 2005.
37. DIMITROV, E. L.; PETRUS, E.; USDIN, T. B. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) signaling modulates acute and tonic nociception. *Experimental neurology*, v. 226, n. 1, p. 68–83, 2010.
38. REA, K. et al. Impaired endocannabinoid signalling in the rostral ventromedial medulla underpins genotype-dependent hyper-responsivity to noxious stimuli. *Pain*, v. 155, n. 1, p. 69–79, 2014b.
39. CONNELL, K. et al. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in endocannabinoid-mediated stress-induced analgesia. *Neuroscience letters*, v. 397, n. 3, p. 180–184, 2006.

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- Autor, ano de publicação, objetivo do estudo e envolvimento do sistema endocanabinóide

Quadro 2- Dados das combinações de testes aversivos e nociceptivos, sua frequência nos estudos e os efeitos encontrados.

Quadro 3- Dados dos fármacos utilizados, o que são, sua frequência nos estudos e o intervalo de dose

Quadro 4- Dados sobre as regiões cerebrais e os efeitos observados

CÓDIGO: SB0377

AUTOR: EMILLY RIBEIRO DE SOUZA OLIVEIRA

COAUTOR: EDUARDA OLIVEIRA DE SOUZA

COAUTOR: JASON CAYUÃ AGUIAR DE SOUZA

COAUTOR: FELIPE ALEXANDRE CORDEIRO FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE FADIGAS DE SOUZA

TÍTULO: Identidade interna das Florestas Tropicais Sazonalmente Secas: uma revisão de literatura

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

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

A Tipologia Global de Ecossistemas da IUCN (IUCN, 2020; Keith et al., 2022) é uma classificação criada como base para 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 definição e a descrição clara dos tipos de ecossistemas são essenciais para a avaliação da Lista Vermelha de Ecossistemas, para planejamento da restauração, avaliação de serviços ecossistêmicos entre outras aplicações teóricas e aplicadas (KEITH 2024). A expressão Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTSS) corresponde a um termo guarda-chuva que inclui diferentes tipos de vegetação sazonal (Pennington 2009, Linares-Palomino 2011). As FTSS são fisionomicamente muito variáveis, indo desde arbustal de cactos (cactus scrub) e matas espinhosas (thorn woodland) até florestas estacionais semidecíduas (Beard 1944, 1955, Murphy e Lugo 1986, Mooney 1995, Linares-Palomino 2011, Faber-Langendoen et al. 2014, Navarro e Molina 2021).

Entre os grupos funcionais presentes neste nível da Tipologia estão as florestas tropicais/subtropicais secas e thickets (grupo T1.2), os arbustais tropicais sazonalmente secos (grupo T3.1) e os arbustais e campos costeiros (grupo MT2.1). O uso de termos amplos como FTSS e arbustais secos pode levar pesquisadores e conservacionistas a não dar atenção às características distintas desses ecossistemas, como diversidade funcional, taxonômica e evolutiva, podendo haver perdas de conhecimento, impossibilitando práticas de conservação e manejo. Entre estes ecossistemas negligenciados, e que têm recebido diferentes denominações e graus de atenção em vários sistemas de classificação da vegetação (e.g., Torello-Raventos et al. 2013, Faber-Langendoen et al. 2014, Navarro e Molina 2021) estão

as florestas sazonais semidecíduas, sazonais decíduas, matas espinhosas e arbustais com cactos (Beard 1944, 1955).

Alguns trabalhos que estudaram as FTSS evidenciaram informações importantes acerca do grau de endemismo considerável e estado de conservação ameaçado desses ecossistemas (Hasnat e Hossain, 2020), diversidade de tipos de vegetação encontrados nas FTSS (Queiroz et al. 2017), e a importância das FTSS para a subsistência humana e a mitigação do aquecimento global, assim como a menor atenção que estes ecossistemas têm recebido da comunidade científica (Siyum 2020). Essas revisões, por um lado, reconheceram que o termo FTSS é classificado como termo guarda-chuva e engloba diversos ecossistemas (Pennington 2009, Pulla et al. 2015, Queiroz et al. 2017, Hasnat e Hossain 2020), por outro, trataram as FTSS como uma unidade de análise sem considerar as diferenças entre os ecossistemas constituintes. Mas em alguns momentos, os autores mencionaram aspectos das FTSS que indicaram diferenças importantes entre os ecossistemas abrigados sob esse título.

Neste trabalho temos como objetivo geral avaliar a coerência interna do conceito de FTSS como classe de ecossistema. Mais especificamente buscamos responder a pergunta: A produção científica tem discriminado e estudado os tipos de ecossistemas existentes dentro da classe FTSS?

Metodologia

Foi realizada uma revisão sistemática sem data inicial e terminando em 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 ecossistemas estudados, incluindo 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 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. Um total de 1000 destas referências foram escolhidas aleatoriamente como aptas para serem avaliadas para inclusão ou não na revisão. Estas 1000 referências foram revisadas sequencialmente até que se completassem 500 artigos incluídos na base de dados final.

Com base em uma leitura do título, do abstract, figuras e tabelas, estão sendo 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. Estão sendo 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 inferência filogenética sem relação com algum ecossistema local. Trabalhos de biogeografia histórica e modelagem de nicho só estão sendo incluídos se o objeto do estudo foi o ecossistema de floresta sazonalmente seca ou espécies indicadoras deste grupo de ecossistemas e não espécies ou grupos taxonômicos isoladamente. Textos não relacionados, duplicados, indisponíveis, artigos apenas com resumo e panfletos também não estão sendo incluídos. Trabalhos feitos ao longo de gradientes sucessionais estão sendo avaliados no que se refere às áreas controle utilizadas.

Os trabalhos estão sendo classificados entre aqueles que discriminam ou não entre os quatro tipos específicos de ecossistemas tropicais sazonalmente secos não savânicos: florestas semidecíduas, florestas decíduas latifoliadas, florestas rigidifoliadas ou arbustais. Apesar de não serem ecossistemas florestais, os arbustais serão 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; Suárez; Laborde, 2019). Quando o tipo de ecossistema não foi claramente identificado pelo nome, buscamos na descrição da área de estudo e da coleta dos dados se era possível identificar o tipo de ecossistema pela descrição da vegetação. Termos como thorn, spiny e xeric ou xeromorfa, bem como scrub forest foram tomados como indicadores de floresta rigidifoliada. Termos como scrub, shrubland ou matorral estão sendo tomados como indicadores de arbustais. Florestas descritas como subdecíduas serão 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.

Resultados e Discussões

A busca inicial nas duas bases de dados resultou em 16600 itens encontrados. Após a remoção de duplicatas, restaram 9200 trabalhos únicos. Dessas referências encontradas, foram sorteadas 1000 de forma aleatória para serem analisadas e utilizadas ou não na revisão. Estas 1000 referências foram revisadas continuamente até que se completassem 500 trabalhos na base de dados final. 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. 1). Até o momento, foram avaliados 300 trabalhos de 500 do total. Os autores dos trabalhos avaliados até então se referiram à vegetação estudada com nomes e expressões diferentes, em sua maioria com nomes amplos como atlantic forest, nomes regionais como miombo woodland e caatinga e nomes de fisionomias como deciduous thorn vegetation.

É notório que a maioria dos autores desconhece a classificação da fisionomia da vegetação ou não sabe utilizá-la com segurança. Mesmo quando algumas características da vegetação são informadas, o tipo de ecossistema muitas vezes não é claramente definido. Um exemplo é a descrição da vegetação da área de estudo como floresta tropical seca decídua (González-Salvatierra et al., 2021), o que deixa em aberto se o ecossistema é uma floresta seca decídua latifoliada ou uma floresta seca rigidifoliada, que também é decídua porém tem outras características como abundância de espinhos, caules retorcidos e abundância de suculentas.

Em outros casos, o termo florestas secas tropicais parece ser usado de forma mais restrita para a floresta decídua, fazendo um contraste com a thorn woodland, por exemplo (Dick e Wright, 2005). O termo thickets por exemplo costuma se referir a vegetação decídua com alta densidade de árvores finas, mas em Madagascar a ecorregião Ericoid Thickets se refere a arbustais montanos (Frappier-Brinton e Lehman, 2022). Isso torna as florestas decíduas e as florestas rigidifoliadas os dois subtipos menos claramente diferenciados das FTSS, sendo muitas vezes referidas apenas como florestas decíduas (e.g., Toledo-Aceves e García-Oliva, 2007). Em outros casos, a vegetação é descrita como arbustal e como floresta aberta (woodland) como termos equivalentes (e.g., Vogel et al., 2023).

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 ecossistemas (e.g., J. Southworth, 2004).

Conclusão

Até o momento foram analisados 300 trabalhos e foi possível observar que grande número dos trabalhos encontrados não diferenciam entre os tipos de floresta seca, agrupando-as no termo FTSS que é um termo guarda-chuva. Podemos observar que houve aumento no interesse no estudo das FTSS, mas muito conhecimento gerado em diferentes tipos de florestas secas têm perdido especificidade por não identificar para que tipo de ecossistema aquele conhecimento está sendo gerado. A diferenciação das florestas que compõem o termo FTSS é muito importante para a implementação de diferentes práticas e geração de conhecimento para a dinâmica do ecossistema como conservação, manejo e produção primária entre outros, já que cada uma possui sua biodiversidade e características próprias. Então, é de suma prioridade que trabalhos futuros diferenciem as florestas secas contidas no termo FTSS deixando claro suas características fisionômicas e componentes bióticos, além de utilizar os nomes já definidos pela literatura para cada ecossistema.

Referências

- BEARD, J. S. Climax vegetation in tropical America. *Ecology*, [S.l.], v. 25, n. 2, p. 127–158, 1944.
- BEARD, J. S. The classification of tropical American vegetation-types. *Ecology*, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 89–100, jan. 1955.

CAMPOS, A.; SUÁREZ, G.; LABORDE, J. Analyzing vegetation cover-induced organic matter mineralization dynamics in sandy soils from tropical dry coastal ecosystems. *Catena*, v. 185, dez. 2019. DOI: 10.1016/j.catena.2019.104264.

DICK, C. W.; WRIGHT, S. J. Tropical mountain cradles of dry forest diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S.l.], v. 102, n. 31, p. 10757–10758, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0505013102.

FABER-LANGENDOEN, D. et al. EcoVeg: a new approach to vegetation description and classification. *Ecological Monographs*, v. 84, n. 4, p. 533–561, 2014. DOI: 10.1890/13-2334.1.

FERRER-PARIS, J. R. et al. An ecosystem risk assessment of temperate and tropical forests of the Americas with an outlook on future conservation strategies. *Conservation Letters*, [S.l.], v. 12, n. 2, e12623, 2019.

FRAPPIER-BRINTON, T.; LEHMAN, S. M. The burning island: spatiotemporal patterns of fire occurrence in Madagascar. *PLoS ONE*, [S.l.], v. 17, n. 3, e0263313, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0263313.

GONZÁLEZ-SALVATIERRA, C.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M.; REYES-GARCÍA, C.; DE LA BARRERA, E.; ANDRADE, J. L. Cambios estacionales en la fotosíntesis de la bromeliácea epífita *Tillandsia brachycaulos* en una selva baja caducifolia. *Botanical Sciences*, [S.l.], v. 99, n. 4, p. 850–862, 2021. DOI: 10.17129/botsci.2842.

HASNAT, G. N. T.; HOSSAIN, M. K. Global overview of tropical dry forests. In: SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, J. C. (ed.). *Handbook of research on the conservation and restoration of tropical dry forests*. Hershey, PA: IGI Global, 2020. p. 1–23. DOI: 10.4018/978-1-7998-0014-9.ch001.

KEITH, D. A. et al. A function-based typology for Earth's ecosystems. *Nature*, [S.l.], v. 610, p. 513–518, 2022.

LINARES-PALOMINO, R.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; PENNINGTON, R. T. Neotropical seasonally dry forests: diversity, endemism, and biogeography of woody plants. In: DIRZO, R. (ed.). *Seasonally dry tropical forests*. Washington, DC: Island Press/Center for Resource Economics, 2011. p. 3–21.

MOONEY, H. A.; BULLOCK, S. H.; MEDINA, E. (ed.). *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 1–6. (Introduction).

MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, [S.l.], v. 17, p. 67–88, 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, 2021. DOI: 10.3897/VCS/2021/64759.

NOH, J. K. et al. Warning about conservation status of forest ecosystems in tropical Andes: national assessment based on IUCN criteria. *PLoS ONE*, [S.l.], v. 15, n. 8, e0237877, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0237877.

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*, v. 96, n. 6, p. 000–000, 2021. DOI: 10.1111/brv.12721.

PAN, Y. et al. The enduring world forest carbon sink. *Nature*, London, v. 631, p. 563–569, 2024. DOI: 10.1038/s41586-024-07602-x.

PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M.; OLIVEIRA FILHO, A. T. Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, [S.l.], v. 40, p. 437–457, 2009.

PULLA, S. et al. Assessing the resilience of global seasonally dry tropical forests. *International Forestry Review*, v. 17, n. S2, p. 91–113, 2015. DOI: 10.1505/146554815817476850.

QUEIROZ, L. P. 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. DOI: 10.1007/978-3-319-68339-3_2.

SILVA, J. L. A.; SOUZA, A. F.; VITÓRIA, A. P. Mapping functional tree regions of the Atlantic Forest: how much is left and opportunities for conservation. *Environmental Conservation*, [S.l.], v. 49, n. 3, p. 164–171, 2022. DOI: 10.1017/S0376892922000212.

SIYUM, Z. G. Tropical dry forest dynamics in the context of climate change: syntheses of drivers, gaps, and management perspectives. *Ecological Processes*, v. 9, n. 25, 2020. DOI: 10.1186/s13717-020-00229-6.

SOUTHWORTH, J. An assessment of Landsat TM band 6 thermal data for analysing land cover in tropical dry forest regions. *International Journal of Remote Sensing*, v. 25, n. 4, p. 689–706, fev. 2004. DOI: 10.1080/0143116031000139917.

TOLEDO-ACEVES, T.; GARCÍA-OLIVA, F. Effects of forest-pasture edge on C, N and P associated with *Caesalpinia eriostachys*, a dominant tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. *Ecological Research*, v. 23, n. 2, p. 271–280, abr. 2007. DOI: 10.1007/s11284-007-0373-0.

TORELLO-RAVENTOS, M. et al. On the delineation of tropical vegetation types with an emphasis on forest/savanna transitions. *Plant Ecology & Diversity*, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 101–137, 2013. DOI: 10.1080/17550874.2012.762812.

VOGEL, C. et al. The importance of shrubland and local agroecological practices for pumpkin production in sub-Saharan smallholdings. *Basic and Applied Ecology*, [S.l.], v. 73, p. 51–61, 2023. DOI: 10.1016/j.baae.2023.10.004.

CÓDIGO: SB0390

AUTOR: ROSANE DUARTE DE LIMA

COAUTOR: VIVIANE AURORA MACEDO DE OLIVEIRA

COAUTOR: HELLEN HEMILLY OLIVEIRA PEREIRA

ORIENTADOR: RENATA GONCALVES FERREIRA

TÍTULO: REABILITAÇÃO MANIPULATIVA DE MACACOS-PREGO (*SAPAJUS* spp)
CATIVOS NO CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES/IBAMA EM
NANTAL RN

Resumo

O cativeiro é uma situação de estresse para os animais e está associada ao aumento de comportamentos estereotipados e à redução de comportamentos naturais. O enriquecimento ambiental que promova a exploração ativa e capacidade cognitiva é fundamental para potencialização do bem-estar e reabilitação antes do retorno à natureza. Neste estudo analisamos o comportamento manipulativo de 35 macacos-prego (*Sapajus* spp.) cativos no CETAS-IBAMA durante sessões de reabilitação envolvendo a quebra de sementes com pedras. O delineamento experimental envolveu 2 fases: linha de base com 4 semanas, seguida pelo protocolo reabilitação manipulativa com 12 sessões em dias intercalados. A coleta de dados combinou amostragem por varredura a cada 2 minutos durante 20 minutos e registros comportamentais a cada 30 segundos. Análises de variância mostram que as fêmeas manipularam mais que os machos e os juvenis apresentaram maior frequência de manipulação que os adultos. Quanto ao sucesso nas tarefas, os machos tiveram melhor desempenho que as fêmeas, enquanto os juvenis foram menos eficazes que os adultos. A reabilitação mostrou-se eficaz na redução de comportamentos estereotipados. Esses resultados reforçam a importância de práticas manipulativas e enriquecimento ambiental em cativeiro, demonstrando que intervenções estruturadas podem contribuir significativamente para a saúde comportamental e cognitiva de macacos-prego, além de fornecer subsídios importantes para programas de reabilitação e manejo.

Palavras-chave: Reabilitação. Habilidades Cognitivas. Primatas Cativos.

TITLE: Rehabilitation of Manipulative Behaviors in Captive Capuchin Monkeys (*Sapajus* spp.) at the Wildlife Screening Center (CETAS/IBAMA) in Natal, RN

Abstract

Captivity is a stressful condition for animals and is associated with an increase in stereotypic behaviors and a reduction in natural behaviors. Environmental enrichment that promotes active exploration and cognitive ability is essential for enhancing well-being and rehabilitation prior to release into the wild. In this study, we analyzed the manipulative behavior of 35 captive capuchin monkeys (*Sapajus* spp.) at CETAS-IBAMA during

rehabilitation sessions involving seed cracking with stones. The experimental design consisted of two phases: a 4-week baseline, followed by a manipulative rehabilitation protocol with 12 sessions on alternate days. Data collection combined scan sampling every 2 minutes for 20 minutes with behavioral recordings every 30 seconds. Analysis of variance showed that females manipulated more than males, and juveniles exhibited higher manipulation frequency than adults. Regarding task success, males outperformed females, while juveniles were less effective than adults. Rehabilitation proved effective in reducing stereotypic behaviors and increasing species-typical behaviors. These results reinforce the importance of manipulative practices and environmental enrichment in captivity, demonstrating that structured interventions can significantly contribute to the behavioral and cognitive health of capuchin monkeys, as well as provide valuable support for rehabilitation and management programs in conservation and rescue centers.

Keywords: Rehabilitation. Cognitive Abilities. Captive Primates.

Introdução

No Brasil, cerca de 35% das espécies de primatas estão ameaçadas de extinção, tornando ações de manejo e reintrodução essenciais para a conservação (ESTRADA et al., 2022 apud AURORA, 2025). A reabilitação de primatas em cativeiro é fundamental para seu retorno ao habitat natural, especialmente em centros de triagem como o do IBAMA em Natal-RN (GUY; CURNOE; BANKS, 2014). Entre eles, os *Sapajus* spp., ou macacos-prego, são o segundo gênero mais comum em CETAS, perdendo apenas para os calitriquídeos. Esses primatas destacam-se pela elevada capacidade cognitiva, mas também pela sensibilidade a intervenções em cativeiro, exigindo abordagens específicas de reabilitação (FALÓTICO et al., 2018). Diretrizes do IUCN/SSC indicam que a reintrodução requer avaliações de saúde, compatibilidade genética e recuperação de repertórios comportamentais essenciais à sobrevivência (MITTMANN et al., 2021).

Na natureza, macacos-prego apresentam comportamentos manipulativos, como o uso de ferramentas e a exploração de recursos, adquiridos ao longo da vida e influenciados pela aprendizagem social (WHITEN & VAN DE WAAL, 2018). Muitos, entretanto, chegam aos centros de triagem com histórico de cativeiro prolongado, apresentando déficits na expressão de comportamentos naturais (MALLAPUR; CHOUDHURY, 2003). Nesses casos, intervenções específicas tornam-se necessárias para restaurar tais habilidades e aumentar as chances de sucesso na reintrodução (READING; MILLER; SHEPHERDSON, 2013). Animais liberados sem essas competências dificilmente sobrevivem, o que torna o treinamento pré-soltura etapa vital (SWAISGOOD, 2010; TEIXEIRA et al., 2018). No CETAS/IBAMA de Natal-RN, a reabilitação manipulativa busca recuperar gradualmente a autonomia dos macacos-prego, visando à soltura ou transferência para instituições de manejo adequadas.

Este trabalho busca explorar as estratégias de reabilitação manipulativa aplicadas aos *Sapajus* spp. no CETAS/IBAMA de Natal, avaliando os aspectos práticos envolvidos no processo de readaptação desses primatas ao seu ambiente natural, através do uso de enriquecimentos que visam a reabilitação desses animais, essenciais para o aperfeiçoamento das habilidades necessárias a natureza a serem adquiridas por esses indivíduos cativos, com o objetivo de proporcionar uma melhor qualidade de vida pós soltura (ALBANESE et al., 2021). Diversos fatores individuais e contextuais podem influenciar a expressão de comportamentos

manipulativos, bem como o sucesso em atividades de enriquecimento e reabilitação (READING; MILLER; SHEPHERDSON, 2013). Portanto, estratégias de enriquecimento que promovam manipulação e exploração ativa são indispensáveis à readaptação de *Sapajus spp.* em cativeiro, assegurando melhor qualidade de vida e maiores chances de sucesso pós-soltura (ALBANESE et al., 2021).

Considerando o papel do sexo e da idade, espera-se que fêmeas e indivíduos jovens apresentem maior quantidade e diversidade de comportamentos manipulativos direcionados ao alimento e ao enriquecimento, uma vez que tendem a ser mais exploratórios e engajados em interações com o ambiente (JIN et al., 2015).

Por outro lado, machos e indivíduos adultos podem atingir êxito mais rapidamente durante os treinos envolvendo o uso de pedras, devido a maior força física necessária para levantar as pedras (ROX et al., 2019).

Além disso, busca-se investigar se há correspondência entre diferentes contextos de manipulação, pressupondo que os comportamentos manipulativos observados durante atividades de reabilitação estejam correlacionados à manipulação espontânea registrada no período da tarde. Por fim, considera-se também a dimensão comportamental relacionada ao bem-estar, levantando a hipótese de que os indicadores de estresse apresentam correlação com a frequência das sessões, diminuindo gradualmente à medida que os animais se habituem ao processo.

Metodologia

A pesquisa foi conduzida pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), localizado no município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Este centro recebe, mantém e reabilita animais silvestres provenientes de apreensões, resgates ou entregas voluntárias. Na ocasião do estudo, o local abrigava 35 indivíduos de *Sapajus*, distribuídos em cinco recintos. Cada recinto apresentava dimensões aproximadas 5 m x 3 m x 3, oferecendo espaço adequado para a movimentação, interação social e realização das atividades propostas. A estrutura física de cada recinto incluía áreas com incidência direta de luz solar e zonas protegidas, permitindo aos animais escolherem livremente o seu posicionamento. A alimentação era fornecida duas vezes ao dia, geralmente às nove e às quatorze horas, podendo haver pequenas variações de horário. As divisórias entre recintos vizinhos eram constituídas por paredes de concreto, impedindo o contato físico entre indivíduos de grupos distintos. A face voltada para o corredor de observação possuía grades metálicas, possibilitando ampla visualização por parte dos pesquisadores sem contato direto com os animais, reduzindo o risco de interferência comportamental durante as observações.

O delineamento experimental foi estruturado em duas fases sequenciais e complementares: a fase de linha de base e a fase de reabilitação manipulativa. A primeira teve como objetivo registrar o repertório comportamental espontâneo dos indivíduos e teve duração de 4 semanas estabelecendo parâmetros iniciais para comparação com a fase seguinte. A fase de reabilitação consistiu na aplicação de 12 sessões controladas de enriquecimento ambiental e treino de habilidades manipulativas, implementadas de forma alternada entre grupos, evitando viés relacionado à ordem de apresentação dos estímulos. O protocolo de reabilitação foi estruturado para estimular a utilização de pedras para quebrar sementes de macaíba

(Acromia aculeata). O treino teve duração de 12 sessões e foram divididos em três fases: Fase 1 (sementes inteiras): Durante 6 sessões, os animais recebiam as sementes, e o objetivo principal era verificar se algum indivíduo já dominava a técnica. Fase 2 (Sementes parcialmente quebradas): Já na segunda fase, foram três sessões onde 25% das sementes eram fornecidas pré-quebradas para encorajar os animais a consumirem o conteúdo. Fase 3 (demonstração): Na terceira e última fase, foram mais três sessões, onde um pesquisador demonstrava a técnica de quebra na frente do recinto, utilizando uma bigorna e uma pedra menor para facilitar a aprendizagem por observação. Para o desenvolvimento do treino, foram adicionadas duas pedras grandes em cada recinto para servir de bigorna e uma pedra menor para cada animal. Em relação às sementes, em cada sessão de reabilitação foram fornecidas cinco sementes de macaíba por indivíduo. O tempo de observação durava 20 minutos com registros comportamentais a cada 30 segundos e o mesmo tempo foi utilizado para as coletas de linha de base, tendo início sempre no período da manhã, por volta das 9 horas.

A coleta de dados foi conduzida por meio do método de varredura, realizado em intervalos regulares, complementado por registros a cada 30 segundos durante as sessões de treino. Essa metodologia possibilitou padronizar a coleta, assegurando comparabilidade entre diferentes momentos e condições experimentais. Foram utilizados dois etogramas de estudo previamente validados. Etograma 1 que foi utilizado na fase de linha de base, que consistia em 78 comportamentos, dividido em habilidades manipulativas (8), interações sociais (37) e comportamentos indicativos de estresse (16). E o etograma 2, utilizado no protocolo de reabilitação, esse etograma possuía 31 comportamentos como as formas de bater a semente (bater 0, bater 1 e bater 2), manipular, alimentar-se e interações sociais. A análise focou em três categorias relacionadas à tarefa: Manipulação, que incluía cheirar, lambear, descascar e brincar; Alimentação, caracterizada pela ingestão do fruto e pela busca por fragmentos; e Bater (Hitting), subdividida com base no uso da ferramenta: bater 0 (bater a semente contra uma superfície), bater 1 (usar a pedra para bater na semente) e bater 2 (posicionar a semente em uma bigorna e usar outra pedra para golpeá-la).

O estudo seguiu rigorosamente os protocolos éticos aplicáveis à pesquisa com animais, respeitando as normas brasileiras para manejo de fauna silvestre em cativeiro. As observações foram realizadas à distância segura, sem contato físico e sem provocar mudanças bruscas no ambiente que pudessem influenciar negativamente o comportamento dos indivíduos. Os dados coletados foram submetidos a análises estatísticas apropriadas para verificar diferenças significativas entre as fases e entre os grupos, possibilitando interpretações consistentes sobre a eficácia das estratégias de reabilitação utilizadas. Para análise desses dados foi utilizado o programa R (R Development Core Team) através do R studio. Previamente às análises, os dados foram verificados quanto à normalidade usando os testes de shapiro e gráficos de Cullen-Frey. Para testar as hipóteses, foram usados modelos lineares generalizados mistos (GLMMs).

Resultados e Discussões

Em relação à manipulação, foi observado que as fêmeas manipularam mais do que os machos ($B = -5.228$, $T = -1.971$ $p = 0.0573$) e que os indivíduos juvenis apresentaram maior frequência de manipulação em comparação com os adultos. ($B = 9.408$, $T = 2.628$ $p = 0.0162$)

Esses resultados confirmam parcialmente a predição inicial e estão em consonância com estudos que apontam uma maior propensão exploratória em fêmeas e juvenis, que tendem a

interagir mais intensamente com o ambiente e com estímulos presentes (MAESTRIPIERI, 2005). No caso dos juvenis, esse padrão pode estar relacionado ao papel do aprendizado e da experimentação durante o desenvolvimento, enquanto nas fêmeas pode refletir estratégias adaptativas de exploração de recursos (JIN et al., 2015).

Quanto ao êxito nas tarefas, os resultados mostraram que os machos obtiveram maior sucesso do que as fêmeas, ($B = 1.169e+02$ $T = 50913.6$ $p < 2e-16$) enquanto os juvenis tiveram menor êxito em comparação aos adultos ($B = -9.221e-01$ $T = -414.7$ $p < 2e-16$). A maior taxa de êxito nos machos pode estar associada a diferenças de força física ou estratégias cognitivas distintas entre os sexos (ROX et al., 2019).

A predição que buscava relacionar manipulação em contexto de reabilitação e manipulação espontânea não pôde ser testada, uma vez que as análises não foram finalizadas. Apesar disso, a continuidade destes testes poderá contribuir futuramente para o entendimento dessa relação.

Por fim, observou-se que a reabilitação teve um efeito mais geral, uma vez que os animais passaram a apresentar menor frequência de comportamentos estereotipados. $B = -0,01565$, $t = -2,930$, $p = 0,004$).

Esse resultado reforça a importância da reabilitação e do enriquecimento ambiental para a recuperação comportamental e o bem-estar de primatas em cativeiro, corroborando evidências da literatura que destacam os efeitos positivos do manejo adequado sobre a qualidade de vida animal.

Conclusão

Com base nos resultados, pode-se concluir que a manipulação apresentou diferenças importantes entre sexo e idade, com fêmeas e juvenis exibindo maior propensão exploratória, o que sugere estratégias adaptativas e o papel do aprendizado no desenvolvimento. Já no êxito das tarefas, os machos e os adultos se destacaram, possivelmente em função de maior força física ou experiência. Embora nem todas as predições tenham sido testadas, os dados obtidos reforçam a relevância da reabilitação, evidenciada pela diminuição de comportamentos estereotipados. Assim, os resultados destacam a importância do enriquecimento ambiental e do manejo adequado para o bom desenvolvimento do bem-estar e na recuperação comportamental de primatas em cativeiro.

Referências

AGOSTINI, I.; VISALBERGHI, E. Social influences on the acquisition of sex-typical foraging patterns by juveniles in a group of wild tufted capuchin monkeys (*Cebus nigritus*). *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, v. 65, n. 4, p. 335-351, 2005.

AURORA, Viviane. Evaluating a tool-use rehabilitation protocol for rescued capuchins (*Sapajus spp.*): the role of personality in skill acquisition. Natal, RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2025. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BAKER, L. R. Guidelines for nonhuman primate re-introductions. *Re-introduction NEWS*, n. 21, p. 29-57, 2002.

READING, R. P.; MILLER, B.; SHEPHERDSON, D. The value of enrichment to reintroduction success. *Zoo Biology*, v. 32, n. 3, p. 332-341, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/zoo.21054>.

BIONE, C. B. C. Comportamento de forrageio e utilização de ferramentas pelo *Cebus flavius* (PRIMATES: CEBIDAE) na natureza. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

CHEYNE, S. Challenges and opportunities of primate rehabilitation – gibbons as a case study. *Endangered Species Research*, v. 9, p. 159–165, 2009.

DOS SANTOS, A. M. et al. Evaluation of sound enrichment in the behavior of *Sapajus xanthosternos* (Wied-Neuwied, 1826) (Primates: Cebidae) in captivity. *Primate Conservation*, v. 36, p. 45-53, 2022.

FALÓTICO, T.; BUENO, C. Q.; OTTONI, E. B. Ontogeny and sex differences in object manipulation and probe tool use by wild tufted capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). *American Journal of Primatology*, v. 83, e23251, 2021.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, M. et al. Assessing the personality structure of wild capuchin monkeys (*Sapajus xanthosternos*) using trait rating and behavioral coding. *Journal of Comparative Psychology*, v. 134, n. 3, p. 349, 2020.

FERREIRA, R. G. et al. Coping strategies in captive capuchin monkeys (*Sapajus* spp.). *Applied Animal Behaviour Science*, v. 176, p. 120-127, 2016.

FERREIRA, R. et al. Bird predation and prey-transfer in brown capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Neotropical Primates*, v. 10, n. 2, p. 84-89, 2002.

FERREIRA, V. H. B. et al. Personality traits modulate stress responses after enclosure change of captive capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*). *Applied Animal Behaviour Science*, v. 232, 105111, 2020.

FRAGASZY, D. M.; VISALBERGHI, E.; FEDIGAN, L. *The complete capuchin*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

GOLDENBERG, S. Z. et al. Revisiting the 4 R's: Improving post-release outcomes for rescued mammalian wildlife by fostering behavioral competence during rehabilitation. *Frontiers in Conservation Science*, v. 72, 2022.

GUY, A. J.; CURNOW, D.; BANKS, P. B. Welfare based primate rehabilitation as a potential conservation strategy: does it measure up? *Primates*, v. 55, n. 1, p. 139-147, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10329-013-0386-y>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132600/>. Acesso em: 23 ago. 2025.

HERNANDEZ CRUZ, G. J. Health, behaviour and individual differences of capuchin monkeys (*Sapajus* sp.) in rehabilitation for reintroduction. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – University of Bristol, Bristol, 2022.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Campanhas Centros de Triagem de Animais Silvestres (Cetas). Brasília, DF: IBAMA, 2020.

IBAMA. Instrução Normativa nº 5, de 13 de maio de 2021. Dispõe sobre a destinação de animais silvestres apreendidos, resgatados ou entregues espontaneamente a esses centros. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 1-5, 14 maio de 2021.

IUCN. IUCN Guidelines for the Placement of Confiscated Animals. Gland: IUCN, 2002.

LIMA, V. C. C. D. O período de imaturidade em macacos-prego (*Sapajus* sp.): habilidades de forrageio e redes sociais. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

LYNCH ALFARO, J. W.; IZAR, P.; FERREIRA, R. G. Capuchin monkey research priorities and urgent issues. *American Journal of Primatology*, v. 76, n. 8, p. 705-720, 2014.

LOYANT, L.; WALLER, B. M.; MICHELETTA, J.; JOLY, M. Heterogeneity of performances in several inhibitory control tasks: male rhesus macaques are more easily distracted than females. *Royal Society Open Science*, v. 8, n. 11, p. 211564, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.211564>.

MITMAN, S. et al. Challenges to IUCN Guideline Implementation in the Rehabilitation and Release of Trafficked Primates in Peru. *Primate Conservation: The Newsletter and Journal of the IUCN/SSC Primate Specialist Group*, v. 35, p. 87, 2021.

MOLONY, S. E. et al. The effect of translocation and temporary captivity on wildlife rehabilitation success: An experimental study using hedgehogs (*Erinaceus europaeus*). *Biological Conservation*, v. 130, p. 530–537, 2006.

MORTON, F. B. et al. Personality structure in brown capuchin monkeys (*Sapajus apella*): comparisons with chimpanzees (*Pan troglodytes*), orangutans (*Pongo* spp.), and rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Journal of Comparative Psychology*, v. 127, n. 3, p. 282, 2013.

MORTON, F. B. et al. Capuchin monkeys with similar personalities have higher-quality relationships independent of age, sex, kinship and rank. *Animal Behaviour*, v. 105, p. 163-171, 2015.

MOSCHEN, H. et al. Efeitos do enriquecimento ambiental cognitivo sobre comportamentos estereotipados de *Sapajus libidinosus* (Spix, 1823) (Primates: Cebidae) cativos. *Anais da Semana de Biologia da UFES de Vitória*, v. 4, p. 12-12, 2023.

MASON, G. J.; CLUBB, R.; LANE, E.; PHILLIPS, K.; BUNDY, R. The use of positive reinforcement training to reduce stereotypic behavior in rhesus macaques. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 123, n. 1–2, p. 61–70, 2010. DOI: 10.1016/j.applanim.2010.01.012.

NASCIMENTO, R. A.; SCHIAVETTI, A.; MONTAÑO, R. A. An assessment of illegal capuchin monkey trade in Bahia State, Brazil. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 8, p. 79–87, 2013.

NORMAN, M.; ROWDEN, L. J.; COWLISHAW, G. Potential applications of personality assessments to the management of non-human primates: a review of 10 years of study. *PeerJ*, v. 9, e12044, 2021.

OLIVEIRA, E. S. D.; TORRES, D. F.; ALVES, R. R. N. Wild animals seized in a state in Northeast Brazil: Where do they come from and where do they go? *Environment, Development and Sustainability*, v. 22, p. 2343-2363, 2020.

ONGMAN, L. et al. The “Super Chimpanzee”: The ecological dimensions of rehabilitation of orphan chimpanzees in Guinea, West Africa. *Animals*, v. 3, n. 1, p. 109-126, 2013.

OTTONI, E. B.; IZAR, P. Capuchin monkey tool use: overview and implications. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, v. 17, n. 4, p. 171-178, 2008.

PYKE, G. H.; SZABO, J. K. Conservation and the 4 Rs, which are rescue, rehabilitation, release, and research. *Conservation Biology*, v. 32, n. 1, p. 50-59, 2018.

RESENDE, B. et al. Revisiting the fourth dimension of tool use: how objects become tools for capuchin monkeys. *Evolutionary Human Sciences*, v. 3, e18, 2021.

READING, R. P.; MILLER, B.; SHEPHERDSON, D. Factors influencing the success of enrichment programs for captive primates. *Zoo Biology*, v. 32, n. 6, p. 567–578, 2013. DOI: 10.1002/zoo.21042.

ROX, A.; VAN VLIET, A. H.; STERCK, E. H. M.; LANGERMANS, J. A. M.; LOUWERSE, A. L. Factors determining male introduction success and long-term stability in captive rhesus macaques. *PLoS One*, v. 14, n. 7, e0219972, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219972>.

MILLER, R. P.; SHEPHERDSON, B. D. The value of enrichment to reintroduction success. *Zoo Biology*, v. 32, n. 3, p. 332-341, 2013.

MALLAPUR, A.; CHOUDHURY, B. C. Behavioral abnormalities in captive nonhuman primates. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 275-284, 2003. DOI: https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0604_2.

Anexos

CÓDIGO: SB0398

AUTOR: AMANDA REGIS ASSUNCAO

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: RIQUEZA E COMPOSIÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM ÁREAS PRESERVADAS E IMPACTADAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota, formam associações simbióticas com raízes de plantas, aumentando a tolerância a estresses ambientais e melhorando a qualidade do solo. A identificação de espécies de FMA é limitada à detecção e caracterização dos esporos obtidos em campo, excluindo sua forma vegetativa (hifas no solo ou em raízes colonizadas). Para superar essa limitação, a "iscagem" ou "cultura-armadilha" é utilizada, permitindo a multiplicação de esporos em condições controladas. Neste estudo, aplicamos essa abordagem para avaliar a riqueza e composição de espécies de FMA em áreas preservadas e impactadas por cultivos agrícolas no Sul da Amazônia. Para isso, foram utilizados milho (*Zea mays* L.) e Tagete-Anã (*Tagetes patula* L.), em uma mistura de areia esterilizada, areia sanitária, dolomita e solo nativo previamente coletado. Das 30 culturas estabelecidas, 14 apresentaram esporos inviáveis, impossibilitando a identificação. Entretanto, 14 táxons foram identificados, sendo a ordem Gigasporales a mais representativa. Ademais, os dados obtidos indicam a necessidade de estudos adicionais, além de servir de base sólida para trabalhos futuros em diversas áreas.

Palavras-chave: Culturas in vivo, diversidade, Glomeromycota, propagação de esporos.

TITLE: ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI RICHNESS AND COMPOSITION IN PRESERVED AND IMPACTED AREAS OF THE BRAZILIAN AMAZON

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), belonging to the phylum Glomeromycota, form symbiotic associations with plant roots, helping them to withstand environmental stresses and improve soil quality. The identification of AMF species is limited to the detection and characterization of spores, excluding their vegetative form (hyphae in the soil or in colonized roots) during collection. To overcome this limitation, "baiting" or "trap culture" are used, allowing the multiplication of spores under controlled conditions. In this study, we employed this approach to evaluate the richness and species composition of AMF in preserved areas and those impacted by agricultural crops in the Southern Amazon. For this purpose, corn (*Zea mays* L.) and Dwarf Marigold (*Tagetes patula* L.) were used, in a mixture of sterilized sand, sanitary sand, dolomite, and previously collected native soil. Of the 30 cultures established, 14 showed inviable spores, making identification impossible. However, 14 taxa were identified, with the order Gigasporales being the most representative. Furthermore, the data

obtained indicate the need for additional studies, in addition to serving as a solid basis for future work in various areas.

Keywords: In-vivo cultures, diversity, Glomeromycota, spore propagation.

Introdução

A floresta amazônica é um dos maiores reservatórios de biodiversidade do planeta, se estendendo por nove países da América do Sul, com 60% de sua área total no território Brasileiro. Por ser uma floresta tropical, é caracterizada por alta biodiversidade, abrigando inúmeras espécies da fauna, flora e funga, sendo muitas endêmicas (ICMBio 2016). Além disso, a Amazônia exerce importante papel na regulação dos biossistemas, principalmente no que se refere ao estoque de carbono e requalificação da água (Fearnside 2006). Os ecossistemas que compõem o bioma amazônico estão entre os mais impactados por ações humanas, principalmente pela expansão agropecuária (Renó & Novo 2019). Estima-se que cerca de 20% da cobertura vegetal nativa tenha sido devastada (Aguiar et al 2016) em decorrência de diversos episódios de desmatamento e aumento nas ocorrências de queimadas e degeneração do solo devido a intensos ciclos de cultivos (Santos 2017). O estado do Mato Grosso é o único no Brasil a abrigar três dos seis biomas brasileiros (Amazônia, Cerrado e Pantanal) e simultaneamente incluir parte do chamado “arco do desmatamento”, faixa localizada no sul da Amazônia que concentra os maiores índices de desmatamento do bioma (Laurance WF et al 2001; Leite-Júnior et al 2022). O processo de conversão de áreas naturais em campos agrícolas gera não só perda de habitat, como também alteração nas condições físico-químicas do solo, afetando diferentes grupos de organismos incluindo os microrganismos edáficos, entre os quais se destacam os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) (dos Santos Nascimento et al 2025). Na porção amazônica do estado do Mato Grosso, trabalhos sobre a ocorrência de FMA nunca foram desenvolvidos (Leite-Júnior et al 2022). Os solos amazônicos são caracterizados por baixa quantidade e qualidade de nutrientes, fazendo com que espécies vegetais recorram a atividades simbióticas para melhorar sua nutrição e desenvolvimento (Pasqualini et al 2007; Zangaro et al 2007). Esse contexto ambiental favorece os FMA, sugerindo que a Amazônia abriga uma riqueza muito maior de FMA do que a conhecida atualmente. Esses organismos pertencem ao filo Glomeromycota e contam com seis ordens, 21 famílias, 52 gêneros e cerca de 370 espécies (Hyde et al 2024; da Silva et al 2024, 2025; Blaszkowski et al 2025). São organismos particularmente importantes por realizarem simbiose com raízes de vegetais, desde briófitas às angiospermas (Brundrett & Tedersoo 2018). A identificação das espécies de FMA é de suma importância para entender sua diversidade e distribuição em diferentes ecossistemas (Lee EH et al 2013). Porém, as espécies presentes na forma vegetativa, isto é, sob a forma de hifas no solo, frequentemente não são detectadas (Bever et al 1996; Redecker 2000; Bever et al 2001). Essa limitação ocorre devido aos métodos tradicionais de amostragem e identificação que dependem da detecção de esporos (Goto et al 2024), o que inviabiliza a detecção de fungos que não se encontram na fase de esporulação no momento da coleta. Superar tais restrições metodológicas possibilita uma estimativa mais abrangente da riqueza de espécies de FMA, tornando-se necessária a adoção de técnicas complementares. Dentre essas, destaca-se a técnica de iscagem, também conhecida como “cultura-armadilha”, a qual tem por objetivo promover a multiplicação dos fungos e o subsequente desenvolvimento de esporos sob condições controladas (Stutz & Morton 1996). Nesse contexto, inventários taxonômicos tornam-se essenciais para a avaliação da diversidade desses fungos. Além de possibilitarem a identificação de novas espécies, tais estudos contribuem para a compreensão dos impactos de atividades antrópicas, como a conversão de florestas em sistemas agrícolas,

sobre a composição, estrutura e funcionalidade das comunidades fúngicas. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a riqueza e composição de espécies de FMA em áreas preservadas e impactadas por cultivos agrícolas no Sul da Amazônia.

Metodologia

2.1 Área de estudo

As coletas do presente estudo foram realizadas no município Feliz Natal, no estado do Mato Grosso, em área preservada (11°47'45.5"S 54°09'00.5"W) e degradada (11°57'23.0"S 54°10'25.6"W). A área preservada é representada por uma Floresta Estacional sempre-verde ou Floresta Estacional Perenifolia, caracterizada por se manter sempre verde mesmo em períodos de estiagem. Esse tipo de vegetação possui ocorrência apenas na região sul-amazônica onde há prevalência de espécies vegetais das famílias Annonaceae, Apocynaceae, Araliaceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Chrysobalanaceae, Combretaceae, Connaraceae, Elaeocarpaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Humiriaceae, Lauraceae, Melastomataceae, Meliaceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Ochnaceae, Olacaceae, Rubiaceae, Sapotaceae, Simaroubaceae e Vochysiaceae (Borges et al 2014). O clima da região é classificado como tropical úmido ou subúmido (Am), pela classificação do Köppen. Em relação ao solo, há predomínio de diversos tipos como Argissolos, Oxissolos e Ultissolos (Righi et al 2009; Segovia et al 2020). A área degradada é caracterizada por sistema agrícola de rotação de culturas de soja (*Glycine max* L.) e milho (*Zea mays* L.).

2.2 Amostragem e coleta de solo

A expedição de campo foi realizada entre o final de janeiro e início de fevereiro de 2024. Dois locais foram selecionados: uma área de floresta nativa e uma área desmatada adjacente destinada à produção de soja e milho. Em cada área, foram delimitadas 15 parcelas de 30 x 30 m, distantes entre si por 1 km. Inicialmente, uma amostra foi coletada no ponto central da parcela. A partir desse ponto, foram medidos 15 m e quatro amostras adicionais foram coletadas em cada direção cardinal. A partir das extremidades projetadas dessas quatro amostras, quatro amostras adicionais foram coletadas, totalizando nove subamostras por parcela, que foram misturadas para formar uma amostra composta homogênea. As amostras foram coletadas a uma profundidade de 10-20 cm e armazenadas em sacos plásticos tipo zip lock.

2.3 Extração de glomerosporos e identificação taxonômica

Glomerosporos e glomerocarpos foram isolados e contabilizados a partir de 50 g de solo, em triplicata, por decantação e peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson 1963) e centrifugação em água e sacarose 70% (Jenkins 1964). Os esporos foram montados em lâminas com PVLG (álcool-polivinílico e lactoglicerol) e PVLG + Reagente de Melzer (1:1). Para identificação taxonômica foram utilizados artigos de descrição de espécies, revisões, chaves dicotômicas e descrições de coleções internacionais, adotando o sistema de classificação proposto por Oehl et al (2011) e Hyde et al (2024).

2.4 Culturas-armadilha

Foram montados 30 potes de culturas armadilhas para multiplicar os glomerosporos e glomerocarpos do solo. Para isso, uma mistura composta por 50% de solo nativo, 20% de areia estéril, 20% de vermiculita e 10% de pó de dolomita foi disposta em vasos de cultivo, utilizando *Zea mays* L. (milho) e *Tagete patula* L. (*Tagete-Anã*), como plantas hospedeiras. As plantas foram regadas a cada dois dias com 50mL de água e a cada 15 dias receberam a solução nutritiva NPK 10-10-10 diluída em água, seguindo a proporção indicada pelo fabricante. O experimento foi conduzido em condições controladas, com temperatura de 24°C e iluminação artificial contínua. Após um ciclo de cinco meses, as culturas foram submetidas

a um estresse hídrico até que a parte aérea dos hospedeiros murchasse e morresse, sendo então avaliadas quanto à presença de esporos de FMA. Para as culturas monoespecíficas, foi utilizada uma proporção de 1:1 de areia e vermiculita esterilizada e 10% do somatório da mistura de pó de dolomita. A areia utilizada para o preparo das culturas consistiu em areia de filtro de piscina, com granulometria controlada, a qual foi submetida a um processo de esterilização a fim de evitar contaminações por organismos ainda presentes na areia. Para a desinfecção química, utilizou-se hipoclorito de sódio na proporção de 10 mL por quilograma de areia. A mistura permaneceu submersa por 24 horas em bacias de grande volume. Em seguida, a areia foi lavada em água corrente por 10 minutos para a completa remoção do agente desinfetante. Após o escoamento da água, as bacias contendo a areia foram transferidas para uma estufa com temperatura controlada a 105 °C, permanecendo por mais 24 horas para a esterilização térmica. Após o resfriamento ainda dentro da estufa, o material foi acondicionado em sacos plásticos pretos, permanecendo armazenado até o momento de sua utilização. A vermiculita, por sua vez, foi distribuída uniformemente em placas, umedecida com água até ficar completamente encharcada e, posteriormente, submetida à secagem e esterilização em estufa a 105;°C por 24 horas.

Resultados e Discussões

A identificação morfológica constatou a presença de 14 táxons pertencentes ao filo Glomeromycota, classificados em uma única classe (Glomeromycetes), três ordens e seis famílias (tabela 1). Desses, três espécies pertenciam à ordem Diversisporales, duas a Glomerales e oito a Gigasporales. Segundo Silva et al (2024) a ordem Glomerales agrupa cerca de 50% das espécies descritas para o filo Glomeromycota. Entretanto, em condições de cultura, Gigasporales foi predominante, correspondendo a 53,4% das espécies encontradas. Seis famílias de FMA foram identificadas nas amostras, sendo elas: Acaulosporaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae, Racocetraceae, Sclerocystaceae e Scutellosporaceae (figura 1). Sete gêneros foram encontrados no total. Os mais ricos em espécies foram Acaulospora e Gigaspora, com três espécies cada. Glomus e Sclerocystis foram representados por duas espécies, enquanto Scutellospora e Cetraspora tiveram apenas uma espécie cada. Em termos de frequência de ocorrência, a família Gigasporaceae também foi a mais comum, presente em 6 amostras. Glomeraceae, Acaulosporaceae e Gigasporaceae são consideradas as mais representativas na região neotropical (Stürmer & Kemmelmeier 2021), explicando que 60% do número total de esporos identificados nas culturas pertençam a essas famílias. O gênero Acaulospora tem ampla distribuição geográfica, estando presente em todo o globo, com exceção das regiões árticas. Apresenta esporos com três paredes, sendo a externa geralmente ornamentada com projeções, depressões ou duplas ornamentações, e a parede interna, por sua vez, geralmente reage em Melzer e tem uma superfície granulosa (“beaded”) (Silva et al 2022). O gênero Gigaspora também apresenta ampla distribuição, estando presente em todos os cinco continentes, com exceção das regiões árticas e desérticas (Öpik et al 2010; Rodríguez–Echeverría 2017). Seus esporos possuem formas morfológicas quase indiferenciáveis, o que dificulta a identificação apenas pela morfologia. Características comuns a todas as espécies do gênero incluem a formação de esporos no topo de uma hifa de suporte, denominada célula esporogênica ou célula bulbosa, semelhante a um bulbo suspensor, esporos grandes (>200 µm), uma única parede, ausência de placa germinativa e ornamentação na superfície da camada mais interna da parede (camada germinativa), com projeções semelhantes a papilas (Manawasinghe et al 2025). Outra ocorrência notável foi a aparição, e possível multiplicação, de esporocarpos do gênero Sclerocystis. Esses esporocarpos consistem em aglomerados maciços de esporos alongados e cilíndricos

produzidos em volta de um plexo central, composto de uma ampla rede de hifas entrelaçadas e revestido por um período (Gerdemann & Trappe 1974; Jobim 2020). Para uma avaliação mais completa, é crucial complementar o método tradicional com a busca por glomerocarpos na matéria orgânica da superfície (Goto et al 2016). Foram estabelecidas 30 culturas no total, das quais 15 foram montadas a partir do solo de uma área preservada da Floresta Amazônica e 15 de uma área degradada. Na área preservada, apenas quatro culturas apresentaram esporos viáveis após o período de incubação, evidenciando uma baixa taxa de sucesso na multiplicação dos FMA sob essas condições. Em contraste, na área degradada, 10 das 15 culturas estabeleceram-se com sucesso, contendo esporos viáveis e em quantidade suficiente para permitir a análise taxonômica. Esses resultados sugerem que a área impactada, possivelmente possuía maior quantidade de propágulos viáveis no solo, que favoreceu a colonização micorrízica, ao contrário da área preservada, onde a densidade de esporos pode ser naturalmente mais baixa (de Medeiros et al 2018). Entre as culturas avaliadas, observou-se que o hospedeiro Tagete-Anã apresentou baixo desempenho vegetativo nos vasos contendo solos provenientes da região Amazônica. Tal resultado pode estar associado, em parte, às características físico-químicas do solo, especialmente à predominância de argila em sua composição, que pode ter limitado o desenvolvimento radicular e a aeração adequada. Em contraste, o milho, utilizado como hospedeiro alternativo, demonstrou bom crescimento nesse mesmo substrato, não evidenciando restrições significativas ao desenvolvimento. No que se refere à esporulação dos FMA, a maioria das culturas apresentou esporos inviáveis ou degradados, principalmente aqueles provenientes da área preservada, o que dificultou a identificação com base em características morfológicas. Esse achado indica que os esporos nativos do solo não se multiplicaram eficientemente nas culturas-armadilha. No entanto, foi possível observar a presença de hifas no solo e estruturas de colonização nas raízes dos hospedeiros, sugerindo que a simbiose foi estabelecida, ainda que sem resultar em esporulação visível no período avaliado. A partir disso, é possível sugerir que o tempo de manutenção das culturas foi insuficiente para permitir a formação de esporos viáveis, indicando a necessidade de um período mais prolongado para estimular o ciclo completo dos FMA e, consequentemente, sua esporulação.

Conclusão

Foram identificados 14 táxons de FMA nas culturas-armadilha, com predominância da ordem Gigasporales. Observou-se maior número de espécies multiplicadas nas culturas estabelecidas com solo proveniente da área agrícola. O milho mostrou-se um hospedeiro mais eficiente que Tagete-Anã nas culturas com solos amazônicos. Apesar de o método de cultura-armadilha ter sido eficaz para a multiplicação dos esporos, a baixa taxa de sucesso na área de floresta, combinada com a observação de estruturas de colonização sem esporulação visível em algumas amostras, sugere que o período de cinco meses pode ter sido insuficiente para o ciclo completo de esporulação de algumas espécies. Isso evidencia a necessidade de otimizações metodológicas, como a extensão do período de cultivo e a escolha de hospedeiros adequados, para capturar de forma mais abrangente a diversidade desses organismos em solos amazônicos. Este trabalho contribui para o conhecimento da diversidade de FMA em solos amazônicos, servindo como base para futuros estudos sobre a taxonomia, ecologia e biotecnologia dos FMA na região. A identificação desses fungos é crucial para compreender seu papel na dinâmica de ecossistemas tanto preservados quanto impactados, abrindo caminho para o desenvolvimento de estratégias de manejo de solo e conservação da biodiversidade fúngica.

Referências

- Aguiar, A. P. D. et al. Land use change emission scenarios: anticipating a forest transition process in the Brazilian Amazon. *Global Change Biology*, v. 22, n. 5, p. 1821-1840, 2016. BRASÍLIA, DF. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Biodiversidade brasileira. 2016. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-planos-de-acao-nacionais>. Acesso em: 27 ago. 2025. BLASZKOWSKI, J. et al. New taxa and a combination in Glomerales (Glomeromycota, Glomeromycetes). *MycKeys*, v. 112, p. 253-276, 2025. BRUNDRETT, M. C.; TEDERSOO, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, v. 220, n. 4, p. 1108-1115, 2018. CHAPIN, F. S. et al. *Princípios da ecologia de ecossistemas terrestres*. 2. ed. Nova York: Springer, 2011. DA SILVA, G. A. et al. Four New Families of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Order Glomerales. *Taxonomy*, v. 4, n. 4, p. 761-779, 2024. DA SILVA, G. A. et al. Revision of Entrophosporales, with Three Genera and an Identification Key for All Species Currently Attributed to This Order. *Journal of Fungi*, v. 11, n. 97, p. 1-21, 2025. DA SILVA, K. J. et al. Phylogenetic review of Acaulospora (Diversisporales, Glomeromycota) and the homoplastic nature of its ornamentations. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 9, p. 892, 2022. DAVISON, J. et al. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, v. 349, n. 6251, p. 970-973, 2015. DE MEDEIROS, P. S.; FERREIRA, L. V. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em uma cronosequência de florestas secundárias na Amazônia oriental. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais*, v. 13, n. 2, p. 247-259, 2018. DOS SANTOS NASCIMENTO, G. et al. Changes in land uses caused by deforestation determine the arbuscular mycorrhizal fungi community composition in tropical environments. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 197, n. 4, p. 1-10, 2025. GERDEMANN, J. W.; NICHOLSON, 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. GERDEMANN, J. W.; TRAPPE, J. M. The Endogonaceae of the Pacific Northwest. *Micologie Memoir*, n. 5, p. 1-76, 1974. GOTO, B. T. et al. How far have we progressed in Glomeromycota taxonomy and systematic? *IMS newsletter*, v. 5, p. 18-24, 2024. HAZARD, C. et al. The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME Journal*, v. 7, n. 3, p. 498-508, 2013. HIBBETT, D. S. et al. Progresso na descoberta de táxons moleculares e morfológicos em fungos e opções para classificação formal de sequências ambientais. *Fungal Biology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 38-47, 2011. HYDE, K. D. et al. The 2024 Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, v. 15, n. 1, p. 5146-6239, 2024. JANOS, D. P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology*, v. 61, n. 1, p. 151-162, 1980. JENKINS, W. R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *The Plant Disease Reporter*, v. 48, n. 9, p. 692, 1964. JIANG, Y. et al. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Plant Science*, v. 356, p. 1172-1175, 2017. JOBIM, K. Espécies esporocárpicas de fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota): taxonomia, sistemática e evolução. 2020. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. LEITE-JÚNIOR, D. P. et al. Neotropical Micodiversity of Mato Grosso, Central Region of Brazil: Ethnomicological Aspects and Systematic Research of the Literature. *International Journal of Tropical Disease & Health*, v. 43, n. 1, p. 1-47, 2022. MAIA, L. C. et al. Species diversity of Glomeromycota in Brazilian biomes. *Sydowia*, v. 72, p. 181-205, 2020. MANAWASINGHE, I. S. et al. Fungal diversity

notes 1818–1918: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungi. *Fungal Diversity*, v. 130, n. 1, p. 1-261, 2025. OEHL, F. et al. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, v. 2, n. 2, p. 191-199, 2011. ÖPIK, M. et al. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, v. 188, n. 1, p. 223–241, 2010. PASQUALINI, D. et al. Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plant species from the Atlantic rain forest in South Brazil. *Forrest Ecology and Management*, v. 145, n. 1, p. 148–155, 2007. RENÓ, V.; NOVO, E. Forest depletion gradient along the Amazon floodplain. *Ecological Indicators*, v. 98, p. 409-419, 2019. RIGHI, C. A. et al. Biomass burning in Brazil's Amazonian “arc of deforestation”: Burning efficiency and charcoal formation in a fire after mechanized clearing at Feliz Natal, Mato Grosso. *Forest Ecology and Management*, v. 258, n. 11, p. 2535-2546, 2009. RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi communities from tropical Africa reveal strong ecological structure. *New Phytologist*, v. 213, n. 1, p. 380–390, 2017. SANTOS, T. O. Os impactos do desmatamento e queimadas de origem antrópica sobre o clima da Amazônia brasileira: um estudo de revisão. *Revista Geográfica Acadêmica*, v. 11, n. 2, p. 157-181, 2017. GOTO, B. T., BEZERRA, J. L., & MAIA, L. C. (2016). *Sclerocystis coremioides* (Glomeromycota) formando esporocarpos epígeos em substratos orgânicos de cacaueteiro na Mata Atlântica da Bahia. *Agrotrópica* 28: 23–28. *Agrotrópica*, 28, 23-28. SEGOVIA, J. F. O.; ORELLANA, J. B. P.; KANZAKI, L. I. B. Características físico-químicas dos principais solos na Amazônia. In: SEGOVIA, J. F. O. (Ed.). *Floricultura tropical: técnicas e inovações para negócios sustentáveis na Amazônia*. Brasília, DF: Embrapa, 2020. p. 43-66. STÜRMER, S. L.; KEMMELMEIER, K. The Glomeromycota in the neotropics. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 553679, 2021. WIJAYAWARDENE, N. N. et al. Outline of Fungi and fungus-like taxa – 2021. *Mycosphere*, v. 13, n. 1, p. 53-453, 2022. XU, M. et al. Land use alters arbuscular mycorrhizal fungal communities and their potential role in carbon sequestration on the Tibetan Plateau. *Scientific Reports*, v. 7, p. 3067, 2017. ZANGARO, W. et al. Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 23, n. 1, p. 53–62, 2007.

CÓDIGO: SB0411

AUTOR: PIETRA FREIRE JEREMIAS

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Efeitos da Psicoterapia Assistida por Cetamina na Redução dos Sintomas Depressivos e dos Níveis de Proteína C-Reativa em Pacientes com Transtorno Depressivo Maior Resistente

Resumo

O Transtorno Depressivo Maior Resistente (TDM-R) é uma condição clínica de grande impacto funcional e social, sendo caracterizada pela ausência de resposta a pelo menos dois tratamentos convencionais e adequados, e afetando aproximadamente 4% da população global. Estudos recentes têm apontado a cetamina como um agente terapêutico promissor para esses casos, com ação rápida e duradoura. Neste estudo, propusemos a comparar os efeitos da Psicoterapia Assistida por Cetamina (PAC) com o tratamento apenas com Cetamina na melhora de sintomas depressivos e nos níveis plasmáticos da Proteína C-Reativa (PCR), um marcador inflamatório associado à fisiopatologia do TDM. Foram incluídos 50 indivíduos (PAC: n = 27, Cetamina: n = 23) com TDM-R em variadas intensidades, seguindo o protocolo de tratamento com infusões subcutâneas de cetamina, acompanhadas de psicoterapia. A resposta clínica foi avaliada por meio da escala BDI (Inventário de Beck para Depressão). A PCR foi dosada antes da 1ª, 4ª e 8ª sessões. Ambos os grupos reduziram os sintomas depressivos. Com relação à PCR, não houve variação dentro grupo ao longo do tratamento, mas, de forma geral, o grupo PAC apresentou maiores níveis que o grupo Cetamina durante todo tratamento. Por fim, não houve correlação entre a variação de PCR e a variação da BDI. Sendo assim, este estudo contribuiu para a compreensão dos mecanismos clínicos e biológicos envolvidos na resposta antidepressiva à cetamina, integrando psicoterapia e inflamação.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior Resistente. Cetamina. Psicoterapia.

TITLE: Effects of Ketamine-Assisted Psychotherapy on the Reduction of Depressive Symptoms and C-Reactive Protein Levels in Patients with Treatment-Resistant Major Depressive Disorder

Abstract

Treatment-Resistant Major Depressive Disorder (TRD) is a clinical condition with significant functional and social impact, characterized by the absence of response to at least two adequate conventional treatments, affecting approximately 4% of the global population. Recent studies have identified ketamine as a promising therapeutic agent in these cases, with rapid and sustained effects. This study compared the effects of Ketamine-Assisted Psychotherapy (KAP) with ketamine-only treatment on depressive symptoms and plasma levels of C-Reactive Protein (CRP), an inflammatory biomarker associated with the pathophysiology of TRD. Fifty individuals were included (KAP: n = 27, Ketamine: n = 23),

all with TRD of varying intensity, following a protocol of subcutaneous ketamine infusions combined with psychotherapy. Clinical response was assessed using the Beck Depression Inventory (BDI). CRP levels were measured before the 1st, 4th, and 8th sessions. Both groups reduced depressive symptoms. Regarding CRP, no variation within groups was observed throughout treatment, but the KAP group generally presented higher levels than the Ketamine group during the study. No correlation was found between changes in CRP and changes in BDI. This study contributes to understanding the clinical and biological mechanisms underlying the antidepressant response to ketamine, integrating psychotherapeutic and inflammatory dimensions.

Keywords: Treatment-Resistant Major Depressive Disorder. Ketamine. Psychotherapy

Introdução

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma das condições psiquiátricas de maior impacto global, com alta prevalência e alta carga de morbidade. Estimativas recentes apontam que cerca de 4% da população mundial é afetada por esta condição (James et al., 2018). Apesar dos avanços no desenvolvimento de antidepressivos, aproximadamente um terço dos pacientes permanece refratário às terapias convencionais (Conway et al., 2017).

A resistência ao tratamento parece estar relacionada à homogeneidade dos mecanismos de ação dos antidepressivos disponíveis, que em sua maioria atuam na modulação das monoaminas (Otte et al., 2016). Esse cenário impulsionou a busca por intervenções inovadoras, como o uso da cetamina, um antagonista do receptor NMDA, que vem demonstrando efeitos antidepressivos rápidos e sustentados em pacientes com TDM resistente (Zarate et al., 2006; Murrough et al., 2013; Fava et al., 2018).

Com o desenvolvimento de novos estudos clínicos, voltados a cetamina, foram apontados, em dose sub-anestésicas, uma ação antidepressiva rápida (Pozzi et al. 2014), já nos dias subsequentes a primeira dose, incluindo pacientes refratário ao tratamento eletroconvulsoterapia (ECT) (Pagnin et al. 2008; C. A. Zarate et al. 2006; J. W. Murrough et al. 2013; Berman et al. 2000).

Estudos apontam que a repetição das doses de cetamina pode prolongar seus efeitos terapêuticos e ampliar seu impacto clínico (Coyle & Laws, 2015). Contudo, a via de administração, a dose ideal e o número necessário de sessões ainda são questões em investigação. Paralelamente, estudos recentes sugerem uma possível interrelação entre a fisiopatologia da depressão e a ativação de processos inflamatórios, com destaque para biomarcadores como a proteína C-reativa (PCR) e a interleucina-6 (IL-6) (Krishnadas & Cavanagh, 2012).

A neuroinflamação é descrita como uma resposta inflamatória que ocorre em toda a extensão do sistema nervoso por intermédio de circunstâncias adversas que promovem o desequilíbrio sistêmico, que podem levar ao desenvolvimento de múltiplos transtornos e doenças. Tais como a depressão. (Moreira, et al. 2023)

Embora a PCR seja apontada como um marcador relevante para a estratificação clínica e prognóstica em TDM, sua relação com a resposta à cetamina ainda não foi devidamente estabelecida (Medeiros et al., 2022). Diante disso, o presente estudo propõe-se a investigar os efeitos de um protocolo de Psicoterapia Assistida por Cetamina sobre sintomas depressivos e níveis de PCR, ao longo de um regime repetido de administração subcutânea.

Metodologia

Materiais e Métodos

Foram incluídos 24 indivíduos, com idades entre 18 e 65 anos, com diagnóstico de transtorno depressivo maior resistente, encaminhados pela equipe de psiquiatria do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL). A elegibilidade foi confirmada mediante triagem clínica e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

CrITÉRIOS de Inclusão e Exclusão

Os participantes deveriam apresentar episódio depressivo de intensidade moderada a grave, com duração mínima de quatro semanas e histórico de uso pelo menos dois antidepressivos em dose e tempo adequados. Foram excluídos indivíduos com condições clínicas que contraindicassem o uso da cetamina, como hipertensão descompensada, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), distúrbios psicóticos ou neurológicos graves, entre outras.

Instrumentos

- Escala de Depressão de Montgomery e Åsberg (MADRS): esta escala, aplicada pelo psiquiatra, foi utilizada para durante a triagem da elegibilidade dos participantes, para confirmar o diagnóstico e avaliar a severidade dos sintomas depressivos (Montgomery e Åsberg, 1979).
- Escala de Depressão de Beck (BDI-II): esta escala autorrelatada avalia os sintomas depressivos em “ausente” ou “mínima” (0-10), “leve” (11-19), “moderada” (20-30) ou “grave” (31-63) (Beck, Steer, e Brown, 2011). Foi utilizada no estudo para avaliar os sintomas depressivos autopercebidos ao após cada sessão.

Desenho do Estudo

O protocolo contempla oito sessões semanais de infusão subcutânea de Dextrocetamina. A dose inicial foi de 0,5 mg/kg, que podia ser aumentada para 0,75 mg/kg ou 1 mg/kg, conforme a resposta clínica. A menor dose eficaz foi mantida nas sessões subsequentes. A resposta clínica foi mensurada por meio da BDI-II antes e após cada infusão, bem como em seguimentos nas semanas e meses subsequentes.

Os participantes foram divididos em dois grupos, um tratado apenas com cetamina subcutânea (Grupo Cetamina) e outro através da associação da psicoterapia ao tratamento com cetamina subcutânea, em um protocolo de Psicoterapia Assistida por Cetamina (Grupo PAC), conduzida em três fases:

- Preparação: sessões online com psicólogo para psicoeducação e técnicas de regulação emocional;
- Experiência: acompanhamento da infusão por dupla de terapeutas;
- Integração: sessões presenciais no dia seguinte à administração, com objetivo de promover reflexão e consolidação da experiência psicoterapêutica.

Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada antes da primeira, quarta e oitava sessões, por meio de punção venosa, entre 6:30 e 7:30, para evitar variações circadianas. O sangue coletado foi processado e enviado para o Laboratório de Análises Clínicas do HUOL para dosagem da PCR, a qual foi quantificada via turbidimetria.

Resultados e Discussões

Análise estatística

Nesse estudo, a PCR e a BDI foram utilizadas como variáveis dependentes, a sessão de dosagem de cetamina como variável de medida repetida, enquanto o grupo de tratamento (Cetamina ou Psicoterapia Assistida por Cetamina [PAC]) foi utilizado como variável independente e idade e IMC como covariáveis. Antes de serem utilizados na estatística, os valores de PCR foram transformados em $\log_{10}$. Para análise dos dados, foi utilizada a estratégia de intenção de tratar, no qual os casos ausentes foram substituídos pela média do grupo na respectiva sessão. Para testar o efeito dos tratamentos na PCR ao longo das sessões, foi realizada uma análise de covariância de medidas repetidas (ANCOVA-MR) e pós-hoc de Holm. A análise de correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a relação entre a diferença da PCR entre o início e o final do tratamento ($\Delta\text{PCR} = \text{PCRS8} - \text{PCRS1}$) e entre os sintomas depressivos ($\Delta\text{BDI} = \text{BDIS8} - \text{BDIS1}$). O tamanho de efeito relatado foi o d de Cohen. O nível de significância estatística foi $p < 0,050$.

Resultados e Discussão

Para a BDI, foi encontrado um efeito do tempo ($F(1,8, 84,6) = 6,664, p = 0,003$), no qual ambos os grupos reduziram progressivamente os sintomas depressivos (todos os p -valores do pós-hoc $< 0,01$). O grupo PAC apresentou maior tamanho de efeito entre sessão 1 e 4 (PAC: $d = 1,27$; Cetamina: $d = 0,76$) e entre as semanas 1 e 8 (PAC: $d = 1,77$; Cetamina: $d = 1,12$) (Figura 1).

Com relação à PCR, foi encontrado um efeito de grupo ($F(1, 46) = 12,946, p < 0,001$), no qual o grupo PAC apresentou, no geral, maiores níveis do biomarcador. Nenhum efeito da sessão ($F(1,7, 80) = 0,674, p = 0,493$) ou da interação grupo*sessão ($F(1,7, 80) = 0,467, p = 0,602$) foi encontrada, indicando que não houve mudança significativa dentro os grupos (Figura 2). A variação da PCR ao longo do tratamento não se correlacionou com a variação da BDI ao longo do tratamento (Cetamina: $\rho = -0,21, p = 0,340$; PAC: $\rho = 0,02, p = 0,930$), para ambos os grupos.

No presente estudo, foram avaliados os efeitos de um tratamento apenas com cetamina em comparação à Psicoterapia Assistida por Cetamina (PAC) na redução dos sintomas depressivos e dos níveis de PCR em pacientes com Transtorno Depressivo Maior resistente. A resposta quanto aos sintomas antidepressivos foi similar nos dois grupos, com redução na 4ª e 8ª sessão, enquanto a PCR, no geral, foi maior para o grupo PAC, embora não tenha variado ao longo do tratamento em nenhum grupo.

Os achados em relação a melhora clínica dos sintomas depressivos, embora preliminares, estão em concordância com resultados prévios que demonstraram uma resposta antidepressiva rápida após administração de cetamina em pacientes refratários (Zarate et al., 2006; Murrough et al., 2013a). A repetição das doses, como apontado por Murrough et al. (2013b), pode sustentar os efeitos clínicos ao longo do tempo, aspecto também considerado no protocolo aqui utilizado. No que se refere à via de administração, evidências sugerem que formas alternativas, como a subcutânea, apresentam eficácia comparável à intravenosa, além de maior viabilidade clínica (Loo et al., 2016).

Apesar de nosso estudo não encontrar um efeito adjunto da psicoterapia associada à administração de cetamina, o tamanho de efeito na redução foi numericamente maior nesse grupo. Isso pode indicar que a ausência de efeito adjunto pode ser devido à limitação no tamanho da amostra, o que pode ter reduzido o poder do teste estatístico em identificar a diferença. Por isso, estudos futuros que investiguem esse efeito adjunto em uma amostra maior se faz necessário para confirmar o papel complementar da psicoterapia, como mostrado em outros estudos (Shonkoff, Boyce, and McEwen 2009; Dore et al. 2019; Muscat et al. 2021) Por outro lado, quanto à avaliação da PCR, a ausência de alteração significativa já foi

reportada em revisões recentes (Medeiros et al., 2022), sugerindo que esse biomarcador pode não refletir diretamente a resposta antidepressiva induzida pela cetamina, diferentemente do que ocorre com outros antidepressivos clássicos (Uher et al., 2014).

Este trabalho apresenta algumas limitações. Primeiro, este estudo é um ensaio aberto, no qual a alocação da amostra não foi aleatorizada, o que pode ser uma fonte de viés. Além disso, o número de pacientes incluídos foi pequeno, o que limita o poder estatístico da análise e aumenta a chance de falsos negativos. Por fim, a PCR foi coletada e dosada apenas em 3 momentos ao longo do tratamento; no entanto, um maior número de coletas pode capturar melhor alterações agudas ao longo do tratamento. Sendo assim, estudos futuros empregando aleatorização da alocação dos participantes, com uma amostra maior e com mais pontos de coleta da PCR se faz necessário, para uma melhor compreensão dos efeitos adjuntos da psicoterapia associada ao tratamento com cetamina.

Conclusão

Em resumo, esses resultados corroboram o papel da cetamina como uma substância com efeitos antidepressivos em indivíduos com depressão resistente ao tratamento, enquanto sugere que a PCR analisada isoladamente não parece ser um bom biomarcador de resposta ao tratamento. Embora os resultados reforcem o potencial antidepressivo da cetamina em pacientes resistentes, permanece a necessidade de mais pesquisas sobre o papel da inflamação sistêmica como prognóstico de resposta clínica.

Referências

- Beck, Aaron T., R. A. Steer, and G. Brown. 1996. "Beck Depression Inventory–II." *Psychological Assessment*. <https://doi.org/10.1037/t00742-000>.
- Berman, R. M., A. Cappiello, A. Anand, D. A. Oren, G. R. Heninger, D. S. Charney, and J. H. Krystal. 2000. "Antidepressant Effects of Ketamine in Depressed Patients." *Biological Psychiatry* 47 (4): 351–54.
- Conway CR, George MS, Sackeim HA. Toward an Evidence-Based, Operational Definition of Treatment-Resistant Depression: When Enough Is Enough. *JAMA Psychiatry*. 2017 Jan 1;74(1):9-10. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2016.2586. PMID: 27784055.
- Coyle CM, Laws KR. The use of ketamine as an antidepressant: a systematic review and meta-analysis. *Hum Psychopharmacol*. 2015 May;30(3):152-63. doi: 10.1002/hup.2475. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25847818.
- Dore, Jennifer, Brent Turnipseed, Shannon Dwyer, Andrea Turnipseed, Julane Andries, German Ascani, Celeste Monnette, Angela Huidekoper, Nicole Strauss, and Phil Wolfson. 2019. "Ketamine Assisted Psychotherapy (KAP): Patient Demographics, Clinical Data and Outcomes in Three Large Practices Administering Ketamine with Psychotherapy." *Journal of Psychoactive Drugs* 51 (2): 189–98.
- Fava, M., Freeman, MP, Flynn, M. et al. Ensaio duplo-cego, controlado por placebo e de dosagem de cetamina intravenosa como terapia adjuvante na depressão resistente ao tratamento (DRT). *Mol Psychiatry* 25 , 1592–1603 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0256-5>
- Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for

- the Global Burden of Disease Study 2017. James, Spencer L et al. The Lancet, Volume 392, Issue 10159, 1789 – 1858
- Krishnadas R, Cavanagh J. Depression: an inflammatory illness? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 May;83(5):495-502. doi: 10.1136/jnnp-2011-301779. Epub 2012 Mar 15. PMID: 22423117.
- Loo CK, Gálvez V, O'Keefe E, Mitchell PB, Hadzi-Pavlovic D, Leyden J, Harper S, Somogyi AA, Lai R, Weickert CS, Glue P. Placebo-controlled pilot trial testing dose titration and intravenous, intramuscular and subcutaneous routes for ketamine in depression. Acta Psychiatr Scand. 2016 Jul;134(1):48-56. doi: 10.1111/acps.12572. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27028832.
- Loo, C. K., V. Gálvez, E. O'keefe, P. B. Mitchell, D. Hadzi-Pavlovic, J. Leyden, S. Harper, et al. 2016. "Placebo-Controlled Pilot Trial Testing Dose Titration and Intravenous, Intramuscular and Subcutaneous Routes for Ketamine in Depression." Acta Psychiatrica Scandinavica 134 (1): 48–56.
- Medeiros GC, Gould TD, Prueitt WL, Nanavati J, Grunebaum MF, Farber NB, Singh B, Selvaraj S, Machado-Vieira R, Achtyes ED, Parikh SV, Frye MA, Zarate CA Jr, Goes FS. Blood-based biomarkers of antidepressant response to ketamine and esketamine: A systematic review and meta-analysis. Mol Psychiatry. 2022 Sep;27(9):3658-3669. doi: 10.1038/s41380-022-01652-1. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35760879; PMCID: PMC9933928.
- Medeiros GC, Gould TD, Prueitt WL, Nanavati J, Grunebaum MF, Farber NB, Singh B, Selvaraj S, Machado-Vieira R, Achtyes ED, Parikh SV, Frye MA, Zarate CA Jr, Goes FS. Blood-based biomarkers of antidepressant response to ketamine and esketamine: A systematic review and meta-analysis. Mol Psychiatry. 2022 Sep;27(9):3658-3669. doi: 10.1038/s41380-022-01652-1. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35760879; PMCID: PMC9933928.
- Montgomery, A.S., e Åsberg, M. 1979. "New Depression Scale Designed to be Sensitive to Change". British Journal of Psychiatry 134, 382-389
- Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, Al Jurdi RK, Green CE, Perez AM, Iqbal S, Pillemer S, Foulkes A, Shah A, Charney DS, Mathew SJ. Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. Am J Psychiatry. 2013 Oct;170(10):1134-42. doi: 10.1176/appi.ajp.2013.13030392. PMID: 23982301; PMCID: PMC3992936.
- Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, Al Jurdi RK, Green CE, Perez AM, Iqbal S, Pillemer S, Foulkes A, Shah A, Charney DS, Mathew SJ. Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. Am J Psychiatry. 2013 Oct;170(10):1134-42. doi: 10.1176/appi.ajp.2013.13030392. PMID: 23982301; PMCID: PMC3992936.
- Murrough JW, Perez AM, Pillemer S, Stern J, Parides MK, aan het Rot M, Collins KA, Mathew SJ, Charney DS, Iosifescu DV. Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. Biol Psychiatry. 2013 Aug 15;74(4):250-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.022. Epub 2012 Jul 27. PMID: 22840761; PMCID: PMC3725185.
- Murrough, J. W., D. V. Iosifescu, L. C. Chang, R. K. Al Jurdi, C. E. Green, A. M. Perez, S. Iqbal, et al. 2013. "Antidepressant Efficacy of Ketamine in Treatment-Resistant Major Depression: A Two-Site Randomized Controlled Trial." The American Journal of Psychiatry 170 (10): 1134–42.
- Osimo EF, Baxter LJ, Lewis G, Jones PB, Khandaker GM. Prevalence of low-grade inflammation in depression: a systematic review and meta-analysis of CRP levels. Psychol Med. 2019 Sep;49(12):1958-1970. doi: 10.1017/S0033291719001454. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31258105; PMCID: PMC6712955.

- Otte, C., Gold, S., Penninx, B. et al. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16065 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>
- Pagnin, Daniel, Valéria de Queiroz, Stefano Pini, and Giovanni Battista Cassano. 2008. "Efficacy of ECT in Depression: A Meta-Analytic Review." *FOCUS* 6 (1): 155–62.
- Pozzi, Laura, Iskra Pollak Dorocic, Xinming Wang, Marie Carlén, and Konstantinos Meletis. 2014. "Mice Lacking NMDA Receptors in Parvalbumin Neurons Display Normal Depression-Related Behavior and Response to Antidepressant Action of NMDAR Antagonists." *PloS One* 9 (1): e83879.
- Shonkoff, Jack P., W. Thomas Boyce, and Bruce S. McEwen. 2009. "Neuroscience, Molecular Biology, and the Childhood Roots of Health Disparities: Building a New Framework for Health Promotion and Disease Prevention." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 301 (21): 2252–59.
- Uher R, Tansey KE, Dew T, Maier W, Mors O, Hauser J, Dernovsek MZ, Henigsberg N, Souery D, Farmer A, McGuffin P. An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. *Am J Psychiatry*. 2014 Dec 1;171(12):1278-86. doi: 10.1176/appi.ajp.2014.14010094. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25017001.
- Vinícius Barbosa Moreira, M., Sobral Fernandes, G., Barreto Mesquita de Goes, Marcelo, Luís Tomaz do Nascimento, A., Caroline d'Ávila Pinheiro Daniel, A., Beatriz dos Santos Silva, Ana, Safira Araújo Mendes, A., Cecília Leão de Carvalho, A., & Larissa Fernandes de Holanda Soares, A. (2023). Impactos da Neuroinflamação nos Transtornos de Depressão e Ansiedade: Uma Revisão Integrativa. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 5(5), 5537–5560. <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n5p5537-5560>
- Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Aug;63(8):856-64. doi: 10.1001/archpsyc.63.8.856. PMID: 16894061.
- Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Aug;63(8):856-64. doi: 10.1001/archpsyc.63.8.856. PMID: 16894061.
- Zarate, C. A., J. B. Singh, P. J. Carlson, N. E. Brutsche, R. Ameli, D. A. Luckenbaugh, D. S. Charney, and H. K. Manji. 2006. "A Randomized Trial of an N-Methyl-D-Aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression." *Archives of General Psychiatry* 63 (8): 856–64.

Anexos

Figura 1. Sintomas depressivos avaliados pela BDI para os grupos Cetamina (laranja) e PAC (verde). S1 = diferença com relação à Semana 1, S4 = diferença com relação à Semana 4.
BDI = Inventário de Beck de Depressão, PAC = Psicoterapia Assistida por Cetami

Figura 2. Proteína C-reativa ao longo do tratamento entre os grupos Cetamina (laranja) e PAC (verde).

CÓDIGO: SB0426

AUTOR: GIOVANNA MARIA CAVALCANTI DE SOUZA

ORIENTADOR: SILVIA REGINA BATISTUZZO DE MEDEIROS

TÍTULO: Comparação de linhagens de zebrafish (*Danio rerio*) mais sensível ao reteno

Resumo

Este estudo investigou a toxicidade do reteno, um HPA (hidrocarboneto policíclico aromático), em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*). O reteno é formado pela combustão incompleta de materiais como combustíveis fósseis e celulose, e é um contaminante ambiental onipresente, mas não é classificado como prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA). O objetivo foi comparar a sensibilidade de três linhagens de zebrafish (AB, WT e TU) ao reteno, para identificar a mais sensível para futuros estudos. Foram realizados testes de sobrevivência, malformações e comportamento optomotor em embriões e larvas expostos a duas concentrações de reteno (250 µg/L e 500 µg/L). Os resultados mostraram que a toxicidade do reteno variou significativamente entre as linhagens. A linhagem AB foi a mais sensível, apresentando uma notável redução na sobrevivência e alterações no comportamento optomotor. Em contraste, a linhagem TU mostrou-se a mais resistente, com as menores quedas nas taxas de sobrevivência e ausência de diferenças significativas em malformações ou comportamento. O estudo concluiu que o reteno deve ser considerado um contaminante ambiental relevante e que a linhagem AB é um modelo promissor para futuras pesquisas sobre a toxicologia desse composto. A variabilidade da sensibilidade entre as linhagens reforça a importância de considerar fatores genéticos em avaliações de toxicidade.

Palavras-chave: Reteno; Zebrafish; HPA

TITLE: Comparison of zebrafish (*Danio rerio*) strains most sensitive to retene

Abstract

This study investigated the toxicity of retene, a PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon), in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Retene is formed by the incomplete combustion of materials such as fossil fuels and cellulose and is a ubiquitous environmental contaminant, but it is not classified as a priority by the U.S. Environmental Protection Agency (US-EPA). The objective was to compare the sensitivity of three zebrafish strains (AB, WT, and TU) to retene, to identify the most sensitive for future studies. Survival, malformations, and optomotor behavior tests were performed on embryos and larvae exposed to two concentrations of retene (250 µg/L and 500 µg/L). The results showed that retene toxicity varied significantly between the strains. The AB strain was the most sensitive, exhibiting a notable reduction in survival and alterations in optomotor behavior. In contrast, the TU strain proved to be the most resistant, with the smallest declines in survival rates and no significant differences in malformations or behavior. The study concluded that retene should be considered a relevant environmental contaminant and that the AB strain is a promising model

for future research on the toxicology of this compound. The variability in sensitivity among strains reinforces the importance of considering genetic factors in toxicity assessments.

Keywords: Retention; Zebrafish; HPA

Introdução

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são contaminantes ambientais onipresentes, formados pela combustão incompleta natural ou antropogênica, como a de combustíveis fósseis, escapamentos veiculares e incêndios florestais (Peixoto et al., 2019; Bansal & Kim, 2015; Boström et al., 2002). Sua ampla diversidade e capacidade de formar misturas complexas levam ao acúmulo no solo, água e alimentos, causando lenta degradação ambiental e potenciais malefícios à saúde de humanos e outros organismos, afetando a qualidade de vida (Júnior et al., 2021; Vehniainen et al., 2019; IARC, 2010).

O reteno (7-isopropil-1-metilfenantreno) é um HPA alquilado com três anéis, abundante em material particulado da queima de celulose, associado a efluentes de fábricas de celulose e ao metabolismo microbiano de ácidos resínicos, sendo também um biomarcador de incêndios florestais (Eriksson et al., 2022; Jiang et al., 2022). Apesar de sua detecção frequente no ambiente, o reteno não é classificado como um HPA prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA), resultando em sua exclusão das avaliações de risco ambiental e à saúde humana.

Contrariando essa falta de priorização, pesquisas anteriores do nosso grupo demonstraram que o reteno induz estresse oxidativo através da formação de superóxido mitocondrial e ERO intracelular, além de danos ao DNA via aberrações cromossômicas e instabilidade genética, e morte celular necrótica (Peixoto et al., 2019). Adicionalmente, estudos com zebrafish adultos expostos ao reteno revelaram efeitos genotóxicos e alterações neurocomportamentais, decorrentes do desequilíbrio redox e da alteração na expressão de genes relacionados a neurotransmissores (Júnior et al., 2021).

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo biomédico de excelência em ecotoxicologia e avaliação terapêutica (Choi et al., 2021; Nishimura et al., 2016). Suas vantagens incluem: tamanho reduzido, fácil manutenção, ciclo de vida curto, alta taxa reprodutiva e embriões transparentes (Ribeiro et al., 2022; TERAOKA; DONG; HIRAGA, 2003). A similaridade de aproximadamente 70% de seu genoma com o humano, incluindo genes envolvidos em sistemas de metabolização enzimática (Citocromo P450), neurotransmissores e vias de sinalização nervosa complexas, o torna uma ferramenta valiosa para investigações científicas, permitindo a análise combinada de fisiologia e mecanismos moleculares (Hill et al., 2005; Hinton et al., 2005; Spitsbergen et al., 2003; Vignet et al., 2013).

Estudos indicam que diferenças individuais, de linhagem e sexo, influenciam as respostas do zebrafish a manipulações genéticas, ambientais e farmacológicas. Variações no comportamento locomotor e de cardumes, bem como nas respostas a substâncias em diferentes estágios de desenvolvimento, foram observadas entre linhagens como AB e TU. Por exemplo, a linhagem AB exibe um padrão diurno e comportamento mais ansioso em ambiente novo, enquanto a TU apresenta atividade mais uniforme e maior exploração (Gao et al., 2016; Liu et al., 2014; Vignet et al., 2013).

Considerando que estudos anteriores com reteno focaram apenas na embriotoxicidade em linhagens wild-type (WT), este estudo comparou a sensibilidade de diferentes linhagens de

zebrafish (*Danio rerio*) ao reteno (WT, AB e TU), de forma a identificar a linhagem mais sensível para futuros estudos transgeracionais e aprofundar o conhecimento sobre a toxicologia do reteno.

Metodologia

Zebrafish adultos (*Danio rerio*, linhagem WT), com idade média de 6 meses, foram adquiridos de uma fazenda local em Natal-RN, Brasil, e mantidos no Laboratório de Peixes (FishLab) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os peixes foram aclimatados em tanques do sistema de rack automatizado (ZebTEC Active Blue Stand Alone - Tecniplast®) sob um fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Eles foram alimentados de duas a três vezes ao dia com *Artemia* sp. (*Artemia* salina do RN®, Brasil) e ração comercial em flocos (Alcon Basic®, Brasil; 60% de proteína e 15% de gordura). Os tanques de acrílico mantiveram condições controladas, com sistemas de circulação e renovação de água por filtração mecânica e biológica.

Foram estabelecidos quatro sistemas reprodutivos, cada um composto por três fêmeas e dois machos por tanque de reprodução. Os tanques foram preenchidos com água do sistema e mantidos nas condições mencionadas. A montagem foi iniciada às 17h, e os animais foram mantidos nessas condições durante a noite. O comportamento reprodutivo dos peixes foi observado durante a primeira hora do ciclo claro/escuro, seguido pela coleta de embriões de zebrafish uma hora após o acendimento das luzes. Os ovos viáveis foram identificados pela formação de blástula em até três horas após a fertilização (hpf).

Os experimentos envolveram a exposição de ovos recém-fertilizados a duas concentrações de reteno (500 µg/L e 250 µg/L). Os ovos foram adicionados a uma placa de cultura de 24 poços, com 1 mL da solução previamente preparada e um embrião foi colocado em cada poço. Vinte embriões foram expostos a cada concentração da substância, e quatro embriões foram usados como controles internos na placa. Além disso, a água do sistema e DMSO 0,5% foram usadas como controle negativo e 3,4-dicloroanilina 4mg/L foi usada como controle positivo. Os procedimentos de teste seguiram as diretrizes para teste de embriotoxicidade em peixes (TEF) da OCDE (protocolo nº 236).

A exposição dos embriões ao reteno durou aproximadamente 96 horas, durante as quais as placas foram armazenadas em uma incubadora iluminada, seguindo um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão. O desenvolvimento embrionário foi monitorado usando um estereomicroscópio a cada 24 horas pós-fertilização (hpf) por 120 horas. Durante o desenvolvimento, a toxicidade embrionária foi avaliada para detectar sinais de letalidade, como coagulação do ovo, ausência de formação de somitos, ausência de movimento da base da cauda, ausência de batimentos cardíacos, ocorrência de edema pericárdico, alterações na pigmentação corporal, edema do saco vitelínico, bem como malformações na estrutura da cauda e da medula espinhal.

Durante 96 horas, as larvas foram expostas a concentrações variáveis de reteno (500 µg/L e 250 µg/L), com um grupo controle adicional não tratado para comparação (DMSO 0,5%), a sete dias após a fertilização (dpf) por Creton, 2009. Em resumo, vinte larvas de cada grupo foram transferidas para uma placa de Petri (8,5 cm de diâmetro) e colocadas em um monitor de computador, projetando uma apresentação em PowerPoint com imagens em movimento de listras pretas e brancas (24,5 cm de largura e 1,5 cm de altura). As listras se moveram a uma

taxa de 1 cm/s para cima por 1 minuto e, em seguida, para baixo por 1 minuto, repetidas 10 vezes com intervalos de 5 segundos entre a apresentação do movimento para cima e para baixo. Em cada intervalo, foi registrado se as larvas se posicionavam a favor do movimento das listras [resposta optomotora positiva (OMR+)] ou na direção oposta [resposta optomotora negativa (OMR-)].

O comportamento das larvas foi registrado usando uma webcam Logitech C525 HD posicionada acima da placa de Petri. Cada intervalo gerou uma imagem (um total de 20 por grupo), que foi analisada usando o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). O ImageJ foi usado para determinar a orientação larval identificando os eixos X e Y do centroide. O Microsoft Excel foi então empregado para avaliar as posições larvais e determinar se elas estavam orientadas positivamente [OMR+] ou negativamente [OMR-], calculando a média para cada grupo. A comparação entre os grupos foi conduzida considerando o número total de respostas positivas. O experimento foi conduzido em duplicata.

Resultados e Discussões

Para avaliar a toxicidade do reteno em diferentes diluições (500 µg/L e 250 µg/L) em embriões/larvas de zebrafish das linhagens AB, WT e TU, examinamos a taxa de sobrevivência global. A exposição dos embriões de zebrafish ao reteno por 96 horas pós-fertilização (hpf) resultou em variações na taxa de sobrevivência entre as diferentes linhagens. Para a linhagem AB, a taxa de sobrevivência foi de 94% no controle negativo e 93% no grupo exposto a 0,5% de DMSO. Já nas concentrações de reteno, a sobrevivência foi de 83% para 250 µg/L e 88% para 500 µg/L. O controle positivo (3,4-dicloroanilina 4mg/L) apresentou uma taxa de sobrevivência muito menor, de 20%, como esperado. Na linhagem WT, as taxas de sobrevivência foram de 95% para o controle negativo, 98% para o grupo DMSO, e 100% e 86% para as concentrações de reteno de 250 µg/L e 500 µg/L, respectivamente. O controle positivo resultou em 0% de sobrevivência. Por fim, a linhagem TU demonstrou taxas de sobrevivência de 100% nos grupos controle negativo e DMSO, enquanto as concentrações de reteno de 250 µg/L e 500 µg/L resultaram em 91% e 95% de sobrevivência, respectivamente. O controle positivo também apresentou 0% de sobrevivência.

A análise da toxicidade embrionária também incluiu a avaliação de malformações, como edemas, alterações na pigmentação e malformações da cauda. A análise estatística One-way ANOVA revelou diferenças significativas entre as médias ($P < 0.05$) nas linhagens AB e WT. O teste de comparações múltiplas de Tukey's foi então aplicado para identificar as diferenças específicas. Na linhagem AB, o teste de Tukey's indicou que a concentração de reteno de 500 µg/L causou um aumento estatisticamente significativo nas malformações em comparação com o Controle Negativo ($P = 0,0155$), o grupo exposto a DMSO ($P = 0,0155$) e a concentração de 250 µg/L de reteno ($P = 0,0456$). Na linhagem WT, a concentração de 500 µg/L de reteno também demonstrou um aumento significativo nas malformações em comparação com o Controle Negativo ($P = 0,0052$), o grupo DMSO ($P = 0,0052$) e a concentração de 250 µg/L de reteno ($P = 0,0052$). Por outro lado, a linhagem TU não apresentou diferenças significativas nas taxas de malformação entre os grupos de tratamento.

Uma análise da taxa de precisão das larvas seguindo o movimento das listras durante o teste comportamental em zebrafish 7 dias pós-fertilização (dpf) revelou diferenças de sensibilidade

entre as linhagens (WT, AB e TU). A exposição ao reteno causou uma diferença estatisticamente significativa no comportamento optomotor apenas nas larvas da linhagem AB. A análise de contingência para a linhagem Optomotor AB demonstrou um resultado altamente significativo ($\chi^2 = 88,75$, $df = 2$, $p < 0.0001$). Em contraste, as análises para as linhagens Optomotor WT ($\chi^2 = 1,840$, $df = 2$, $p = 0,3984$) e Optomotor TU ($\chi^2 = 2,506$, $df = 2$, $p = 0,2857$) não revelaram um efeito estatisticamente significativo do reteno no comportamento das larvas.

O presente estudo demonstrou que a toxicidade do reteno em embriões de Zebrafish varia significativamente entre as linhagens, corroborando pesquisas anteriores que indicam diferenças individuais na mortalidade e na resposta inflamatória (Padovani et al., 2022). A linhagem AB foi a mais sensível, exibindo uma notável redução na sobrevivência já na concentração de 250 $\mu\text{g/L}$, enquanto a linhagem WT mostrou um padrão de letalidade dose-dependente mais alinhado com o esperado. Em contrapartida, a linhagem TU destacou-se pela sua maior resistência, apresentando as menores quedas na taxa de sobrevivência em ambas as concentrações. A identificação dessa variabilidade é um achado significativo para a ecotoxicologia, reforçando a necessidade de considerar o reteno como um contaminante ambiental relevante e, por sua maior sensibilidade, sugere que a linhagem AB é um modelo promissor para futuros estudos transgeracionais e de aprofundamento da toxicologia do composto.

Além da letalidade, o reteno induziu malformações embrionárias de forma dose-dependente nas linhagens AB e WT, no qual a concentração mais alta de reteno (500 $\mu\text{g/L}$) foi a que causou malformações significativas. Isso reforça a toxicidade do composto, mostrando um efeito dose-dependente na indução de defeitos de desenvolvimento. A ausência de diferenças significativas em malformações na linhagem TU, somada à sua maior taxa de sobrevivência, sugere que essa linhagem possui uma maior resistência aos efeitos tóxicos do reteno, tanto em nível letal quanto subletal. É notável que a linhagem AB, embora tenha apresentado uma letalidade considerável na concentração de 250 $\mu\text{g/L}$, só demonstrou um aumento estatisticamente significativo de malformações na concentração mais alta (500 $\mu\text{g/L}$). Em outro estudo utilizando etanol foi verificado que existem diferenças dependentes da cepa e da dose na sensibilidade à exposição ao composto durante o desenvolvimento em zebrafish, sugerindo que a sensibilidade de um indivíduo à perturbação dos processos de desenvolvimento induzidos pelo etanol é influenciada por fatores genéticos (Loucks et al., 2004). Isso pode indicar que os mecanismos de toxicidade do reteno podem afetar a sobrevivência antes de causarem malformações visíveis nessa linhagem, o que merece investigações futuras.

A avaliação do reflexo optomotor adicionou uma dimensão neurocomportamental à toxicidade do reteno, reforçando o padrão de sensibilidade entre as linhagens. Nossos resultados indicam que o reteno induziu uma alteração significativa no comportamento optomotor apenas na linhagem AB, corroborando a sua maior sensibilidade observada nos testes de sobrevivência. Este achado é particularmente relevante, uma vez que a ausência de um efeito neurocomportamental na linhagem WT e TU sugere que a sensibilidade do sistema nervoso ao reteno é variável entre as linhagens, um fator que deve ser considerado em avaliações ecotoxicológicas. A alteração do reflexo optomotor está em consonância com estudos anteriores, que revelaram efeitos genotóxicos e alterações neurocomportamentais em zebrafish adultos expostos ao reteno, associados a desequilíbrios redox e a alterações na expressão de genes relacionados a neurotransmissores (Júnior et al., 2021). Assim, nossos dados sugerem que o reteno possui potencial neurotóxico, e que o reflexo optomotor é um

endpoint sensível para a avaliação de sua toxicidade, especialmente em linhagens mais suscetíveis como a AB.

Conclusão

O estudo demonstrou que a toxicidade do reteno em embriões de zebrafish varia significativamente entre as linhagens. A linhagem AB foi a mais sensível, apresentando redução de sobrevivência e alterações neurocomportamentais, enquanto a linhagem TU mostrou-se a mais resistente. A detecção de efeitos em múltiplos parâmetros reforça a necessidade de considerar o reteno como um contaminante ambiental relevante, apesar de sua não priorização. A identificação da linhagem AB como um modelo mais sensível é crucial para futuros estudos sobre a toxicologia desse composto.

Referências

- Bansal, V., Kim, K.-H., 2015. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environ. Int.* 84, 26e38. <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.016>>.
- Boström, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 110, 451e488. <<https://doi.org/10.1289/ehp.02110s3451>>.
- Choi TY, Choi TI, Lee YR, Choe SK, Kim CH. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med.* 2021 Mar;53(3):310-317. doi: 10.1038/s12276-021-00571-5. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33649498; PMCID: PMC8080808.
- Creton, R., 2009. Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research* 203, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.04.030>
- Eriksson, A. N., Rigaud, C., Krasnov, A., Wincent, E., Eeva-Riikka, V. Exposure to retene, fluoranthene, and their binary mixture causes distinct transcriptomic and apical outcomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) yolk sac alevins. *Aquatic Toxicology*, Volume 244, 2022, 106083, ISSN 0166-445X. <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106083>>.
- Gao, Y., Zhang, G., Jelfs, B., Carmer, R., Venkatraman, P., Ghadami, M., Brown, S. A., Chi Pui Pang, Leung, Y., Chan, R. H. M., Zhang, M. Computational classification of different wild-type zebrafish strains based on their variation in light-induced locomotor response, *Computers in Biology and Medicine*, Volume 69, 2016, Pages 1-9, ISSN 0010-4825. <<https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2015.11.012>>.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Peixe-zebra como vertebrado modelo para investigação de toxicidade química. *Toxicol Sci* 2005;86:6–19.
- Hinton DE, Kullman SW, Hardman RC, Volz DC, Chen PJ, Carney M, et al.: Resolvendo mecanismos de toxicidade enquanto busca relevância ecotoxicológica? *Março Pollut Bull* 2005;51:635–648.

IARC, 2016. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In: Outdoor Air Pollution, vol. 109. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon, France: IARC, 2010. (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 92).

JIANG, S.; FANG, D. AN; XU, D. Transcriptome analysis of *Takifugu obscurus* liver in response to acute retene exposure. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 55, n. 10, p. 1188–1200, 23 ago. 2020.

Junior, F. C., Agues-Barbosa, T., Luchiari, A. C., Batistuzzo, S. R., 2021. Genotoxicity and behavioral alterations induced by retene in adult zebrafish. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 9, Issue 6, 2021, 106518, ISSN 2213-3437. <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106518>>.

Liu, X., Guo, N., Lin, J., Zhang, Y., Chen, X. Q., Li, S., Lin He, Qiang Li. Strain-dependent differential behavioral responses of zebrafish larvae to acute MK-801 treatment, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Volume 127, 2014, Pages 82-89, ISSN 0091-3057. <<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.11.007>>.

Loucks, E., Carvan, M. J., Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish, *Neurotoxicology and Teratology*, Volume 26, Issue 6, 2004, Pages 745-755, ISSN 0892-0362, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.017>.

NISHIMURA, Y. et al. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenital Anomalies*, v. 56, n. 1, p. 18–27, 2016.

OCDE, O. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (Test Guidelines 236). OECD Publishing, n. July, p.29, 2013.

Padovani, B. N., et al. Different wild type strains of zebrafish show divergent susceptibility to TNBS-induced intestinal inflammation displaying distinct immune cell profiles, *Current Research in Immunology*, Volume 3, 2022, Pages 13-22, ISSN 2590-2555, <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2021.12.003>.

PEIXOTO, M. S. et al. Oxidative stress, mutagenic effects, and cell death induced by retene. *Chemosphere*, v. 231, p. 518–527, set. 2019.

Ribeiro, O., 2022. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. *Rev. Ciência Elem.*, V10(02):021. <doi.org/10.24927/rce2022.021>.

Spitsbergen JM, Kent ML. O estado da arte do modelo de peixe-zebra para pesquisa em toxicologia e patologia toxicológica – vantagens e limitações atuais. *Toxicol Pathol* 2003;31: 62–87.

TERAOKA, H.; DONG, W.; HIRAGA, T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenital Anomalies*, v. 43, n. 2, p. 123–132, 2003.

Vehniäinen, E.-R., Haverinen, J. and Vornanen, M. (2019), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Phenanthrene and Retene Modify the Action Potential via Multiple Ion

Currents in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Cardiac Myocytes. *Environ Toxicol Chem*, 38: 2145-2153. <<https://doi.org/10.1002/etc.4530>>.

Vignet C, Bégout ML, Péan S, Lyphout L, Leguay D, Cousin X. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish*. 2013 Sep;10(3):365-75. doi: 10.1089/zeb.2013.0871. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23738739.

CÓDIGO: SB0448

AUTOR: FLAVIO DO NASCIMENTO GOMES

ORIENTADOR: HUGO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ROCHA

TÍTULO: DESENVOLVIMENTO DE BLENDS CONSTITUÍDOS DE AGARANAS E EXTRATOS VEGETAIS COMO AGENTES ANTIOXIDANTES E ANTIOBESIDADE

Resumo

O estresse oxidativo, um desequilíbrio entre moléculas reativas e as defesas antioxidantes do corpo, é um fator crítico que agrava as complicações associadas à obesidade. O uso de compostos naturais com atividade antioxidante surge como uma estratégia promissora para mitigar este quadro. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a atividade antioxidante in vitro de blends formulados com o polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria birdiae* (GB) e extratos aquosos da folha de seriguela (*Spondias purpurea*). Para isso, foram preparados diferentes blends (BL1, BL2 e BL3) e seus potenciais antioxidantes foram analisados por meio de testes de Quelatação de cobre e Poder Redutor. Os compostos isolados apresentaram atividade antioxidante significativa. Contudo, não foi observado efeito sinérgico ou aditivo significativo nos blends formulados. Concluiu-se que, embora GB e SP sejam agentes antioxidantes eficazes individualmente, sua combinação nas proporções estudadas não potencializa esta atividade, indicando a ausência de sinergia entre os componentes.

Palavras-chave: estresse oxidativo. Polissacarídeos sulfatados. extratos. Obesidade

TITLE: Development of Antioxidant and Anti-obesity Blends from Agarans and Plant Extracts.

Abstract

Oxidative stress, an imbalance between reactive molecules and the body's antioxidant defenses, is a critical factor that aggravates the complications associated with obesity. The use of natural compounds with antioxidant activity emerges as a promising strategy to mitigate this condition. The objective of this work was to develop and evaluate the in vitro antioxidant activity of blends formulated with the sulfated polysaccharide from the alga *Gracilaria birdiae* (GB) and aqueous extracts of the seriguela leaf (*Spondias purpurea*) (SP). For this purpose, different blends were prepared using a factorial design (BL1, BL2, and BL3), and their antioxidant potentials were analyzed by means of Copper Chelating and Reducing Power assays. The isolated compounds showed significant antioxidant activity. However, no significant synergistic or additive effect was observed in the formulated blends. It was concluded that, although GB and SP are effective antioxidant agents individually, their combination in the studied proportions does not enhance this activity, indicating an absence of synergy between the components.

Keywords: Oxidative Stress; Sulfated Polysaccharides; Extracts; Obesity.

Introdução

1.1 A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (Lamiquiz-Moneo et al., 2019), podendo estar associada a diversas complicações que, por sua vez, causam e agravam outras doenças agudas e crônicas e reduzem a expectativa de vida (Bray et al., 2018). Considerada uma epidemia mundial (Moini et al., 2020), a prevalência da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016, ano em que mais de 650 milhões de adultos foram considerados obesos em todo o mundo (WHO, 2022). Projeções da Federação Mundial de Obesidade indicam que este cenário continuará se agravando, com números alarmantes esperados para 2030 (World Obesity Federation, 2022), afetando inclusive o Brasil, onde se projeta que 29,7% dos adultos se enquadrem na definição de obesidade neste período (World Obesity Atlas, 2022). Um dos fatores críticos que ligam a obesidade às suas comorbidades é o estresse oxidativo, um desequilíbrio entre moléculas reativas e as defesas antioxidantes do corpo (Manna; Jain, 2015). A obesidade pode induzir o estresse oxidativo de forma sistêmica por meio de diversos mecanismos bioquímicos, como geração de superóxido via NADPH oxidases, disfunção tecidual e inflamação crônica (Serra et al., 2013; Fernandez-Sanchez et al., 2011). Nesses casos, o sistema de defesa antioxidante endógeno não é suficiente, tornando o uso de substâncias antioxidantes exógenas uma estratégia terapêutica promissora (Pisoschi; Pop, 2015; Liguori et al., 2018). Nesse contexto, investigam-se fontes naturais com potencial bioativo. A alga vermelha *Gracilaria birdiae* é reconhecida por produzir um polissacarídeo sulfatado (agarana), denominado aqui como GB. Estudos anteriores demonstraram que a GB possui diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória (Brito et al., 2014), antioxidante (Fidelis et al., 2014; Oliveira et al., 2020) e, de forma relevante para este estudo, atividade antiadipogênica, inibindo a diferenciação de pré-adipócitos (Barros et al., 2018). Outro organismo que pode ser citado é a planta *Spondias purpurea*, popularmente conhecida como seriguela, ela é amplamente encontrada no Nordeste do Brasil e frequentemente citada em levantamentos etnobotânicos (Freitas et al., 2012). Seu uso tradicional inclui o tratamento de diversas condições, como problemas gástricos (Almeida et al. 2017), diarreia, diabetes e para a redução do colesterol, sendo as folhas mais utilizada na forma de chá (Marisco & Pungartnik, 2015). Apesar de estudos fitoquímicos já terem analisado os frutos e cascas da *S. purpurea*, há pouca informação científica sobre a composição química das folhas, assim como não há estudos que elucidem os efeitos antioxidantes do extrato aquoso da folha. A abordagem de combinar diferentes compostos em blends surge como uma estratégia para potencializar atividades biológicas por meio de efeitos sinérgicos. Um precedente de sucesso foi a combinação da agarana GB com picolinato de cromo, que demonstrou proteger células do estresse oxidativo de forma mais eficiente que os componentes isolados (Campanelli-Morais et al., 2023). Contudo, apesar do potencial conhecido da GB e da *S. purpurea*, não foram encontrados na literatura estudos que investiguem a formulação de um blend composto por estes dois extratos, bem como a avaliação de sua atividade antioxidante combinada. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver blends a partir do polissacarídeo sulfatado Agarana, da alga *G. birdiae* e do extrato aquoso das folhas de *S. purpurea* e avaliar, in vitro, suas atividades antioxidantes.

Metodologia

2.1 Extração da Agarana sulfatada da *Gracilaria birdiae* A alga marinha *Gracilaria birdiae* (35-40 cm de comprimento) foi coletada na Praia de Rio do Fogo (Rio Grande do Norte, Brasil — 5 ° 16'16 " S / 35 ° 22'54 " W). O material foi limpo e levado ao laboratório (Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN). Os polissacarídeos foram extraídos

como descrito em (OLIVEIRA et al., 2020). Cerca de 0,3 g de amostra seca foi obtida a partir de 60 g de alga seca. A coleta da alga foi realizada mediante autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, SISGEN nº A72AD2B. 2.2 Preparo do extrato aquoso da folha de seriguela *Spondias purpurea* L As folhas foram coletadas no assentamento Cajá, no município de Touros (Rio Grande do Norte, Brasil —5 ° 24'17.4 " S 35 ° 46'22.2 " W) O material foi limpo e levado ao laboratório (Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN). As folhas foram desidratadas em estufa a 60 °C até atingir estado crocante. Após secas, foram trituradas e armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Para o extrato, foi utilizado 100 g da folha em 1 L de água destilada, que ficou em maceração durante 24 h em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, congelado e liofilizado para posteriores procedimentos e análises. Cerca de 19 g de amostra seca foi obtida a partir de 100 g de folha seca. A coleta da alga foi realizada mediante autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, SISGEN nº 54064-1. 2.3 Caracterização Química 2.3.1 Dosagem de Açúcares totais A quantificação de açúcares totais foi determinada pelo método fenol/ácido sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956) 2.3.2 Dosagem de Sulfato O teor de sulfato presente nas amostras foi quantificado pelo método gelatina-bário proposto por Dogson & Price (1962). 2.3.3 Dosagem de Proteínas As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). 2.3.4 Dosagem de compostos Fenólicos Os compostos fenólicos foram quantificados utilizando o reagente de Folin Ciocalteau. como descrito anteriormente (MELO-SILVEIRA et al., 2012) 2.4 Formulação dos Blends 2.4.1 Blends de diferentes proporções foram produzidos, utilizando esquema de sinais. BL1 (50% GB / 50% SP), BL2 (75% GB / 25% SP) e BL3 (25% GB / 75% SP). 2.5 Eletroforese em gel de agarose O método utilizado foi o de Dietrich e Dietrich (1976) que é específico para polissacarídeos sulfatados. 2.6 Atividade de Poder Redutor. O poder redutor das amostras foi quantificado seguindo o protocolo descrito por Costa e colaboradores (2010). As amostras GB, SP, BL1, BL2 e BL3 foram incubadas com tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e ferricianeto de potássio 1% (m/v) por 20 min a 50 °C. Posteriormente, o ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) foi adicionado para interromper a reação, seguido da adição do cloreto de ferro 0,1% (m/v). O ácido ascórbico foi utilizado como padrão. A leitura é realizada em espectrofotômetro a 700nm. 2.7 Atividade Quelante de Íon Cuproso (Cu²⁺). A capacidade de quelar cobre das amostras foi determinada utilizando o método de Megías et al., (2009). As amostras foram adicionadas em microplaca juntamente com violeta de pirocatecol e sulfato de cobre II pentahidratado, sendo a mistura homogeneizada. A absorbância foi medida a 632 nm. Para o controle é utilizado EDTA.

Resultados e Discussões

3.1 Caracterização química Para a Agarana (será referida como GB) foram feitos testes para sua caracterização. Dosagem de açúcar, que estimou 87%. Dosagem de proteínas; ~0,5%. Compostos fenólicos; 1% Dosagem de sulfatos; ~11% no extrato obtido da *G. biridiae* (melhor evidenciado na Tabela 1). Para o extrato aquoso da folha de seriguela (referida como SP); Dosagem de açúcar: 93%. Dosagem de proteínas 1%. Dosagem de fenólicos ~5%. 3.2 Testes Antioxidantes No teste Poder redutor foi verificado uma atividade de BL1 de 95% na concentração de 1,5 mg/mL, se sobressaindo tanto dos compostos isolados a essa mesma concentração, quanto dos outros blends (Gráfico 1). No entanto, quando o BL1 foi escolhido como mais promissor e mais concentrações foram analisadas nesse teste, foi encontrado um fenômeno de saturação na amostra SP, que atinge seu ápice de 90% de atividade a 0,75

mg/mL e quando passa disso, sua atividade declina, explicando o porquê de na concentração 1,5mg/mL BL1 ser tão superior (Gráfico 2). No teste que analisa a capacidade de quelar íons cobre, SP e GB isolados mostraram uma excelente atividade quelante em baixas concentrações. No entanto, suas atividades são parcialmente perdidas quando juntas no BL1 nesse teste (Gráfico 3).

Conclusão

- No teste Poder Redutor, evidenciou-se que BL1 e BL3 são bons redutores, mas sua atividade não é produto de uma sinergia.
- Na Quelação de Cobre, GB e SP demonstram potencial quelante, que não foi amplificado no BL1. Outros blends compostos de Agarana e outros extratos vegetais devem ser produzidos e estudados. São necessários também mais estudos bibliográficos e acerca da estrutura da Agarana para conseguir melhor prever suas interações físico-químicas.

Referências

ABOLHASSANI¹, Moussa 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. AJAMZIBAD, Hosein 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. Aliasgharpour M. LOWERING EFFECTS OF LEMON AND FRESH GARLIC LIQUID MIXTURE ON SERUM LIPIDS LEVEL IN HYPERCHOLESTEROLEMIC WOMEN. Int J Med Invest. 2014; 3 (2). 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, v. 141, p. 223–232, 2016. ASLANI, Negar 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. ALMEIDA, C. L. F. et al. Spondias purpurea L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2017, Article ID 6593073, p. 1-14, 2017. AYU, Rafiqah 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, 25 out. 2018. BARROS-GOMES, Joanna Angelis Costa 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, 1 ago. 2018. BHARDWAJ, Raju Lal; PANDEY, Shruti. 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, v. 9, n. 1, p. 124–138, 2011. COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 64, n. 1, p. 21–28, 2010. CÁCERES, A. et al. Plants

used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 30, n. 1, p. 55-73, 1990. Dhanavade, M.J. et al. (2011). Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, 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*, v. 84, n.1, p. 106, 1962. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Anal. Chem*, [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*, 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*, v. 9, n. 12, p. 1-24, 2020. FREITAS, A. V. L. et al. Plantas medicinais: um estudo etnobotânico nos quintais do Sítio Cruz, São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 1, p. 48-59, 2012. FERREIRA, Anderson O. et al. Postulated Adjuvant Therapeutic Strategies for COVID-19. *Journal Of Personalized Medicine*, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 80, 5 ago. 2020. FIDELIS, Gabriel 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. FLORA, Gagan D.; NAYAK, Manasa 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, 17 dez. 2019. GARA, T. Y. et al. Toxicological studies of aqueous and ethanol leaf extract of *Spondias purpurea* (red plum) in rats. *Clinical Phytoscience*, v. 7, n. 90, p. 1-9, 2021 GUPTA, Rajeev; MOHAN, Indu; NARULA, Jagat. 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*, v. 83, p. 42-49, 2016. HASHEMI, Marjan Mohammadi; AMINLARI, Mahmoud; MOOSAVINASAB, Marzieh. 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, Abid 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*, v. 102, n. 1, p. 185-191, 2014. Larimi, S. G., Darzi, H. H., & Darzi, G. N. Fabrication and characterization of polyaniline/xanthan gum nanocomposite: Conductivity and thermal properties. *Synthetic Metals*, 162(1-2), 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*, v. 8, n. 3, p. 207 - 2011, 30 Oct. 2013. LI, Tao 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. MAO, Wenjun 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. McCann, J. et al. Poly(vinylamine) microgel-dextran composite hydrogels: Characterisation; properties and pH-triggered degradation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 449, 21-30, 2015. MELO-SILVEIRA, Raniere Fagundes 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, 29 dez. 2011. Messinger-Rapport, B. J., & Sprecher, D. (2002). Prevention of cardiovascular diseases. Clinics in Geriatric Medicine, 18(3), 463–483. Moosavy M. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Lemon (Citrus limon) Peel in Vitro and in a Food Model . J. Food Qual. Hazards Control. 2017; 4 (2) :42-48. MARISCO, G.; PUNGARTNIK, C. Spondias purpurea L. (Anacardiaceae): traditional uses, chemical composition and biological activities. Scientia Amazonia, v. 4, n. 2, p. 10-18, 2015. NASEEM, Adila et al. Effect of herbal formulation intake on health indices in albino Wistar rat model. Food Science & Nutrition, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 441-448, 10 nov. 2020. NOFAR, Mohammadreza et al. Poly (lactic acid) blends: processing, properties and applications. International Journal Of Biological Macromolecules, [S.L.], v. 125, p. 307-360, mar. 2019. OLIVEIRA, Leticia Castelo... [Esta referência parece estar incompleta] OLIVEIRA,

Anexos

Tabela 1: Resultados da caracterização da Agarana (GB) e do extrato aquoso da folha de seriguela (SP)

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose evidenciando a Agarana, um polissacarídeo sulfatado dotado de carga.

Gráfico 1: Mostra o possível sinergismo obtido no BL1.

Gráfico 2: compara as diferentes concentrações, evidencia que não há sinergismo, mesmo com uma alta atividade antioxidante nesse teste.

Gráfico 3: comparação entre as atividades quelantes das amostras evidenciando a incompatibilidade entre as amostras.

CÓDIGO: SB0449

AUTOR: LETICIA MEDEIROS CAVALCANTE GUIMARAES

COAUTOR: CARINA IONÁ DE OLIVEIRA TORRES

ORIENTADOR: ELAINE CRISTINA GAVIOLI

TÍTULO: Efeito da cetamina e DMT em modelo animal de depressão induzida pela exposição crônica à hidro cortisona

Resumo

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença neuropsiquiátrica crônica e apresenta limitações no tratamento com antidepressivos convencionais, como início tardio de ação e baixa eficácia em parte dos pacientes. Nesse contexto, a cetamina e a N,N-dimetiltriptamina (DMT) surgem como alternativas de ação rápida. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos comportamentais da S-cetamina, antidepressivo padrão, e da DMT em modelo de depressão induzido pela exposição crônica à hidro cortisona em camundongos Swiss machos. Os animais receberam hidro cortisona (0,03 mg/ml) na água de beber durante 21 dias e, em seguida, foram tratados com dose única de S-cetamina ou DMT (10 mg/kg, ip). Após o tratamento, foram submetidos ao teste de preferência pela sacarose, campo aberto e nado forçado. A exposição crônica à hidro cortisona reduziu a preferência pela sacarose, caracterizando anedonia, sem alterar a atividade locomotora espontânea. Tanto a S-cetamina quanto a DMT reverteram a anedonia em até 120 horas após a administração. No nado forçado, apenas a DMT reduziu significativamente o tempo de imobilidade 48 horas após a administração; efeito não mantido até 120 horas pós-tratamento. Esses achados confirmam a replicabilidade no nosso laboratório do modelo de depressão decorrente da exposição à hidro cortisona e sugerem que a DMT apresenta efeito antidepressivo, semelhante ao fármaco de referência, em camundongos.

Palavras-chave: Depressão. Cetamina. DMT. Hidro cortisona. Camundongo.

TITLE: Effect of ketamine and DMT in an animal model of depression induced by chronic hydrocortisone exposure

Abstract

Major Depressive Disorder (MDD) is a chronic neuropsychiatric illness, and its treatment with conventional antidepressants presents limitations such as delayed onset of action and low efficacy in a subset of patients. In this context, ketamine and N,N-dimethyltryptamine (DMT) have emerged as rapid-acting alternatives. The aim of this study was to evaluate the behavioral effects of S-ketamine, a reference antidepressant, and DMT in a depression model induced by chronic exposure to hydrocortisone in male Swiss mice. Animals received hydrocortisone (0.03 mg/ml) in the drinking water for 21 days and were subsequently treated with a single dose of S-ketamine or DMT (10 mg/kg, i.p.). Following treatment, mice were subjected to the sucrose preference test, open field test, and forced swim test. Chronic

hydrocortisone exposure reduced sucrose preference, indicating anhedonia, without altering spontaneous locomotor activity. Both S-ketamine and DMT reversed anhedonia up to 120 hours after administration. In the forced swim test, only DMT significantly reduced immobility time 48 hours after administration; however, this effect was not sustained at 120 hours post-treatment. These findings confirm the reproducibility of the hydrocortisone-induced depression model in our laboratory and suggest that DMT exerts antidepressant-like effects, comparable to the reference drug, in mice.

Keywords: Depression. Ketamine. DMT. Hydrocortisone. Mouse.

Introdução

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença neuropsiquiátrica crônica que acomete 4,4% da população mundial e cuja incidência apresenta aumento significativo especialmente nos últimos anos (Organização Pan-Americana da Saúde, 2025). A experimentação com modelos animais se baseia na mimetização da doença e administração de drogas que tenham a capacidade de reverter a situação clínica acometida (Willner, 2002), auxiliando, dessa forma, o desenvolvimento de novos fármacos. Embora muitas descobertas no campo da psiquiatria tenham ocorrido de forma empírica, os modelos animais continuam essenciais para compreender mecanismos farmacológicos e identificar terapias mais seguras (Alexander *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o modelo de exposição repetida a glicocorticóides, como a hidrocortisona, é uma opção que mostra eficiência no estudo de antidepressivos (Zhao *et al.*, 2008). Esse modelo, de forma lenta, tem a capacidade de mimetizar as alterações fisiopatológicas graduais que um paciente apresenta no quadro depressivo (Sternier; Kalynchuk, 2010; Olausson *et al.*, 2013). Os antidepressivos clássicos, incluindo os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs), possuem limitações que impactam diretamente na eficácia e na adesão ao tratamento. Três são os grandes desafios dos antidepressivos convencionais, a citar demora para início do efeito terapêutico, os efeitos adversos advindos com o tratamento e baixa eficácia em cerca de 30% dos pacientes depressivos que fazem uso desta medicação (Taylor *et al.*, 2006; Barth *et al.*, 2016; De Crescenzo *et al.*, 2025).

Diante desse cenário de limitações, a cetamina, anestésico dissociativo que atua no organismo como um antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), emergiu como uma abordagem inovadora para o tratamento da depressão. Ao contrário dos ISRS, a cetamina promove um alívio rápido dos sintomas depressivos, após poucas horas de uma única administração (Berman *et al.*, 2000). Estudos clínicos também relatam que os efeitos terapêuticos da cetamina são duradouros, ou seja, podem ser observados até 1 semana depois de uma única administração (Coyle; Laws, 2015). No entanto, convém elencar os efeitos adversos dissociativos e, principalmente, o risco de abuso (Zanos; Gould, 2018). Essas restrições reforçam a necessidade da busca por substâncias com mecanismos de ação semelhantes, mas que apresentem maior tolerabilidade e segurança.

Nesse contexto, a N,N-dimetiltriptamina (DMT), um alcaloide alucinógeno estruturalmente semelhante ao neurotransmissor serotonina (5-HT), vem ganhando destaque. Atuando como agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, a DMT tem demonstrado potencial antidepressivo e ansiolítico (Machado *et al.*, 2020), surgindo

como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de antidepressivos de rápida ação, com a perspectiva de causar menos efeitos adversos em comparação à cetamina.

Tendo em vista que modelos animais de depressão, como o da ingestão oral repetida de hidrocortisona, permitem estudar a depressão por mimetizar nos animais a etiologia do transtorno e os sintomas, que são revertidos com fármacos antidepressivos, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos comportamentais de dois compostos, a S-cetamina (fármaco de referência) e a DMT, que apresenta evidência de ação antidepressiva em humanos, no modelo de exposição repetida à hidrocortisona.

Metodologia

Animais

Camundongos Swiss machos (produzidos a partir da colônia do Biotério do Centro de biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte) 8-12 semanas de idade, foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 06:00 da manhã) em temperatura ambiente constante ($22 \pm 1^\circ \text{C}$). Os animais foram alojados em, no máximo, 8 camundongos/gaiolas de polipropileno ($43 \times 30 \times 16 \text{ cm}$) com acesso a ração e água ad libitum até o início dos experimentos. Posteriormente, foram mantidos em caixas-moradias isolados durante toda a realização dos experimentos. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRN), certificado nº 284.010/2022.

Drogas e tratamentos

Para a realização deste estudo foram utilizadas as seguintes drogas: succinato de hidrocortisona sódica (Cayman Chemical, Cambridge Bioscience), disponível na água de beber do animal, que será mantido isolado durante a exposição à droga. O succinato de hidrocortisona sódica foi solubilizado em água na concentração de 0,03 mg/ml (Gourley *et al.*, 2008). Foi testado o efeito da S-cetamina (Cristália, SP, Brasil), um antidepressivo de ação rápida em humanos, com o intuito de validar as condições experimentais. A hidrocortisona foi ofertada ininterruptamente na água de beber dos animais durante 30 dias. A cetamina e o fumarato de N,N-dimetiltriptamina (DMT), ambos na dose de 10 mg/kg, intraperitoneal (ip), foram administrados uma única vez, 21 dias após a exposição oral à hidrocortisona. As doses escolhidas de S-cetamina e DMT para uso neste estudo foram baseadas em estudos prévios (Fukumoto *et al.*, 2017; Cameron *et al.*, 2018). Durante a realização dos experimentos, os animais foram semanalmente pesados e o consumo de ração foi registrado.

Testes comportamentais

Foram empregados os seguintes testes comportamentais, a citar: teste de preferência pela sacarose, campo aberto e nado forçado.

Teste de preferência pela sacarose (TPS): os animais, durante o experimento, tiveram acesso a duas garrafas, uma contendo solução de sacarose a 1 % e outra contendo água. Após período de adaptação, o consumo de cada líquido foi mensurado em 24 horas, calculando-se a porcentagem de preferência pela sacarose em relação ao volume total ingerido. Ao término do teste, a redução da preferência pela sacarose foi interpretada como anedonia (Primo *et al.*, 2023).

Teste do campo aberto (Open Field Test, OFT): utilizou-se uma arena (40x40x40 cm) para medir a locomoção espontânea dos animais (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2018). Cada animal foi colocado no centro da arena e observado por 30 minutos. Foi registrada a distância total percorrida (em milímetros) pelo animal por uma vídeo câmera conectada a um PC, através do software de rastreamento animal AnyMaze (Stoelting Co, USA).

Teste do nado forçado (Forced Swim Test, FST): empregado para avaliar o desespero comportamental, esse teste utiliza um cilindro transparente (30 cm de altura x 20 cm de diâmetro) contendo água a 25 ± 1 °C em 15 cm do recipiente, obtendo profundidade suficiente para impedir apoio no fundo (Can *et al.*, 2012). O teste teve duração total de 6 minutos, sendo analisados os 4 minutos finais. Foram registrados os tempos de imobilidade (em segundos), que seria o tempo gasto fazendo apenas os movimentos necessários para permanecer com a cabeça fora da água. Reduções no tempo de imobilidade após tratamento indicaram efeito antidepressivo.

Desenho experimental

Os seguintes grupos experimentais foram testados neste estudo, seguindo a sequência de testes comportamentais e a linha de tempo apresentada na figura 1:

Grupo 1: Água mineral (21 dias, vo) + SALINA (1x, ip);

Grupo 2: CORT 0,03 mg/ml (21 dias, vo) + SALINA (1x, ip);

Grupo 3: CORT 0,03 mg/ml (21 dias, vo) + S-cetamina 10 m/kg (1x, ip);

Grupo 4: CORT 0,03 mg/ml (21 dias, vo) + DMT 10 m/kg (1x, ip).

Análise estatística

Os dados foram tabulados pelo software Microsoft Excel e analisados utilizando o software GraphPad Prism 9.0. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os múltiplos grupos experimentais foram comparados utilizando ANOVA de uma via ou duas vias, a depender do conjunto de dados analisados e conforme descrito nos resultados, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. A significância estatística foi determinada em $P < 0,05$.

Resultados e Discussões

Resultados

Os efeitos da administração aguda de S-cetamina e DMT foram avaliados no modelo de depressão induzida pela exposição à hidro cortisona durante 21 dias em camundongos. Neste protocolo, conforme ilustrado na figura 1a, observou-se redução significativa do peso corpóreo dos animais expostos à hidro cortisona por 21 dias comparados aos controles (Fig. 2a, $p < 0,05$, teste t, $t = 7,60$, $df = 58$). Porém, o tratamento em dose única com S-cetamina ou DMT não mitigou tal perda de peso (Fig. 2a, $p < 0,05$, ANOVA 1-via, teste de Tukey, $F(3,55) = 11,29$). Na figura 2b observa-se que nem a exposição repetida à hidro cortisona, nem os tratamentos com S-cetamina ou DMT não alteram a ingestão de ração em camundongos comparado ao controle (Fig. 1b, $p > 0,05$).

Dos animais expostos à hidrocortisona por 21 dias, observou-se que 39 % não apresentaram nenhuma redução na preferência por sacarose, portanto, sendo excluídos da análise no teste de preferência por sacarose. Além disso, calculou-se que 12 % dos animais que iniciaram o estudo, naturalmente não apresentavam preferência pela ingestão de sacarose em relação à água, sendo também excluídos das análises no teste de preferência por sacarose. A figura 3a representa o padrão de preferência por sacarose nos diversos grupos ao longo do tempo (Fig. 2a, ANOVA 2-vias, teste de Tukey, efeito do tempo: $F(3,132)=5,49$, $p<0,05$, efeito do tratamento: $F(3,132)=5,50$, $p<0,05$, interação: $F(9,132)=2,27$, $p<0,05$). Observou-se que enquanto o grupo controle manteve a preferência por sacarose elevada durante todo o período de avaliação, o grupo exposto à hidrocortisona apresentou gradual redução do consumo de sacarose, apontando uma diferença estatística 120 h após o tratamento com salina (Fig. 3a, $p<0,05$). Por outro lado, observa-se que o tratamento com S-cetamina e DMT foram capazes de reverter o perfil anedônico dos animais 5 dias, mas não 48 h após a injeção (Fig. 2a, $p<0,05$ para ambos). A administração única de S-cetamina ou DMT mostrou resultados pertinentes para a reversão do quadro de anedonia após 120h, mas não em 48h. Tal fato possui aspecto potencialmente relevante para este estudo, tendo em vista que sugere que o efeito antidepressivo tanto da S-cetamina quanto da DMT, não se manifestaram de forma plena em curto prazo na reversão da anedonia.

A figura 3b ilustra que o consumo total de líquidos ingeridos durante o período de observação não foi afetado significativa nem pela exposição à hidrocortisona nem pelos tratamentos com S-cetamina e DMT, excluído possíveis vieses relacionados ao consumo de líquidos que pudessem prejudicar a interpretação dos dados. Cabe mencionar que a redução significativa na preferência pela sacarose, por exemplo, foi um dos pontos de destaque para essa evidência, sendo responsável por modelar os mecanismos desreguladores da etiologia da doença (Frazer; Morilak, 2005). Além disso, a ausência de alterações na ingestão de líquidos reforça que o déficit observado pode sim estar relacionado com a perda de interesse aos estímulos que tragam prazer ao animal, e não a distúrbios de apetite ou hidratação (Liu *et al.*, 2018).

A figura 4 ilustra o efeito dos tratamentos com S-cetamina, DMT ou veículo nos testes da natação forçada e campo aberto em camundongos expostos à hidrocortisona. Na figura 4a, observa-se que a exposição à hidrocortisona não afetou o tempo de imobilidade dos camundongos na natação forçada, porém o tratamento com DMT, mas não S-cetamina, reduziu significativamente a imobilidade 48 h após a injeção (Fig. 4a, ANOVA 1-via, seguida do teste de Tukey, $F(3,54)=3,68$, $p=0,02$), enquanto que este efeito não é mais significativo 120 h após o tratamento (Fig. 3a, $p>0,05$).

Tais alterações comportamentais observadas em animais tratados com DMT, mas não de S-cetamina, após 48 h do tratamento no teste de natação forçada, podem ser possivelmente devido à dose de S-cetamina utilizada. Dados do nosso laboratório mostram que foram necessárias doses maiores que 10 mg/kg de S-cetamina (i.e., 30 mg/kg) para reduzir a imobilidade em animais com fenótipo depressivo induzido por choques nas patas. Estudos futuros com o objetivo de avaliar os efeitos de S-cetamina em doses maiores no teste da natação forçada em animais expostos repetidamente à hidrocortisona são necessários.

Em relação à locomoção espontânea dos animais (Fig. 4b), observa-se que nem a exposição repetida à hidrocortisona nem o tratamento com S-cetamina e DMT foram capazes de alterar significativamente a distância percorrida acumulada em 30 min de observação, sugerindo que as alterações observadas na imobilidade dos camundongos tratados com DMT

no teste da natação forçada não se devem a uma ação na locomoção. Esse controle é fundamental para garantir que os efeitos detectados sejam de fato relacionados ao estado afetivo e não a alterações motoras.

Os resultados deste estudo demonstram que a exposição crônica à hidrocortisona foi eficaz na indução do fenótipo depressivo em camundongos, sendo destacado, principalmente, pela diminuição significativa no peso corpóreo dos animais e na perda da preferência por solução de sacarose. Neste contexto, a administração de S-cetamina em dose subanestésica, utilizada como um fármaco antidepressivo de ação rápida de referência, promoveu reversão do comportamento anedônico sem alterar a locomoção espontânea dos animais. Os efeitos promovido pelo DMT em animais com fenótipo depressivo se assemelham à ação da S-cetamina, sendo possível observar um padrão temporal semelhante entre o DMT e a S-cetamina na reversão da anedonia. Na natação forçada, não foi observada alteração do comportamento animal após exposição oral repetida à hidrocortisona, mas apenas os camundongos tratados com DMT apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade em comparação com o grupo controle (água + salina) 24 h após o tratamento. Porém, o efeito do tipo antidepressivo da DMT observado no teste da natação forçada não se manteve para além das 24 h após a administração. Em conjunto, esses achados indicam que o DMT promoveu efeito antidepressivo semelhante à ação da S-cetamina em camundongos expostos a um modelo de depressão neuroendócrino por reverter o comportamento anedônico induzido pela exposição crônica à hidrocortisona.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o modelo de depressão induzida por exposição crônica à hidrocortisona é eficaz para reproduzir alterações comportamentais compatíveis com o fenótipo depressivo, podendo ser revertido tanto com a administração da S-cetamina quanto da DMT. Além disso, no teste de natação forçada, em 48h, a DMT apresentou redução significativa do tempo de imobilidade, enquanto com a S-cetamina esse perfil não foi observado. Dessa forma, este trabalho contribui para o entendimento comparativo de dois antidepressivos de ação rápida no contexto de um modelo pré-clínico que mimetiza a progressão gradual das alterações fisiológicas associadas à depressão crônica.

Referências

ALEXANDER, Laith et al. Preclinical models for evaluating psychedelics in the treatment of major depressive disorder. **British Journal of Pharmacology**, 2024.

BARTH, Michael et al. Efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors and adverse events: meta-regression and mediation analysis of placebo-controlled trials. **The British Journal of Psychiatry**, v. 208, n. 2, p. 114-119, 2016.

BERMAN, Robert M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351-354, 2000.

CAMERON, Lindsay P. et al. Effects of N, N-dimethyltryptamine on rat behaviors relevant to anxiety and depression. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1582-1590, 2018.

CAN, Adem et al. The mouse forced swim test. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 59, p. 3638, 2012.

COYLE, C. M.; LAWS, K. R. The use of ketamine as an antidepressant: a systematic review and meta-analysis. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 30, n. 3, p. 152-163, 2015.

DE CRESCENZO, Franco et al. Real-world effects of antidepressants for depressive disorder in primary care: population-based cohort study. **The British Journal of Psychiatry**, v. 226, n. 5, p. 278-287, 2025.

FRAZER, A.; MORILAK, D. A. What should animal models of depression model?. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 515-523, 2005.

FUKUMOTO, Kenichi et al. Antidepressant potential of (R)-ketamine in rodent models: comparison with (S)-ketamine. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 361, n. 1, p. 9-16, 2017.

GOURLEY, Shannon L. et al. Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 884-890, 2008.

KRAEUTER, Ann-Katrin; GUEST, Paul C.; SARNYAI, Zoltán. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. In: **Pre-clinical models: techniques and protocols**. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 99-103.

LIU, Meng-Ying et al. Teste de preferência por sacarose para medição de anedonia induzida por estresse em camundongos. **Nature protocols**, v. 13, n. 7, p. 1686-1698, 2018.

MACHADO, Lilian Carvalho et al. Aspectos farmacológicos e toxicológicos do alcaloide N, N-Dimetiltriptamina (DMT). **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 259-259, 2020.

OLAUSSON, Peter et al. Persistent effects of prior chronic exposure to corticosterone on reward-related learning and motivation in rodents. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 3, p. 569-577, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Depressão. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>. Acesso em: 21 ago. 2025.

PRIMO, Maria Joao et al. Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. **European Neuropsychopharmacology**, v. 77, p. 80-92, 2023.

STERNER, Erin Y.; KALYNCHUK, Lisa E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777-790, 2010.

TAYLOR, Matthew J. et al. Early onset of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant action: systematic review and meta-analysis. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 11, p. 1217-1223, 2006.

WILLNER, P.; MITCHELL, P. J. The validity of animal models of predisposition to depression. **Behavioural pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 169-188, 2002.

ZANOS, Panos; GOULD, Todd D. Mecanismos de ação da cetamina como antidepressivo. **Molecular psychiatry**, v. 23, n. 4, p. 801-811, 2018.

ZHAO, Yunan et al. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **European journal of pharmacology**, v. 581, n. 1-2, p. 113-120, 2008.

Anexos

Esquema experimental do protocolo escolhido para a indução do fenótipo depressivo por exposição crônica à hidro cortisona em camundongos e posterior avaliação dos efeitos comportamentais da S-cetamina e DMT (N,N-dimetiltriptamina).

Efeito do tratamento com S-cetamina e DMT (ambos em 10 mg/kg, ip) no peso corpóreo e ingestão de ração em camundongos após exposição à hidro cortisona por 21 dias.

Reversão do comportamento anedônico induzido pela exposição à hidro cortisona por 21 dias em camundongos tratados com S-cetamina e DMT (ambos 10 mg/kg, ip).

Efeito do tratamento com S-cetamina e DMT (ambos em 10 mg/kg, ip) no comportamento de camundongos submetidos aos testes da natação forçada e campo aberto após exposição à hidro cortisona por 21 dias.

CÓDIGO: SB0450

AUTOR: AYRON MATEUS MATIAS ALVES

COAUTOR: LUCAS EMANUEL DA SILVA FERREIRA

COAUTOR: ELIAS DOS SANTOS BATISTA

COAUTOR: HELOISA MARTINS FRANCA

COAUTOR: LUIS FELIPE PEREIRA DANJOUR

ORIENTADOR: DENISE MORAIS LOPES GALENO

TÍTULO: Perfil polissonográfico durante a sesta diurna: impacto na saúde cardiovascular.

Resumo

Estudos indicam que o estresse universitário pode alterar o ritmo circadiano, atingindo a saúde cardiometabólica. A carga de trabalho acadêmico está associada à má qualidade do sono e impactos negativos na saúde. Mas a relação entre cochilos e o risco cardiovascular é pouco explorada, justificando a relevância deste trabalho. O estudo teve como objetivo descrever o perfil polissonográfico e cardiovascular de 17 estudantes universitários durante um cochilo em laboratório, utilizando metodologia descritiva, transversal e analítica. Os participantes foram submetidos a exames clínicos e questionários, seguidos por uma polissonografia diurna e actigrafia. Os resultados preliminares mostraram Tempo Total de Sono (TST) médio de 22,6 min ($\pm$ 23,33 min) e Eficiência do Sono (SE) de 55,37% ($\pm$ 18,70%), sendo que a maioria dos participantes apresentou sono NREM. Outras análises indicam correlação negativa entre IMC e variabilidade da frequência cardíaca (RMSSD) ($r=-0,78$; $p=0,022$), e entre latência do sono (SOL) e atividade parassimpática (pNN50) ($r=-0,75$; $p=0,032$). Ademais, maiores escores de insônia ($r=-0,64$; $p=0,018$) e depressão ($r=-0,61$; $p=0,025$) foram correlacionados com menor atividade parassimpática (RMSSD). Por fim, o estudo recomenda a ampliação da amostra e pesquisas longitudinais para a análise da relação entre cochilos, estresse e saúde cardiovascular.

Palavras-chave: Polissonografia. Universidade. Cochilo. Sono. Cardiovascular.

TITLE: Polysomnographic profile during the daytime nap: impact on cardiovascular health

Abstract

Studies indicate that university stress can alter the circadian rhythm, affecting cardiometabolic health. Academic workload is associated with poor sleep quality and negative health impacts. However, the relationship between napping and cardiovascular risk is underexplored, justifying the relevance of this work. The study aimed to describe the polysomnographic and cardiovascular profile of 17 university students during a laboratory nap, using a descriptive, cross-sectional, and analytical methodology. Participants underwent

clinical exams and questionnaires, followed by a daytime polysomnography and actigraphy. Preliminary results showed a mean Total Sleep Time (TST) of 22.6 min (± 23.33 min) and Sleep Efficiency (SE) of 55.37% ($\pm 18.70\%$), with most participants showing NREM sleep. Further analyses indicate a negative correlation between BMI and heart rate variability (RMSSD) ($r=-0.78$; $p=0.022$), and between sleep latency (SOL) and parasympathetic activity (pNN50) ($r=-0.75$; $p=0.032$). Additionally, higher scores for insomnia ($r=-0.64$; $p=0.018$) and depression ($r=-0.61$; $p=0.025$) were correlated with lower parasympathetic activity (RMSSD). Finally, the study recommends expanding the sample and conducting longitudinal research to analyze the relationship between napping, stress, and cardiovascular health.

Keywords: Polysomnography, University, Nap, Sleep, Cardiovascular.

Introdução

Nos últimos anos, a questão dos distúrbios do sono tem se tornado cada vez mais relevante, especialmente após a pandemia de COVID-19, que provocou profundas alterações nos hábitos de vida globais (CASAGRANDE et al., 2020). Esses distúrbios englobam uma ampla gama de condições clínicas que podem afetar negativamente todos os sistemas do organismo, com especial atenção ao sistema cardiovascular (DRAGER et al., 2018). Existe um corpo de evidências que sugere que a má qualidade do sono aumenta o risco de doenças cardiovasculares (GALENO et al., 2023), uma vez que o estresse crônico desregula o ritmo circadiano. Esse desequilíbrio leva à variabilidade na duração e no horário do sono e ao jet lag social, fatores que potencializam os riscos cardiometabólicos.

Nesse contexto, o ambiente acadêmico, tanto para docentes quanto para discentes, é um epicentro de estresse. Estudantes universitários enfrentam currículos extensos, numerosas exigências acadêmicas e avaliações frequentes, fatores que contribuem para altos níveis de estresse (WAQAS et al., 2015). Embora um nível moderado de estresse possa ser benéfico para a aprendizagem, níveis excessivos impactam negativamente a saúde física e mental dos alunos, prejudicando o funcionamento cognitivo, a concentração e o desempenho acadêmico (Dahlin; Joneborg; Runeson, 2005).

A fisiologia do sono é um processo complexo, dividido em duas fases principais: sono NREM (não-rapid eye movement) e sono REM (rapid eye movement), que compõe cerca de 20% do tempo total de sono (AASM, 2018). Durante essas fases, o sistema nervoso autônomo (SNA) modula as funções cardiovasculares e respiratórias (Cellini et al., 2016; DRAGER; KRIEGER, 2009). A pressão arterial (PA), por exemplo, geralmente é mais baixa durante o sono, reduzindo-se ainda mais no sono NREM e retornando aos níveis da vigília no sono REM (Taylor et al., 2015). A ausência dessa queda noturna da PA é um forte preditor de mortalidade cardiovascular (Dolan ET AL., 2005), e picos de PA ao acordar estão associados a um maior risco de acidente vascular cerebral (AVC) (Kario; Shimada; Pickering, 2003). A variabilidade da frequência cardíaca (VFC), um indicador da atividade autonômica, também está diretamente ligada à saúde cardiovascular, sendo que uma VFC reduzida é um fator de risco para morbidade e mortalidade (Thayer et al., 2010).

Os ritmos circadianos cardiovasculares são cruciais para a transição do sono para a vigília, e a desregulação desse ritmo, por meio de privação de sono, trabalho por turnos ou jet lag, tem impactos significativos na saúde, levando a doenças cardiovasculares e renais (Martino et al., 2008). O núcleo supraquiasmático (SCN), localizado no hipotálamo, é o nosso relógio biológico central, sincronizado por estímulos fóticos (ciclo claro/escuro) e não-fóticos, como

horários de alimentação e exercícios (Gooley, 2001; Klerman et al., 2001). Embora a relação entre sono noturno e saúde cardiovascular seja bem estabelecida, a influência do cochilo diurno ainda é uma área pouco explorada. Nossa hipótese é que cochilos podem oferecer benefícios à saúde cardiovascular e mental, diminuindo eventos cardiovasculares associados a distúrbios do sono.

Metodologia

O presente estudo adotou um delineamento descritivo, transversal e analítico, empregando uma abordagem quantitativa e qualitativa. A coleta de dados será realizada através da aplicação de formulários, exames clínicos, incluindo polissonografia, actigrafia e uma avaliação física geral.

Inicialmente, os participantes passaram por uma anamnese completa e um exame clínico para coleta de dados antropométricos, como Índice de Massa Corpórea (IMC) e circunferência do pescoço (CP), além da medição do índice de Mallampati modificado (Silveira; Duarte, 2010). Em seguida, foram aplicados questionários validados cientificamente para avaliar a sonolência diurna (Epworth, Johns, 1991), ansiedade e depressão (Escala hospitalar de ansiedade e depressão, BOTEGA et al., 1995), o nível de estresse percebido (COHEN et al., 1983) e a qualidade geral do sono (Índice de qualidade de sono de Pittsburgh, BERTOLAZI et al., 2008). O estudo incluiu uma polissonografia (PSG) diurna em voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idades entre 18 e 59 anos. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o projeto será submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFRN).

Para o registro polissonográfico, os participantes foram orientados a dormir pelo menos sete horas na noite anterior e a evitar estimulantes como cafeína e chá, além de atividades físicas intensas no dia do experimento. Cada participante compareceu ao laboratório entre 12h30 às 13h30 para ter um cochilo de aproximadamente 60 a 120 (considerando que o voluntário tenha adormecido). O horário foi escolhido com base em estudos que mostram que cochilos no meio da tarde, por volta das 13h30, são ideais para capturar as proporções adequadas de sono N2, N3 e REM (Cellini et al., 2016; Mednick, Nakayama, & Stickgold, 2003; Miki K et al., 2013).

O exame de polissonografia utilizou o equipamento Neuron-Spectrum-4© (Neurosoft, Ivanovo, Rússia), seguindo as diretrizes da American Academy of Sleep Medicine (AASM). Foram coletadas diversas variáveis fisiológicas, incluindo eletroencefalograma (EEG), eletro-oculograma (EOG), eletromiograma (EMG) e eletrocardiograma (ECG), além de dados sobre fluxo oro-nasal, ronco, esforço respiratório, saturação de oxigênio, posição corporal e movimento de membros (Abrahamyan et al., 2018). Os dados foram pontuados manualmente por um fisioterapeuta qualificado, em períodos de 30 segundos, seguindo os critérios da AASM. As variáveis de pontuação incluirão o tempo total de sono (TST), eficiência do sono (SE), vigília após o início do sono (WASO), latência do sono e os estágios NREM e REM.

O equipamento de polissonografia registrou o eletrocardiograma para a medição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), quantificada através dos intervalos RR em diferentes estágios do ciclo vigília-cochilo. A frequência respiratória foi controlada como uma possível variável de confusão. A análise da VFC será realizada para os estágios N1, N2,

N3 e REM, bem como em períodos de cinco minutos antes e depois do cochilo, garantindo a ausência de artefatos ou despertares.

Ademais, também se utilizou a actigrafia para avaliar o ritmo circadiano dos participantes em estudo. A técnica consiste na monitorização de diversas variáveis, como temperatura corporal, exposição a luz e movimentação, através de um dispositivo de pulso. Os voluntários se comprometeram a utilizar o equipamento por um tempo aproximado de uma semana, para a devida monitorização. Foram feitas as devidas orientações quanto ao uso do actígrafo, sendo recomendado a sua retirada do pulso em momentos específicos, principalmente para evitar danos, e a clicar no “botão de eventos” em caso de alguma situação adversa a rotina de sono e vigília - posteriormente reportada pelo participante.

A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi realizada em Python, utilizando as bibliotecas MNE para a leitura e manipulação de arquivos de ECG em formato EDF, e NumPy, pandas, matplotlib e seaborn para o processamento, cálculo e visualização dos dados. A partir do sinal de ECG, foram extraídos os intervalos de tempo entre os batimentos sucessivos (intervalos RR) para análise nos domínios do tempo e da frequência. No domínio do tempo, as métricas calculadas foram SDNN, RMSSD e pNN50, que refletem, respectivamente, a variabilidade total, a de curto prazo e a estabilidade da frequência cardíaca. Para a análise de domínio da frequência, foi aplicada a Transformada Rápida de Fourier (FFT) para derivar as bandas de potência LF e HF, indicativas das atividades simpática e parassimpática, e a razão LF/HF, que avalia o equilíbrio autonômico.

A população de estudo é composta por uma amostra não probabilística, por conveniência, de profissionais e estudantes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Para inclusão no estudo, os participantes devem ser alunos ou profissionais de ambos os sexos, com idades entre 18 e 59 anos, residentes em Natal-RN ou cidades próximas, e que tenham manifestado interesse em participar. Os critérios de exclusão abrangem participantes com sintomas gripais, doenças neurológicas, usuários de drogas, diagnóstico de síndrome do pânico, gestantes, e aqueles com barreiras cognitivas ou linguísticas que impeçam o preenchimento dos questionários, bem como aqueles que se recusem a permanecer no laboratório ou a assinar o TCLE.

Resultados e Discussões

O presente estudo, com delineamento transversal, teve como objetivo principal descrever o perfil polissonográfico e cardiovascular de uma amostra de 17 estudantes universitários da UFRN, sendo 10 do sexo masculino e 7 do sexo feminino. A média de idade da amostra foi de 22,35 anos, com variação entre 19 e 30 anos. A metodologia, baseada na polissonografia diurna, visou replicar o ambiente de cochilo em laboratório para investigar a arquitetura do sono e suas implicações na saúde cardiovascular, um tema relevante em pesquisas sobre distúrbios do sono em populações universitárias (GALENO et al., 2023; FREITAS et al., 2021).

Análise da Arquitetura do Sono no Cochilo Diurno

A análise dos dados do cochilo diurno revelou uma variabilidade significativa na qualidade do sono entre os participantes, conforme observado em estudos semelhantes sobre o impacto da sesta diurna (CELLINI et al., 2016). A amostra apresentou um Tempo Total de Sono (TST) médio de 22,6 min ($\pm$ 22,33 min), e uma Eficiência do Sono (SE) média de 55,37% ($\pm$

18,7%). A Latência do Sono, que é o tempo decorrido para o início do sono, teve uma média de 13,22 min ($\pm 6,29$ min). O tempo de vigília durante o período de registro foi consideravelmente alto, com uma média de 49,6% ($\pm 22,3\%$), o que sugere uma dificuldade de alguns participantes em iniciar e manter o sono no ambiente do laboratório, um achado compatível com o estresse percebido e a má qualidade de sono frequentemente relatados por estudantes universitários (DEMENECH et al., 2023).

No que tange aos estágios de sono, o percentual de sono NREM foi de 100% em quase todos os participantes que conseguiram dormir. No entanto, quatro participantes não apresentaram registro de sono REM, e um participante não registrou nenhum estágio de sono, permanecendo em vigília durante todo o experimento. A ausência de sono REM em cochilos diurnos é um achado comum, uma vez que o sono REM tende a ocorrer em ciclos de sono mais longos, sendo predominantes os estágios N1 e N2 em sestas curtas (MEDNICK; NAKAYAMA; STICKGOLD, 2003).

Avaliação Cardiovascular

Os dados revelaram um perfil cardiovascular típico para uma população jovem e saudável. A saturação de oxigênio média (SO₂ média) foi de 97,5% ($\pm 0,9\%$), e o número de eventos cardiovasculares foi baixo ou nulo, indicando que os participantes, em sua maioria, não apresentam distúrbios respiratórios graves relacionados ao sono, como a apneia obstrutiva do sono (AOS).

Embora os dados disponíveis não permitam uma análise aprofundada da VFC, a metodologia do estudo prevê uma análise detalhada dos intervalos RR do ECG, que seriam cruciais para essa avaliação. Essa abordagem é consistente com pesquisas que investigam o potencial efeito benéfico dos cochilos diurnos na saúde cardiovascular, por meio da modulação autonômica cardíaca (CELLINI et al., 2016).

Correlações entre Variáveis Polissonográficas, Atividade e Saúde Cardiovascular

A análise de correlações revelou a intrínseca relação entre a qualidade do sono e diversos indicadores de saúde cardiometabólica e atividade circadiana. Os resultados obtidos ecoam e aprofundam achados de estudos anteriores, sugerindo que a irregularidade do sono e a hiperatividade fisiológica podem estar ligadas a fatores de risco, mesmo em uma população jovem.

Um achado notável foi a tendência de correlação entre a frequência cardíaca (FC) em vigília e a insônia ($r = 0,31$; $p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 1. Este resultado está em consonância com a literatura que aponta para uma hiperatividade simpática como um dos mecanismos fisiopatológicos da insônia, refletindo um estado de hiperalerta que impede a transição para o sono (GALENO et al., 2023; DEMENECH et al., 2023). A incapacidade de reduzir a FC ao deitar pode, portanto, servir como um biomarcador para a dificuldade em iniciar o sono.

As Figuras 2 e 3 aprofundam a discussão construindo uma interconexão entre variáveis (frequência cardíaca média e duração do sono semanal em minutos) com o questionário de Pittsburgh, aplicado aos participantes, que busca avaliar a qualidade do sono a partir de respostas dos próprios participantes. A Figura 2 revela uma correlação negativa ($r = -0,42$) entre a pontuação total do questionário de Pittsburgh e a duração do sono semanal, sugerindo que uma menor duração do sono pode estar associada a uma pior qualidade subjetiva. Se

observa também, a partir da Figura 3, uma correlação positiva ($r = 0,15$) entre a frequência cardíaca e o questionário de Pittsburgh. De fato, a má qualidade do sono relatada pelos participantes tende a coincidir com a diminuição da sua duração, reforçando a validade do Questionário de Pittsburgh como uma ferramenta útil na avaliação subjetiva da arquitetura do sono (FREITAS et al., 2021).

A análise do sono, ilustrada pelas Figuras 4 e 5, demonstra o impacto da estabilidade interdiária (IS), uma variável obtida por actigrafia que quantifica a sincronia entre o ritmo de atividade/repouso e o ciclo claro/escuro de 24 horas. Quanto mais a IS se aproxima de 1, mais estável e regular é o ritmo, indicando horários de sono e vigília mais consistentes, próximos a um padrão circadiano saudável. Valores mais baixos, por outro lado, sinalizam dessincronização, que pode estar associada a distúrbios do sono ou a trabalhos em turnos. Ambas as imagens mostram altas correlações entre as variáveis, superiores a $r = 0,8$, com a associação entre a eficiência do sono e a IS alcançando uma correlação próxima a $r = 1$. Isso confirma a forte correlação linear positiva entre as variáveis. Indivíduos com horários irregulares podem não ter um sono de qualidade, ou seja, podem não cumprir todos os estágios do sono, o que leva à redução do estado de alerta e à instalação de um ciclo vicioso de desalinhamento circadiano (ALVINO, 2023).

A Figura 6 apresenta uma forte correlação ($r = 0,86$) entre a latência do sono N2 — o tempo do início da coleta polissonográfica até a primeira ocorrência do estágio N2 — e a variabilidade interdiária (IV), variável também obtida por actigrafia, que quantifica o grau de fragmentação da atividade diária. Valores altos de IV indicam alternância frequente entre atividade e repouso, como cochilos de dia e despertares noturnos. Por sua vez, a Figura 7 explora a relação entre a atividade circadiana e os parâmetros de sono e saúde. A correlação entre o M10, que reflete o nível de atividade durante as dez horas mais ativas do dia, e a latência do sono sugere que uma maior atividade diurna pode estar associada a uma menor latência e a um sono mais consolidado. Isso indica que a rotina interfere diretamente na qualidade do sono. É crucial considerar as implicações do ciclo circadiano e da rotina diária na arquitetura do sono. Conforme discutido, as atividades podem influenciar a qualidade do sono, que, por sua vez, impactam o desempenho diário (MEDEIROS et al, 2021).

Para as análises correspondentes as figuras 8 e 9, a amostra foi composta por 8 participantes (3 do sexo feminino), com idade média de 23,3 ($\pm 3,8$) anos.

Os resultados da análise de correlação de Pearson revelaram a existência de uma associação significativa entre o IMC e a variabilidade da frequência cardíaca, medida através do RMSSD. Observou-se uma correlação negativa de magnitude forte ($r = -0,78$, $p = 0,022$) entre as variáveis. Isto é, o aumento do IMC mostrou-se associado a uma diminuição do RMSSD em repouso (Figura 8). Este achado suporta a hipótese de que um maior índice de massa corporal está relacionado a um tônus parassimpático cardíaco reduzido. De acordo com Habib et al (2024), em estudo realizado por pesquisadores sauditas, e veiculado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, realizada em homens sauditas, demonstrou que o RMSSD (indicador de modulação parassimpática) possui uma correlação negativa com escores de classificação de gordura visceral (CGC), o que corrobora com a hipótese citada anteriormente.

Para avaliar o impacto da variabilidade da frequência cardíaca no início do sono, foi conduzida uma análise de correlação de Pearson entre a latência do início do sono (SOL) e o pNN50 (Figura 9). Foi observada uma correlação negativa forte e estatisticamente significativa ($r = -0,75$, $p = 0,032$). Este resultado indica que maiores valores de pNN50, que

refletem uma maior atividade parassimpática, estão associados a uma menor latência para o início do sono. Em outros estudo (KHAN, 2024), se observou a variabilidade da frequência cardíaca durante o início do sono em pacientes com insônia, identificando valores baixos de pNN50 - o que se leva a concluir que uma menor atividade parassimpática está associada a dificuldades de iniciar o sono.

Para as análises correspondentes as figuras 10 e 11, a amostra foi composta por 13 participantes (6 do sexo feminino), com idade média de 22,5 ($\pm 3,3$) anos.

A fim de investigar a relação entre a regulação autonômica cardíaca e a insônia, uma análise de correlação de Pearson foi realizada entre o escore de insônia e o RMSSD. Os resultados revelaram uma correlação negativa moderada e estatisticamente significativa ($r = -0,64$, $p = 0,018$) (Figura 10). Este achado indica que maiores escores de insônia (pior qualidade do sono) estão associados a menores valores de RMSSD, sugerindo uma supressão da atividade parassimpática em indivíduos com sintomas mais severos de insônia. O estudo realizado por Trevisan et al (2021), identificou uma relação entre um grupo de indivíduos menos ativos fisicamente com uma pior qualidade do sono e insônia, este mesmo grupo também apresentou uma redução na modulação parassimpática. Por fim, para avaliar a relação entre a atividade parassimpática e sintomas depressivos, foi realizada uma correlação de Pearson entre o escore de depressão e os valores de RMSSD (Figura 11). Observou-se uma correlação negativa moderada estatisticamente significativa ($r = -0,61$; $p = 0,025$). Este resultado indica que maiores escores de depressão estão associados a menores valores de RMSSD, sugerindo redução da modulação parassimpática em indivíduos com mais sintomas depressivos.

Conclusão

As conclusões deste estudo demonstram a relevância da polissonografia diurna para avaliar o sono em ambientes de laboratório, e da actigrafia como exame para acompanhar o ritmo sono e vigília, revelando a variabilidade na qualidade do sono em estudantes universitários. Os achados fisiológicos, como a redução da frequência cardíaca durante o sono, indicam um potencial benefício do cochilo para a saúde cardiovascular. Além disso, a análise de correlação aponta para a relação inversa entre o Índice de Massa Corpórea (IMC) e a qualidade do sono, destacando a influência do peso corporal nos padrões de sono, mesmo em cochilos curtos.

Em suma, embora a amostra seja pequena, este estudo preliminar oferece dados valiosos que reforçam a hipótese de que o cochilo diurno pode ter impactos positivos na saúde cardiovascular e metabólica. Sugere-se que futuras pesquisas ampliem o número de participantes e realizem avaliações longitudinais para aprofundar a compreensão da relação entre cochilos, estresse e saúde cardiovascular.

Referências

AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Versão 2.5, 2018.

CASAGRANDE, M. FAVIERI, F., TAMBELLI, R., FORTEB, G. The enemy who sealed the world: Effects quarantine due to the COVID-19 on sleep quality, anxiety, and psychological distress in the Italian population. Sleep Med, 2020 MAIO 2020.

CELLINI, N. et al. The physiological function of sleep: The relationship between sleep architecture, heart rate variability and brain waves. In: Encyclopedia of Sleep. Academic Press, 2016.

DAHLIN M, Joneborg N, Runeson B. Stress and depression among medical students: a cross-sectional study. Med Educ. 2005 Jun;39(6):594-604.

DOLAN E, et al. Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: the Dublin outcome study. Hypertension. 2005;46(1):156–161.

DEMENECH, L. M. et al. Relação entre o estresse percebido e a qualidade do sono em estudantes universitários. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2023.

DRAGER, L. F.; KRIEGER, H. M. Padrão cardiovascular do sono: implicações clínicas na hipertensão arterial. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 55, n. 3, p. 343-348, 2009.

FREITAS, J. V. et al. Qualidade do sono e jet lag social em estudantes universitários. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 23512-23525, 2021.

GALENO, D. M. L. et al. Impacto da sesta diurna sobre a variabilidade da frequência cardíaca. Natal: SIGAA/UFRN, 2023.. Disponível em:<https://sigaa.ufrn.br/sigaa/pesquisa/resumoCongresso.do?dispatch=view&id=176279196>. Acesso em: 20 ago. 2025.

GOOLEY JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. Nat Neurosci. 2001;4(12):1165.

MEDNICK, S. C.; NAKAYAMA, K.; STICKGOLD, R. The role of sleep in motor-skill learning. Journal of Cognitive Neuroscience, v. 15, n. 6, p. 921-932, 2003.

Miki K, Yoshimoto M. Sympathetic nerve activity during sleep, exercise, and mental stress. Auton Neurosci 174: 15–20, 2013.

HABIB, Syed S. et al. A Variabilidade da Frequência Cardíaca em Repouso está Independentemente Associada aos Escores de Classificação de Gordura Visceral em Homens Adultos Sauditas. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2024. Disponível em:<https://abccardiol.org/article/a-variabilidade-da-frequencia-cardiaca-em-reposo-esta-independentemente-associada-aos-escores-de-classificacao-de-gordura-visceral-em-homens-adultos-sauditas/>. Acesso em: 26 ago. 2025.

Kario K, Shimada K, Pickering TG. Clinical implication of morning blood pressure surge in hypertension. J Cardiovasc Pharmacol. 2003;42(Suppl 1):S87–S91.

KAN, Khurshid A. et al. Heart rate variability during sleep onset in patients with insomnia with or without comorbid sleep apnea. Sleep and Breathing, v. 28, n. 3, 2024. Disponível em:<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11806931/>. Acesso em: 26 ago. 2025.

Klerman EB, Duffy JF, Dijk DJ, Czeisler CA. Circadian phase resetting in older people by ocular bright light exposure. J Investig Med. 2001;49:30-40.

SOUZA-SILVA, Vanessa de et al. Qualidade do Sono Associada ao Nível Habitual de Atividade Física e Sistema Nervoso Autônomo de Fumantes. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 115, n. 4, p. 741-750, 2020. Disponível

em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/KfxkqTmDQDdjPqB6TZFQfQt/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 26 ago. 2025.

TAYLOR KS, Heneghan CJ, Stevens RJ, Adams EC, Nunan D, Ward A. Heterogeneity of prognostic studies of 24-hour blood pressure variability: systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2015;10(5):e0126375.

THAYER JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. Int J Cardiol. 2010;141(2):122–131.

WAQAS A, Khan S, Sharif W, Khalid U, Ali A. Association of academic stress with sleeping difficulties in medical students of a Pakistani medical school: a cross sectional survey. PeerJ. 2015 Mar 12;3:e840.

Anexos

Figura 1: Correlação entre Insônia e FC. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,31937$).

Figura 2: Correlação entre duração do sono semana (min) e pontuação de Pittsburgh. Observa-se tendência negativa entre as variáveis ($r = - 0,4254$).

Figura 3: Correlação entre FC média e pontuação de Pittsburgh. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,15052$).

Figura 4: Correlação entre tempo total de sono (min) e IS 60 case 2. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,86453$).

Figura 5: Correlação entre sleep efficiency e IS 60 case 2. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,98079$).

Figura 6: Correlação entre latência N2 e IV 60 case 2. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,86414$).

Figura 7: Correlação entre latência N2 e M10 Z0. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,42756$).

Figura 8: Correlação entre RMSSD e IMC. Observa-se tendência negativa entre as variáveis ($r = -0,78$; $p = 0,022$).

Figura 9: Correlação entre pNN50 e Sleep onset latency. Observa-se tendência negativa entre as variáveis ($r = -0,75$; $p = 0,032$).

Figura 10: Correlação entre RMSSD e Score Insonia. Observa-se tendência negativa entre as variáveis ($r = -0,64$; $p = 0,018$).

Figura 11: Correlação entre RMSSD e Score Depressão. Observa-se tendência negativa entre as variáveis ($r = -0,61$; $p = 0,025$).

CÓDIGO: SB0456

AUTOR: MARIANA XAVIER DEIGA FERREIRA

COAUTOR: MELINA FERREIRA MARTELLO

ORIENTADOR: GUILHERME ORTIGARA LONGO

TÍTULO: Diversidade, abundância e distribuição espacial de corais zooxantelados no Atol das Rocas

Resumo

Atóis são ilhas oceânicas com recifes em forma de anel. No mundo, já foram relatados mais de 400 atóis, sendo o Atol das Rocas o único do Atlântico Sul. Sua composição se dá principalmente por algas coralinas, gastrópodes e foraminíferos. Este estudo caracterizou a assembleia de corais em piscinas naturais em Rocas, por meio de vídeos gravados em 2021, comparando ambientes abertos (com conexão com o oceano) e fechados (conexão com o oceano apenas na maré alta). Registramos 4.759 colônias de corais e revelamos que, embora as piscinas abertas tivessem maior abundância e maior tamanho de corais, as fechadas apresentaram maior diversidade de espécies, como o coral-cérebro *Mussismilia hispida*, encontrado apenas nelas. A espécie dominante foi o coral-estrela *Siderastrea* sp., mais abundante nas piscinas abertas. Em relação à saúde dos corais, a maioria das colônias estava em boas condições. Entretanto, as piscinas abertas Falsa Barreta e Salão exibiram maiores sinais de estresse, com corais de cores mais claras e com maior mortalidade. Já a piscina aberta Podes Crer, apresentou indicadores de saúde mais próximos aos das piscinas fechadas, sugerindo que há outros fatores ambientais que podem influenciar as piscinas, além do isolamento. Concluímos que o isolamento é um fator importante para a distribuição e saúde dos corais e a importância do monitoramento contínuo para a conservação do atol.

Palavras-chave: Isolamento. *Siderastrea* sp.. Saúde dos corais.

TITLE: Diversity, Abundance and Spatial Distribution of Zooxanthellate Corals in the Atol das Rocas

Abstract

Atolls are oceanic islands with ring-shaped reefs. Worldwide, over 400 atolls have been reported, with the Rocas Atoll being the only one in the South Atlantic. Its composition is primarily made up of coral algae, gastropods, and foraminifera. This study characterized the coral assembly in natural pools in Rocas, using videos recorded in 2021, comparing open environments (connected to the ocean) and closed environments (connected to the ocean only at high tide). We recorded 4,759 coral colonies and revealed that while open pools had greater abundance and larger coral sizes, closed pools exhibited higher species diversity, including the brain coral *Mussismilia hispida*, which was found only in these environments. The dominant species was the star coral *Siderastrea* sp., which was more abundant in open pools. Regarding coral health, most colonies were in good condition. However, the open pools Falsa Barreta and Salão showed greater signs of stress, with corals displaying lighter colors and higher mortality rates. On the other hand, the open pool Podes Crer presented

health indicators more similar to those of closed pools, suggesting that there are other environmental factors influencing the pools beyond isolation. We concluded that isolation is an important factor for the distribution and health of corals and emphasized the importance of continuous monitoring for the conservation of the atoll.

Keywords: Isolation. *Siderastrea* sp.. Coral health.

Introdução

Atóis são recifes oceânicos com aparência de anel, normalmente contendo uma laguna interna e ilhas compostas por depósitos arenosos inconsolidados. No mundo, já foram identificados 425 atóis, sendo a maior parte localizada no Indo-Pacífico (Soares et al., 2010). No Atlântico Sul, encontra-se o Atol das Rocas, o único atol da região e também um dos menores do mundo (Leão e Dominguez, 2000). Segundo Pereira et al. (2010), o maior diâmetro da área apresenta 3,35 km, e o menor 2,49 km, o que totaliza uma extensão de 6,56 km², com um perímetro aproximado de 11 km.

A Reserva Biológica Atol das Rocas foi a primeira Unidade de Conservação (UC) Marinha do Brasil, criada por meio do Decreto Lei Nº 83.549 de 05 de junho de 1979, o que evidencia sua relevância ambiental. Das UCs marinhas brasileiras, esta pode ser considerada a reserva menos afetada por ações antrópicas, uma vez que se encontra mais afastada do continente, servindo como um “controle” e um laboratório natural para estudos (Longo et al., 2015). Na reserva, é possível encontrar espécies endêmicas, espécies sob algum grau de ameaça de extinção, e outras que possuem importância econômica. Além disso, é um local bastante procurado por aves marinhas para a reprodução, atraindo uma grande quantidade de indivíduos de variadas espécies (Fischer et al., 2007).

Esse atol também se torna importante devido a sua formação peculiar e sua diversidade de habitats com diferentes características. Entre os tipos de habitat de Rocas, encontram-se as piscinas naturais, que podem ser divididas entre abertas e fechadas — assim nomeadas conforme o grau de isolamento em relação ao oceano circundante. Enquanto as piscinas abertas têm conexão permanente com o oceano, as piscinas fechadas ficam sem contato com a parte externa do atol nos períodos de maré baixa. Por essa razão, as piscinas fechadas apresentam maiores oscilações de temperatura e salinidade, enquanto as piscinas abertas são mais hidrodinâmicas e estão propensas à ação das ondas (Kikuchi e Leão, 1997; Soares et al., 2011; Longo et al., 2015). Além disso, as piscinas diferem quanto ao sedimento e organismos predominantes: nas abertas, existe um maior domínio de algas calcárias articuladas e corais construtores, enquanto nas fechadas há majoritariamente sedimentos e algas.

Os corais construtores, conhecidos também como “corais verdadeiros” ou “corais duros”, são os escleractíneos zooxantelados, que possuem simbiose com microalgas. No Atol das Rocas como um todo, observa-se maior domínio do coral-estrela *Siderastrea stellata*, mas a sua abundância e tamanho se sobressaem nas piscinas abertas (Longo et al., 2015; Pinheiro et al., 2016; Gaspar, 2018). Já a saúde dos corais pode ser influenciada tanto pelo nível de isolamento quanto por outros fatores ambientais. A coloração dos corais é um bom exemplo de indicador de saúde e está relacionado às microalgas simbiotes. Quando as condições se tornam desfavoráveis, como no caso de estresse térmico, o coral expulsa as microalgas de seu tecido, resultando na perda de pigmentação (Garrido et al., 2016). Esse estresse é um dos principais fatores que afetam a saúde dos corais, podendo levar à mortalidade parcial ou total da colônia, e favorecer o crescimento de outros organismos sobre os corais

(“sobrecrescimento”).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a assembleia de corais construtores em piscinas naturais do Atol das Rocas, sob diferentes condições de isolamento (abertas e fechadas), avaliando a composição e abundância das espécies presentes, o tamanho e estado de saúde das colônias. Considerando que piscinas fechadas apresentam menor hidrodinamismo e condições que podem ser desfavoráveis aos corais, esperava-se encontrar menor riqueza de espécies nessas piscinas em comparação às abertas. Além disso, presumia-se que nas piscinas fechadas haveria corais em pior estado de saúde, com cores mais claras e maiores taxas de mortalidade parcial (sobrecrescimento de outros organismos).

Metodologia

Área de estudo

O Atol das Rocas está localizado a cerca de 230 km do estado do Rio Grande do Norte, no nordeste brasileiro (03°50'S, 33°49'O) (Longo et al., 2015) (Figura 1). Sua formação é composta principalmente por algas coralíneas, gastrópodes vermetídeos, foraminíferos incrustantes e tubos de vermes poliquetas, com uma diversidade relativamente menor de corais construtores, comparado a outros atóis ao redor do mundo (Gherardi e Bosence, 2001; Longo et al., 2015; Pinheiro et al., 2016).

Segundo Longo et al. (2015), a temperatura da superfície do mar ao redor de Rocas varia de 27 a 29°C; em contrapartida, na parte interna do atol, é registrada uma maior variação, entre 24 e 36°C. Há registros, inclusive, de que a temperatura da água pode chegar até 42°C (Soares et al., 2011). Em relação à salinidade, esta pode alcançar até 42‰, mas a média é de 37‰ (Kikuchi e Leão, 1997). Quanto à dinâmica de marés, há duas marés altas e duas marés baixas por dia, com a amplitude podendo variar entre 0 e 3,8 m de altura. Quando em preamar, o atol fica quase todo submerso, exceto por duas ilhas arenosas. Já em baixa-mar, a maior parte do recife fica exposta — momento em que é possível observar os diferentes tipos de piscinas: “abertas” e “fechadas”.

Coleta dos Dados

A coleta dos dados foi realizada por meio da análise de vídeos de seis piscinas do Atol das Rocas que diferem quanto ao grau de isolamento, sendo três fechadas e três abertas. As piscinas fechadas foram a Abrolhos, Âncoras e Tartarugas; as abertas foram a Falsa Barreta, Salão e Podes Crer.

Os registros foram efetuados em uma expedição no verão de 2021, seguindo um protocolo adaptado pelo Reef Check Brasil. Nos vídeos, o perímetro completo das piscinas foi registrado por meio de mergulho livre, com durações variando entre 6 e 16 minutos. A amostragem foi realizada por um mesmo mergulhador, munido de um bastão horizontal de PVC contendo uma fita métrica de 80 cm, utilizada como referência de tamanho.

A análise dos vídeos foi realizada por meio do software Kinovea (Kinovea, 2023), onde é possível obter medidas de tamanho de objetos, controlar a velocidade do vídeo, visualizar o tempo em milissegundos, controlar o zoom, fazer anotações, entre outras funcionalidades. Utilizamos a ferramenta de linha para a medição do tamanho das colônias, após uma calibração com base na fita métrica do bastão; a ferramenta de zoom para uma melhor visualização; e a marcação do tempo em milissegundos, para fins de controle das amostras analisadas.

Para estimar o tamanho das colônias, foram medidos dois diâmetros, um perpendicular ao outro (Figura 2). As medidas obtidas foram multiplicadas por um fator de correção para compensar as variações na distância entre a câmera e o coral. Foi utilizada como referência a distância da câmera ao bastão, considerada uma proporção equivalente a 1 (sem unidade de medida). Por exemplo, se a distância do bastão à colônia fosse aproximadamente metade da distância da câmera ao bastão, o fator de correção seria 1,5 (1 da câmera ao bastão + 0,5 do bastão à colônia). A partir dos diâmetros corrigidos, foi estimada a área da colônia, simplificando a forma dos corais para uma elipse. Posteriormente, os valores de área foram divididos em classes de tamanho.

Além do tamanho, foram registradas, para cada colônia, a identidade do coral (espécie ou gênero); a cor predominante, utilizando a escala de cor Coral Health Chart do programa CoralWatch (Siebeck et al., 2006), que serve para estimar o estado de saúde desses animais de acordo com a intensidade da cor, variando entre 1 e 6 (cores mais claras indicam pior estado de saúde, enquanto cores mais escuras indicam melhor estado de saúde); e a mortalidade parcial, estimada como a porcentagem da colônia que apresenta sobrecrecimento de algas e outros organismos. Assim, compilamos dados sobre a riqueza, composição e abundância das espécies de corais nas piscinas analisadas.

Análises Estatísticas dos Dados

Todos os dados foram tabulados e organizados em planilhas Microsoft Excel, enquanto as análises estatísticas e a geração de gráficos foram realizadas no programa R Studio (Versão 4.3.1; R Core Team, 2023).

Para avaliar os padrões de composição e abundância, foi utilizada a técnica de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS), que permite visualizar a similaridade entre as piscinas com base na abundância de espécies. Para testar se a composição de espécies com base na abundância difere entre os grupos de piscinas com distintos graus de isolamento, foi usada a Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA). Para avaliar se há alguma associação significativa entre as espécies e piscinas, foi aplicado o teste de qui-quadrado. Para verificar se a abundância total de colônias difere entre os graus de isolamento das piscinas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para o tamanho dos corais, foram criadas seis classes: quatro em intervalos de 25 cm² (0-25 cm², 25-50 cm², 50-75 cm², 75-100 cm²), uma entre 100 e 200 cm², e uma para colônias maiores que 200 cm². A divisão em intervalos maiores para as últimas classes se deu por conta da baixa quantidade de colônias maiores e da alta quantidade de colônias menores, dificultando a visualização do padrão geral de tamanho dos corais quando as classes foram divididas em intervalos idênticos. Para testar se essas classes de tamanho estavam relacionadas às piscinas e/ou às espécies, foi aplicado o teste de qui-quadrado.

Para testar se a intensidade de cor predominante das colônias estava associada a certas piscinas ou espécies, também foi aplicado o teste de qui-quadrado. Quanto à mortalidade das colônias, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com a finalidade de testar se havia diferença significativa na porcentagem por piscina e/ou por espécie. Para identificar quais grupos eram diferentes entre si, foi aplicado o teste de Dunn.

Resultados e Discussões

Riqueza, Composição e Abundância

No total, foram registradas 4759 colônias de quatro espécies, das quais 3597 estavam em piscinas abertas e 1162 nas fechadas. A piscina aberta Salão apresentou a maior abundância, com 1591 colônias, enquanto a piscina fechada Abrolhos apresentou a menor quantidade, com apenas 158 colônias. Considerando as seis piscinas em conjunto, a espécie com maior frequência foi o coral-estrela *Siderastrea* sp. ($n = 4501$), seguida do coral-mostarda *Porites astreoides* ($n = 187$), depois o coral-casca-de-jaca *Montastraea cavernosa* ($n = 56$) e, por último, o coral-cérebro *Mussismilia hispida* ($n = 15$). Esses dados se alinham com o que foi observado por Echeverría et al. (1997), *Siderastrea* sp. encontrada em maior abundância, seguida de *Porites* spp..

Visualizando de forma detalhada as espécies que ocorrem em cada piscina (Figura 3) e considerando o isolamento de cada uma, os resultados se mostraram contrários à hipótese inicial. As piscinas fechadas apresentaram maior riqueza de espécies em comparação às abertas. A PERMANOVA, embora não significativa (p -valor = 0.1, $F = 10.41$, $gl = 1$), revelou que o isolamento das piscinas explica uma grande parte da variação na composição e abundância das espécies ($R^2 = 0.72$), apontando que o isolamento é um fator importante para diferenciar as assembleias. O NMDS mostra esse resultado visualmente (Figura 4), possibilitando observar que as piscinas abertas (Falsa Barreta, Podes Crer e Salão) formam um agrupamento mais próximo entre si, assim como as piscinas fechadas (Abrolhos, Âncoras e Tartarugas), o que indica que as piscinas de mesmo isolamento possuem assembleias de corais mais semelhantes entre si.

O teste de qui-quadrado revelou que há uma associação significativa entre espécies e piscinas (p -valor = 0.0004), o que quer dizer que, proporcionalmente, algumas espécies são menos ou mais frequentes que o esperado em certas piscinas. Por exemplo, a frequência de *M. cavernosa* é muito maior que a esperada na piscina Âncoras, enquanto que *P. astreoides* foi mais frequente na piscina fechada Abrolhos. Já a *Siderastrea* sp. teve uma proporção bem menor do que o esperado nas piscinas fechadas. Por outro lado, observa-se que na piscina aberta Falsa Barreta, a frequência de *Siderastrea* sp. foi maior que a esperada, sendo a única espécie de coral encontrada.

A predominância de *Siderastrea* sp., já mencionada na piscina Falsa Barreta, também é observada na piscina aberta Salão. Em contraste, nas piscinas fechadas, como Abrolhos, Âncoras e Tartarugas, a proporção das outras espécies é maior. Na piscina Podes Crer, classificada como aberta, a espécie *Porites astreoides* co-ocorre com *Siderastrea* sp. de maneira um pouco mais balanceada em comparação às demais piscinas abertas, embora seja observada em maior proporção em piscinas fechadas. Isso sugere que, no Atol das Rocas, *P. astreoides* consegue tolerar distintas condições ambientais, como já foi descrito por Eagleson et al. (2023), diferente de outras espécies que, proporcionalmente, foram ainda menos abundantes. No caso de *M. cavernosa* e *M. hispida*, para ambas constatou-se maior proporção de colônias nas piscinas fechadas, com *M. hispida* sendo encontrada exclusivamente nas fechadas (Figura 3). Isso pode indicar que para essas espécies, especialmente *M. hispida*, haja uma maior sensibilidade às condições ambientais das piscinas abertas. Além disso, pode indicar que piscinas fechadas oferecem boas condições para a ocorrência de uma assembleia mais diversa, com maior equilíbrio na proporção de colônias das diferentes espécies de corais.

Apesar da discrepância na abundância entre piscinas abertas ($n = 3597$) e fechadas ($n = 1162$), não foi encontrada diferença significativa quando considerados os dois níveis de isolamento de acordo com o teste de Mann-Whitney. Quando observa-se a diferença na abundância de *Siderastrea* sp. quanto a esse quesito (Figura 5), encontrou-se mais colônias nas piscinas abertas. Tal resultado está de acordo com o que foi descrito por Longo et al. (2015), que relataram maior cobertura de *Siderastrea stellata* nas piscinas abertas, cerca de 8%, enquanto nas fechadas registraram apenas 3%. Logo, é possível que esse ambiente hidrodinâmico seja mais favorável para o crescimento e existência dessa espécie.

Classes de Tamanho

A análise da frequência das classes de tamanho (Figura 6) mostrou que *Siderastrea* sp. foi dominante na menor classe de tamanho (0-25 cm²) quando comparada às espécies *Montastraea cavernosa*, *Mussismilia hispida* e *Porites astreoides*.

O teste de qui-quadrado revelou que há associações significativas entre as classes de tamanho das colônias e as espécies (p -valor = 0,0004). Os resultados mostraram que o coral *Siderastrea* sp. está fortemente relacionado às classes de tamanho menores (0-25 cm²),

enquanto que a espécie *M. cavernosa* apresentou uma grande associação para as classes de tamanho maiores, principalmente maiores de 200 cm².

Similarmente, o teste de qui-quadrado indicou que classes de tamanho também possuem uma relação significativa com as piscinas (p-valor = $\leq 2.2e - 16$), ou seja, o tamanho das colônias depende da piscina. A piscina Falsa Barreta, por exemplo, apresentou uma frequência de corais menores (25 cm²) maior que a esperada, com pouca quantidade de corais maiores. Quando consideradas as outras duas piscinas abertas, Podes Crer e Salão, percebe-se o oposto, uma menor quantidade de colônias menores e uma frequência maior que a esperada de colônias grandes.

As piscinas fechadas Abrolhos, Âncoras e Tartarugas tiveram um padrão semelhante de classes de tamanho, exibindo maior quantidade de colônias menores (Figura 7), o que pode ser uma característica de piscinas fechadas — embora a piscina aberta Falsa Barreta tenha apresentado padrão similar, e com uma proporção ainda maior de colônias menores. Pode ser que outras particularidades além do isolamento provoquem esse resultado para a Falsa Barreta, como, por exemplo, o tamanho da piscina. Apesar desse fator não estar sendo avaliado neste trabalho, a Falsa Barreta contrasta com as outras duas piscinas abertas ao ser a piscina de menor tamanho, o que poderia dificultar o crescimento dos corais devido a competição por recursos.

Coloração

Em nosso estudo, avaliamos tanto a relação entre cor e espécie como entre cor e piscina. Quanto a cor e espécie, foram encontradas associações significativas após a realização do teste de qui-quadrado (p-valor = 0.0004). As espécies que apresentaram maior proporção de colônias com cores mais claras (1-3) foram *M. hispida* e *Siderastrea* sp. (Figura 8). Apesar disso, a maior parte das colônias de todas as espécies analisadas, excluindo *M. hispida*, apresentaram proporcionalmente mais colônias com cores mais escuras (4-6) do que claras, o que indica que a condição de saúde geral dos corais no Atol das Rocas em 2021 era boa.

Para a cor e a piscina, o teste de qui-quadrado também obteve resultado significativo (p-valor = $\leq 2.2e - 16$). Dessa forma, é possível constatar que determinadas piscinas possuem certas cores mais presentes, o que indica que a piscina pode influenciar o estado de saúde dos corais. Diferente da hipótese de que as piscinas fechadas apresentariam corais com coloração mais clara e, conseqüentemente, pior estado de saúde, os resultados mostraram o oposto. Ao observar a proporção de colônias por piscina em relação à cor (Figura 9), percebe-se que as cores mais claras (1-3), que indicam pior estado de saúde, estão mais presentes nas piscinas Salão e Falsa Barreta, ambas abertas. Entretanto, ao observar a outra piscina aberta, Podes Crer, nota-se que ela não segue esse padrão, possuindo colônias com coloração mais escura (4-6), o que indica melhor estado de saúde. Essa diferença sugere novamente que existem outros fatores que podem influenciar nas piscinas, como intensidade luminosa, turbidez da água e até mesmo oscilações no hidrodinamismo habitual.

Gaspar (2018) analisou dados temporais de saúde de *Siderastrea stellata*, no período de 2013 a 2018, e percebeu uma redução significativa na intensidade da coloração das colônias, especialmente nas piscinas abertas Falsa Barreta e Podes Crer, no ano em que ocorreu um forte evento de El Niño, em 2016. Esse padrão também foi observado por Ozekoski et al. (2017), que mostraram mais colônias branqueadas em piscinas abertas do que fechadas no mesmo evento climático. É importante ressaltar que os dados deste trabalho foram coletados no ano de 2021, 5 anos após o referido El Niño. Ainda de acordo com os trabalhos de Ozekoski et al. (2017) e Gaspar (2018), embora tenham registrado corais em pior estado de saúde nas piscinas abertas, ambos confirmam que nessas piscinas houve maior recuperação em comparação às piscinas fechadas.

Mortalidade

Ao investigar se houve diferença na porcentagem de mortalidade parcial entre as espécies, o teste de Kruskal-Wallis retornou um valor significativo de probabilidade ($p\text{-valor} = 3.404e - 14$), o que indica que as espécies são afetadas diferencialmente pela mortalidade e sobrecrecimento de outros organismos. O teste de Dunn mostrou que quase todos os pares de espécies diferiram significativamente entre si, exceto as comparações entre *Mussismilia hispida* e *Porites astreoides*, e entre *Montastraea cavernosa* e *Siderastrea* sp.. As comparações dos outros pares, como *M. cavernosa* e *M. hispida*, *P. astreoides* e *Siderastrea* sp., *P. astreoides* e *M. cavernosa*, e *Siderastrea* sp. e *M. hispida* mostraram diferenças significativas, o que revela que a mortalidade afeta os corais de forma diferente. As espécies *M. hispida* (mediana = 0%) e *P. astreoides* (mediana = 4%) apresentaram os menores valores de mortalidade. Em contrapartida, *M. cavernosa* (mediana = 9%) e *Siderastrea* sp. (mediana = 8%) apresentaram os maiores valores de mortalidade (Figura 10).

Na avaliação da porcentagem de mortalidade entre as piscinas, também foi encontrada diferença significativa ($p\text{-valor} < 2.2e - 16$), o que indica que a mortalidade observada difere entre as piscinas estudadas (Figura 11). Para descobrir quais foram as piscinas que apresentaram diferenças significativas, foi aplicado novamente o teste de Dunn, que mostrou que apenas três pares de piscinas tiveram diferenças insignificantes entre si: Abrolhos-Falsa Barreta; Abrolhos-Salão; e Âncoras-Tartarugas.

Ao avaliar a porcentagem de mortalidade nas piscinas, os resultados mostraram-se parcialmente diferentes da hipótese inicial de que as piscinas fechadas teriam maiores valores de mortalidade parcial. A relação entre o isolamento das piscinas e a mortalidade não é simples. As piscinas fechadas Âncoras e Tartarugas apresentaram medianas de 5% de mortalidade, valores inferiores aos observados nas piscinas abertas Falsa Barreta e Salão (Tabela 1). Conforme revelado por Longo et al. (2015), existe uma maior quantidade de peixes herbívoros em piscinas fechadas por conta da presença de tubarões nas abertas, o que pode sugerir um maior controle de algas nas piscinas fechadas por parte dos herbívoros. Isso, por sua vez, poderia resultar em menor área de mortalidade nos corais, já que o sobrecrecimento de algas pode causar mortalidade por falta de luz e sufocamento nos corais.

Essa pode ser uma das razões para tais resultados, já que as variações entre piscinas abertas e fechadas não se limitam apenas ao isolamento em si, mas também a outros fatores bióticos e abióticos.

Em contrapartida, a piscina fechada Abrolhos exibiu uma das maiores medianas de mortalidade (10%) (Tabela 1). Nesse caso, pode-se sugerir que essa piscina fechada possui um maior impacto de estressores que favorecem o sobrecrecimento algal. Já entre as piscinas abertas, foi observado que a piscina Podes Crer apresentou a menor mediana de mortalidade (5%), similar às piscinas fechadas Âncoras e Tartarugas (Tabela 1). Essa variabilidade entre piscinas abertas e fechadas reforça que existem outras condições específicas para cada local que influenciam essa resposta. Levando em consideração apenas a piscina Podes Crer, seria possível sugerir que ambientes com maior hidrodinamismo proporcionam melhores condições de saúde nesse quesito, com maior área viva e menor mortalidade nas colônias.

No estudo de Gaspar (2018), que também avaliou a saúde dos corais por meio da área viva da colônia, uma das variáveis utilizadas foi a diferença na área viva média de colônias entre piscinas fechadas e abertas, com as piscinas abertas apresentando maior área viva e menor sobrecrecimento algal. No entanto, é importante ressaltar que há uma diferença entre o presente estudo e o citado anteriormente. Neste trabalho, foi avaliada a porcentagem de mortalidade considerando toda a superfície da colônia, enquanto que Gaspar (2018) analisou apenas as áreas de sobrecrecimento que estavam no centro da colônia, rodeadas por tecido vivo, sem incluir o sobrecrecimento que se iniciava na borda da colônia.

Avaliando a saúde dos corais do atol de maneira geral, também é possível correlacionar os dois indicadores de saúde utilizados: coloração e mortalidade parcial. A piscina aberta Podes Crer, por exemplo, apresentou o menor percentual de mortalidade com sobrecrecimento e a melhor tonalidade em suas colônias (Figuras 9 e 11). Esse padrão contrasta com as outras duas piscinas abertas, Salão e Falsa Barreta, visto que ambas tiveram tanto maiores valores de sobrecrecimento (10% e 8%, respectivamente) como colônias com cores mais claras. No entanto, nem sempre os indicadores de saúde foram congruentes entre si, como no caso de Abrolhos, que teve um percentual de sobrecrecimento relativamente alto (10%), mas também apresentou bons índices de coloração em suas colônias.

Conclusão

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a assembleia de corais em piscinas sob diferentes graus de isolamento no Atol das Rocas. Foi possível observar que o fator de isolamento por si só possui uma grande influência sobre as assembleias desses organismos.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as piscinas fechadas, apesar da menor abundância de colônias e de não terem conexão permanente com o oceano, possuem boas condições para abrigar uma maior riqueza de espécies, como demonstrado pela ocorrência do coral-cérebro *Mussismilia hispida*, encontrado exclusivamente nessas piscinas. Além disso, quando se observa os indicadores de saúde, a coloração e a mortalidade foram fatores que apresentaram melhores índices (i.e., cores mais escuras e menor mortalidade) nas piscinas fechadas. Entretanto, a piscina Podes Crer, classificada como aberta, apresentou características que se aproximam mais das fechadas, incluindo a coloração e a mortalidade. Isso reforça que outros fatores podem estar interferindo na dinâmica das piscinas e gerando os padrões observados, como, por exemplo, o vento predominante, o tamanho da piscina, a profundidade, a luminosidade, o substrato, entre outros. Se analisados em conjunto, é possível que produzam um panorama mais completo sobre a estrutura e saúde das assembleias de corais do Atol das Rocas.

Ainda assim, os resultados aqui analisados nos mostram informações importantes sobre as assembleias de corais deste atol. Por exemplo, embora tenham sido observados alguns indicadores de saúde em piores condições (i.e., cores mais claras e maior mortalidade), sobretudo nas piscinas abertas Falsa Barreta e Salão, a saúde da maior parte dos corais no Atol das Rocas parece predominantemente boa no período amostrado (2021). Além disso, este trabalho também evidencia que o coral-estrela *Siderastrea* sp. — o mais abundante em todas as piscinas — continua desempenhando um importante papel na construção desses recifes. Isso reforça a importância dos recifes do local e de sua conservação, pois, embora distantes da costa, ainda sofrem com influências globais, como o aquecimento da água, que pode causar branqueamento e aumentar as taxas de mortalidade dos corais.

É importante que haja um monitoramento contínuo no Atol das Rocas para avaliar as condições ambientais nas diferentes piscinas e possíveis mudanças nas comunidades biológicas que ali vivem. Estudos futuros podem continuar avaliando os parâmetros estudados e investigar outros fatores que podem ser relevantes para explicar os padrões observados, adicionando informações que contribuam para o entendimento desses recifes, e para sua conservação e gestão.

Referências

BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de Manejo para a Reserva Biológica do Atol das Rocas. Coordenação Geral: Carlos Fernando Fischer. Brasília: ICMBio/DIREC, 2007.

EAGLESON, Ryan G.; ÁLVAREZ-FILIP, Lorenzo; LUMSDEN, John S. Uma revisão da pesquisa sobre o coral Mustard Hill, Porites astreoides. Diversity (Edição Especial: Biodiversidade e Conservação de Recifes de Coral), v. 15, n. 3, p. 462, 2023.

ECHEVERRÍA, C. A.; PIRES, D. O.; MEDEIROS, M. S.; CASTRO, C. B. Cnidarian of the Atol das Rocas, Brazil. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, v. 1, p. 443–446, 1997.

GARRIDO, Amana Guedes; PICCIANI, Natasha; ZILBERBERG, Carla. Simbiose coral-zooxantela em um mundo em transformação. In: ZILBERBERG, Carla et al. *Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, p. 83-96, 2016.

Gaspar, T. L. Saúde de corais: acompanhamento temporal de colônias de *Siderastrea stellata* (Verrill 1868) no Atol das Rocas – Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Oceanografia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

GHERARDI, D. F. M.; BOSENCE, D. W. J. Composition and community structure of the coralline algal reefs from Atol das Rocas, South Atlantic, Brazil. *Coral Reefs*, v. 19, p. 205–219, 2001.

KIKUCHI, R. K. P; LEÃO, Z. M. A. N. Rocas (Southwestern Equatorial Atlantic, Brazil): an attol built primarily by coralline algae. In: *Proc. 8th Int. Coral Reef Symposium, Proceedings of the 8th International Coral Reefs Symposium*, p.731- 736, 1997.

KINOVEA. Kinovea: software de análise de movimento, versão 2023.1.2. Disponível em: <https://www.kinovea.org>.

LEÃO, Z. M. A. N.; DOMINGUEZ, J. M. L. Tropical coast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.41. 2000.

LONGO, G. O.; MORAIS, R. A.; MARTINS, C. D. L.; MENDES, T. C.; AUED, A. W.; CÂNDIDO, D. V. et al. Between-Habitat Variation of Benthic Cover, Reef Fish Assemblage and Feeding Pressure on the Benthos at the Only Atoll in South Atlantic: Rocas Atoll, NE Brazil. *PLoS ONE*, v. 10, n. 6: e0127176, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0127176.

NETTO, Sérgio A.; ATTRILL, Martin J.; WARWICK, Richard M. The relationship between benthic fauna, carbonate sediments and reef morphology in reef-flat tidal pools of Rocas Atoll (north-east Brazil). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 83, p. 425–432, 2003.

OZEKOSKI, R.; QUIMBAYO, J. P.; TEIXEIRA¹, L. N.; AUED, A. W.; CANDIDO, D. V.; SEGAL, B. Branqueamento e recrutamento de *Siderastrea stellata* no único atol do Atlântico Sul durante e após o ENSO 2015-2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SIEBECK, U. E.; MARSHALL, N. J.; KLÜTER, A; et al. Monitoramento do branqueamento de corais usando um cartão de referência de cores. *Recifes de Coral*, v.25, p. 453–460, 2006. doi:10.1007/s00338-006-0123-8.

SOARES, Marcelo de Oliveira; PAIVA, Carolina Cerqueira de; GODOY, Thaís de; SILVA, Maurizélia de Brito; CASTRO, Carla Soraia Soares de. Gestão ambiental de ecossistemas insulares: O caso da reserva biológica do atol das Rocas, Atlântico Sul Equatorial. *Revista de Gestão Costeira Integrada - Journal of Integrated Coastal Zone Management*, v. 10, n. 3, p. 347-360, 2010.

SOARES, Marcelo de Oliveira; LEMOS, Valesca Brasil; KIKUCHI, Ruy Kenji Papa de. Aspectos biogeomorfológicos do Atol das Rocas, Atlântico Sul Equatorial. *Revista Brasileira de Geociências*, v. 41, n. 1, p. 85–94, mar. 2011.

PEREIRA, N. S.; MANSO, V. A. V.; SILVA, A. M. C.; SILVA, M. B. Mapeamento geomorfológico e morfodinâmica do Atol das Rocas, Atlântico Sul. *Revista da Gestão Costeira Integrada - Journal of Integrated Coastal Zone Management*, v. 10, n. 3, p. 331-345, 2010.

PINHEIRO, B. R.; GASPAR, F. L.; SILVA, B. J.; MONTES, M. J. F.; LEBECHNECH, L. Interactions between hydrology and benthic coverage at Rocas Atoll. *Tropical Oceanography, Recife*, v. 44, n. 2, p. 142-157, 2016.

Anexos

Figura 1 - Localização e vista do Atol das Rocas.

Figura 2- Exemplo de medição da colônia utilizando o programa Kinovea.

Figura 3 - Proporção de colônias das espécies de coral (*Montastraea cavernosa*, *Mussismilia hispida*, *Porites astreoides* e *Siderastrea* sp.) em seis piscinas do Atol das Rocas.

Figura 4 - Análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) da composição de espécies nas piscinas. Os números representam as espécies *Montastraea cavernosa* (1), *Mussismilia hispida* (2), *Porites astreoides* (3) e *Siderastrea* sp. (4).

Figura 5 - Frequência total de colônias de *Siderastrea* sp. por isolamento (aberta e fechada).

Figura 6 - Frequência da distribuição de classes de tamanho (cm²) de quatro espécies de corais (*Montastraea cavernosa*, *Mussismilia hispida*, *Porites astreoides* e *Siderastrea* sp.).

Figura 7 - Proporção de classe de tamanho das colônias nas diferentes piscinas do Atol das Rocas.

Figura 8 - Proporção da coloração das diferentes espécies de coral (*Montastraea cavernosa*, *Mussismilia hispida*, *Porites astreoides* e *Siderastrea* sp.).

Figura 9 - Proporção da coloração das colônias de corais em diferentes piscinas do Atol das Rocas.

Figura 10 - Porcentagem de mortalidade nas espécies *Montastraea cavernosa*, *Mussismilia hispida*, *Porites astreoides* e *Siderastrea* sp..

Figura 11 - Porcentagem de mortalidade de corais em diferentes piscinas do Atol das Rocas.

Tabela 1 - Valores de número amostral (N), média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da porcentagem de sobrecrecimento em corais por piscinas do Atol das Rocas.

CÓDIGO: SB0461

AUTOR: BRENO DA SILVA DANTAS

ORIENTADOR: ELIZANGELA EMIDIO CUNHA

TÍTULO: Efeito do acasalamento com otimização da endogamia sobre a endogamia média de tilápias do Nilo submetidas à seleção pelo BLUP visando o aumento do desempenho ponderal

Resumo

Foi avaliado o efeito do acasalamento com otimização da endogamia (OE) sobre a endogamia média de tilápias do Nilo ("Oreochromis niloticus") submetidas à seleção pelo BLUP visando o aumento do desempenho ponderal, no médio prazo. O genoma da tilápia foi simulado com 44 cromossomos, totalizando 968 cM de comprimento, alocando poligenes e 2.904 QTLs. A característica indicadora do desempenho ponderal foi o ganho de peso diário (GPD), simulado com herdabilidade total (h^2) de 0,40, sendo a h^2 (QTL) de 0,30, e a variância fenotípica de 1,0. Simulamos de início uma população histórica (população-base) com 300 peixes/geração (50% de machos), submetida a 100 gerações discretas de acasalamentos ao acaso (AAA). Em sua 100ª geração (população inicial), 100 machos e 200 fêmeas (razão sexual de 1: 2) foram escolhidos para se reproduzir e formar as duas populações de seleção (cenários), obedecendo aos acasalamentos: AAA e OE. Por geração, 100 reprodutores foram acasalados com 200 matrizes gerando 30 alevinos/matriz, o que resultou em 6.000 peixes (50% de machos). Nos dois cenários, foram computados F e o valor fenotípico médio (VF) para o GPD e ajustadas equações de regressão quadrática do VF em função de F para avaliar a depressão endogâmica. F influenciou significativamente ($P < 0,001$) o VF nos dois cenários. Conclui-se, contudo, que não houve depressão endogâmica, o que pode estar relacionado ao elevado tamanho efetivo das duas populações.

Palavras-chave: depressão endogâmica, ganho de peso diário, simulação de dados

TITLE: Effect of mating with inbreeding optimization on the average inbreeding of Nile tilapia submitted to the selection by BLUP aiming the increase of the weight performance

Abstract

It was evaluated the effect of mating with inbreeding optimization (IO) on the average inbreeding of Nile tilapia ("Oreochromis niloticus") submitted to the selection by BLUP, aiming at increasing weight performance, in the medium term. The genome of tilapia was simulated with 44 chromosomes, totalizing 968 cM in length, allocating polygenes and 2,904 QTLs. The indicator trait of the weight performance was the daily weight gain (DWG),

simulated with total heritability (h^2) of 0.40, with h^2 (QTL) of 0.30, and the phenotypic variance of 1.0. We initially simulated a historical population (base population) with 300 fish/generation (50% males), subjected to 100 discrete generations of random mating (RM). In its 100th generation (initial population), 100 males and 200 females (sex ratio of 1: 2) were chosen to reproduce and form the two selection populations (scenarios), obeying to the matings: RM and IO. Per generation, 100 sires were mated with 200 dams generating 30 fingerlings/dam, which resulted in 6,000 fish (50% males), gathered in families of full-sibs and half-sibs. In both scenarios, F and the average phenotypic value (VF) for DWG were computed; and quadratic regression equations of VF as a function of F were adjusted to evaluate the inbreeding depression. F significantly influenced ($P < 0.001$) the VF in both scenarios. It is concluded, however, that there was no inbreeding depression, which may be related to the high effective size of the two populations.

Keywords: inbreeding depression, daily weight gain, data simulation

Introdução

A tilápia do Nilo ("*Oreochromis niloticus*") é uma das espécies de peixe exótica mais cultivadas no Brasil. Ela foi trazida da África, razão pela qual se adaptou com facilidade às diferentes condições ambientais do nosso país.

Com base nas tabelas divulgadas pelo IBGE, nos últimos cinco anos, a aquicultura brasileira evoluiu significativamente, sendo que a tilápia foi o peixe mais produzido neste período (IBGE, 2018; IBGE, 2022). Neste sentido, o melhoramento genético da tilápia do Nilo pode contribuir para aumentar ainda mais a participação da tilapicultura na receita do PIB advinda da agropecuária.

Uma das metodologias de avaliação genética bastante utilizada é o BLUP (Best Linear Unbiased Prediction): um índice de seleção generalizado que prediz os valores genéticos aditivos dos candidatos à seleção (Xu, 2022). Ele está associado com a metodologia dos modelos mistos, que inclui efeitos fixos e aleatórios no modelo estatístico, e incorpora todas as informações disponíveis, incluindo o valor fenotípico do próprio candidato (se disponível) e os valores fenotípicos de todos os seus parentes. Para fazer a conexão entre todas estas informações fenotípicas, o BLUP exige a construção de uma matriz de parentesco genético aditiva entre os candidatos à seleção e todos os seus parentes (avôs, pais, tios, primos, irmãos). A resolução da equação do modelo misto animal permite a predição simultânea do valor genético aditivo (solução BLUP) para todos os candidatos de interesse, bem como a estimação de todos os efeitos fixos (solução BLUE) (Mrode, 2005; Xu, 2022).

No melhoramento genético de qualquer espécie doméstica, um aspecto crucial é a manutenção da variabilidade genética ao longo do tempo, a fim de que o progresso genético para as características do objetivo de seleção continue no longo prazo. Contudo, a utilização rotineira do BLUP no processo de avaliação genética pode contribuir para a perda da variabilidade genética dentro da população, decorrente da elevação na sua taxa de endogamia, comprometendo o ganho genético obtido por seleção o que configura a depressão endogâmica.

Tal depressão pode afetar negativamente as características ligadas ao desempenho produtivo e ao valor adaptativo, além de poder aumentar a frequência de deformidades nos alevinos, diminuir a eficiência reprodutiva, e aumentar a suscetibilidade a doenças (Tave, 1992). Por

isso, o controle eficiente da endogamia tem chamado a atenção dos melhoristas nos programas de seleção genética em aquicultura.

O objetivo deste estudo foi avaliar, sob simulação, o impacto da endogamia média sobre o desempenho ponderal, indicado pelo ganho de peso diário, de tilápias do Nilo selecionadas pela metodologia BLUP, considerando casais acasalados ao acaso ou com otimização da endogamia no médio prazo.

Metodologia

Analisamos um conjunto de dados simulados referentes a duas populações de tilápia do Nilo ("*Oreochromis niloticus*"), submetidas à seleção baseada no BLUP (Best Linear Unbiased Prediction), no médio prazo, visando o aumento no seu desempenho ponderal. Estes dados foram obtidos por meio do programa de simulação QMSim (Sargolzaei & Schenkel, 2009), que utiliza o método forward in time.

De início, simulamos um genoma contendo 44 cromossomos, com 22 cM de comprimento médio cada, totalizando 968 cM, em que foram situados poligenes e 2.904 QTLs (Quantitative Trait Loci), considerados responsáveis pela expressão fenotípica de uma única característica quantitativa: o ganho de peso diário (GPD), como indicadora do desempenho ponderal do peixe. 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 (locos bialélicos), com frequências alélicas iguais, e distribuíram-se aleatoriamente pelo genoma. Os efeitos aditivos dos poligenes, bem como os efeitos dos QTLs, 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, em que a foi 0,30 e a foi 0,10; e a variância fenotípica foi 1,0.

A primeira população simulada, considerada fundadora e denominada de população histórica (população-base), era composta de 300 peixes por geração (metade de machos) e evoluiu por 100 gerações discretas, sob acasalamentos ao acaso e na ausência de seleção e migração (forças evolutivas). No genoma desta população, foi admitida uma taxa de mutação para QTLs e SNPs de 5×10^{-6} , considerando respectivamente a mutação pelo modelo alelo infinito e a mutação recorrente. Da primeira à 99ª geração desta população, o número de machos e de fêmeas simulados foi igual (150 peixes), acasalados numa razão sexual de 1 macho: 1 fêmea. Mas, na 100ª geração, tomada como geração da população inicial, foram simulados 100 machos e 200 fêmeas (razão sexual de 1 macho: 2 fêmeas), que se acasalaram formando as populações recentes (populações de seleção).

A seleção baseada no BLUP foi praticada por 20 gerações consecutivas e com sobreposição, considerando duas populações conforme o tipo de acasalamento: acasalamentos ao acaso (AAA) (cenário 1) ou acasalamentos com otimização da endogamia pela minimização do seu valor na próxima geração (OE) (cenário 2). O objetivo da seleção foi aumentar o GPD ao longo das gerações. Nestes cenários, foi mantida a razão sexual de 1 macho: 2 fêmeas, com a seleção e o acasalamento de 100 machos com 200 fêmeas, configurando famílias de irmãos completos ($n = 200$) e de meios-irmãos ($n = 100$). Para caracterizar a sobreposição de gerações, efetuou-se a reposição de 50% dos reprodutores e de 25% das matrizes por geração. Cada fêmea produziu 30 alevinos ($N = 30$), totalizando 6.000 alevinos/geração, com igual

proporção entre os sexos. Neste contexto, as intensidades de seleção dos machos e das fêmeas foram diferentes entre si e corresponderam, respectivamente, a $i_m = 2,23$ e $i_f = 1,94$. A simulação foi repetida 30 vezes/cenário para reduzir os possíveis efeitos da oscilação genética.

Em cada cenário, os parâmetros computados por geração foram: a endogamia média (F); e o valor fenotípico médio (VF). Para verificar o efeito da depressão por endogamia no desempenho ponderal dos peixes, ajustamos, em cada cenário, uma equação de regressão quadrática dos valores fenotípicos médios (VFs) em função da endogamia média (F), empregando o software R (versão 4.3.1).

Resultados e Discussões

A endogamia média (F) cresceu de forma linear ao longo das gerações, partindo de $F = 0\%$ (endogamia nula) tanto na população-base (população histórica) como na população inicial (primeira geração) do cenário 1 (AAA); e de $F = 0\%$ na população-base até a 3ª geração do cenário 2 (OE). Ao final do período de 20 gerações, F atingiu 46,22% sob AAA (cenário 1) e 27,24% sob OE (cenário 2). Observamos que o aumento no percentual de F, ao longo das gerações, foi mais rápido e de maior magnitude sob AAA. Por exemplo, o percentual de F de cerca de 1,8% foi alcançado na 3ª geração sob AAA, mas levou quase duas vezes este tempo (5ª geração) para ser alcançado sob OE. Quando fixamos as gerações de seleção, por exemplo, notamos que o F obtido na 2ª, 7ª e 14ª gerações foi, respectivamente, de 0,53%; 11,92%; e 29,84% sob AAA; e, respectivamente, de 0%; 5,39%; e 16,87% sob OE. Assim, a média de F, ao longo de todas as gerações, foi de 21,25% ($0,2125 \pm 0,1498$) sob AAA e de 11,63% ($0,1163 \pm 0,0925$) sob OE. Na 6ª geração sob AAA, o valor de F (9,39%) já se aproximava do nível de 10% que, segundo Falconer & Mackay (1996), exerce efeitos prejudiciais sobre os animais de produção, afetando principalmente as características relacionadas ao valor adaptativo (reprodução, tamanho da prole e vigor). Considerando os acasalamentos OE, F atingiu o valor de 10,2% quatro gerações mais tarde, ou seja, na 10ª geração. Como o método de seleção BLUP requer a informação de “pedigree” dos peixes, a endogamia pode aumentar rapidamente no longo prazo pela escolha de casais aparentados nos núcleos de melhoramento com populações fechadas (Gjedrem & Baranski, 2009).

Quanto ao valor fenotípico médio (VF), observamos que ele aumentou linearmente ao longo das gerações, tanto sob AAA quanto sob OE. Mas, diferentemente do que aconteceu para o F, o VF por geração foi muito similar entre os tipos de acasalamento desde a 1ª geração até pelo menos a 7ª geração. Após isso, foi ligeiramente superior sob acasalamentos OE, o que reflete a eficiência deste tipo de acasalamento em retardar o aumento no coeficiente de endogamia média (F), impactando favoravelmente o VF. Resumindo, a média $\pm$ desvio-padrão de VF, ao longo de todas as gerações, foi de $5,2089 \pm 2,9820$ sob AAA e de $5,4407 \pm 3,1943$ sob OE. Na 20ª geração, por exemplo, o VF foi de 9,53 sob AAA vs. 10,18 sob OE.

Em programas de melhoramento genético de espécies terrestres e aquícolas, como regra geral, aumentos na endogamia de 0,5% ou menos por geração são desejáveis; e de até 1,0% por geração, toleráveis (Gjedrem & Baranski, 2009), garantindo a resposta à seleção no longo prazo, em populações fechadas. Nos cenários simulados, o aumento na endogamia média por geração variou de 0,53% a 2,94% sob AAA; e de 0,00% a 1,78% sob OE. Logo, considerando todo o período de seleção, o aumento da endogamia média por geração foi inferior a 0,5% apenas nas duas primeiras gerações de seleção sob acasalamentos OE, o que

evidenciou a eficiência deste último tipo de acasalamento em controlar os aumentos da endogamia numa população fechada.

Em nossas simulações, os 100 melhores reprodutores e as 200 melhores matrizes, selecionados pelo seu mais alto valor genético aditivo para o GPD a cada geração, foram acasalados de modo hierárquico (1 macho: 2 fêmeas), gerando descendentes que eram ou irmãos completos ou meios-irmãos. Assim, por geração, o tamanho efetivo da população foi de 266,67, sendo grande o bastante para preservar a variância genética aditiva (diversidade genética) e garantir resposta à seleção no longo prazo. Segundo Meuwissen & Woolliams (1994), tamanhos efetivos (N_e) de população entre 31 e 250 animais por geração seriam recomendados para evitar decréscimos no valor adaptativo, por exemplo.

Bentsen et al. (2017), trabalhando no projeto GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia), constataram que, em média, 85 reprodutores (variando de 51 a 100) tinham sido acasalados em esquema hierárquico com 157 matrizes (variando de 124 a 185) a cada geração, o que ficou abaixo do que havia sido definido naquele projeto como objetivo (100 reprodutores: 200 matrizes) para os acasalamentos. Tanto assim, que os autores comentaram que a redução no coeficiente de endogamia, no longo prazo, poderia ser conseguida com o aumento do tamanho efetivo da população.

A endogamia média (F) influenciou de forma significativa ($P < 0,001$) o valor fenotípico médio (VF) ao longo das gerações (Figura 01). Infere-se pela equação de regressão quadrática ajustada por cenário que, se a seleção continuasse a atuar após as 20 gerações avaliadas, o VF começaria a ser impactado negativamente, ou seja, começaria a ocorrer queda no desempenho ponderal geração após geração. Contudo, neste estudo, até o final do período avaliado (20 gerações), não foi possível observar a depressão endogâmica (redução) no VF em função da elevação no nível de F . Isso pode estar relacionado ao elevado tamanho efetivo (N_e) das populações nos dois cenários, uma vez que estes dois parâmetros (F e N_e) se relacionam inversamente.

Conclusão

A endogamia média teve influência significativa sobre o valor fenotípico médio do ganho de peso diário, nas duas estratégias de seleção BLUP.

O acasalamento com otimização da endogamia foi efetivo em controlar os aumentos na endogamia média, sobretudo nas primeiras gerações de seleção, desacelerando o seu acúmulo no médio prazo. Mas, isso não implicou no aumento do valor fenotípico médio na mesma proporção.

No médio prazo, não houve depressão endogâmica no desempenho ponderal das tilápias sob seleção BLUP, dado o elevado tamanho efetivo das populações avaliadas.

Referências

BENTSEN, H.B.; GJERDE, B.; EKNATH, A.E.; VERA, M.S.P. de; VELASCO, R.R.; DANTING, J.C.; DIONISIO, E.E.; LONGALONG, F.M.; REYES, R.A.; ABELLA, T.A.; TAYAMEN, M.M.; PONZONI, R.W. Genetic improvement of farmed tilapias: Response to

five generations of selection for increased body weight at harvest in *Oreochromis niloticus* and the further impact of the project. *Aquaculture*, v.468, p.206-217. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.018>.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Edition. 1996. Longman. 464p.

GJEDREM, T.; BARANSKI, M. *Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction*. Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries. 2009. Springer. 221p.

IBGE (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Consulta em 01/04/2020. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=25474&t=resultados>.

IBGE (2022). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Consulta em 24/04/2024. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=25474&t=resultados>

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.

MRODE, R.A. *Linear models for the prediction of animal breeding values*. 2nd edition. CABI Publishing, USA, 2005. ISBN 0851990002. 344p.

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.

TAVE, D. *Genetics for fish hatchery managers*. Second Edition. 1992. 415p.

XU, S. *Quantitative genetics*. Springer Nature Switzerland AG. ISBN 978-3-030-83940-6 (eBook). 2022. 414p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-83940-6>.

Anexos

Figura_01

CÓDIGO: SB0468

AUTOR: ANA BEATRIZ REVOREDO GALVÃO

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: COMPREENDENDO A IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO PARA PACIENTES COM SÍNDROME DE EHLERS-DANLOS

Resumo

A Síndrome de Ehlers-Danlos é uma condição genética rara e subdiagnosticada que foi descrita primeiramente pelos dermatologistas Edvard Ehlers e Henri-Alexandre Danlos como uma síndrome que possui as características de hiperextensibilidade e fragilidade da pele. Essa condição está associada a mutações em genes da formação e maturação de componentes da matriz extracelular, principalmente do colágeno, ocasionando diversos sintomas em todo o organismo humano. A UFRN possui um grupo de pesquisa que estuda essa síndrome com foco na parte genética e nutricional. Esse grupo firmou parceria com a Associação Brasileira de Pessoas com Síndromes de Ehlers-Danlos e Transtornos do Espectro de Hiper mobilidade (ABRASED), criou várias formas de divulgação científica, como postagens nas redes sociais, um folder informativo, vídeos, trabalhos para congressos e transmissões ao vivo (lives). Também obtiveram aprovação do Comitê de Ética para iniciar a parte experimental da pesquisa, a qual está em andamento atualmente, e enviaram uma emenda para o CEP com o objetivo de ampliar a participação na pesquisa para pessoas de todo o Brasil que foi aprovada neste mês.

Palavras-chave: Síndrome de Ehlers-Danlos. Divulgação científica. Nutrição. Genética.

TITLE: Understanding the importance of nutrition for patients with Ehlers-Danlos syndrome

Abstract

Ehlers-Danlos Syndrome is a rare and underdiagnosed genetic condition that was first described by dermatologists Edvard Ehlers and Henri-Alexandre Danlos as a syndrome that has the characteristics of hyperextensibility and fragility of the skin. This condition is associated with mutations in genes for the formation and maturation of components of the extracellular matrix, especially collagen, causing several symptoms throughout the human body. UFRN has a research group that studies this syndrome focusing on the genetic and nutritional part. This group has signed a partnership with the Brazilian Association of People with Ehlers-Danlos Syndromes and Hypermobility Spectrum Disorders (ABRASED), created several forms of scientific dissemination, such as posts on social networks, an information folder, videos, works for congresses and live broadcasts (lives). They also obtained the approval of the Ethics Committee to start the experimental part of the research, which is currently underway, and sent an amendment to the CEP with the aim of expanding participation in the research to people from all over Brazil that was approved this month.

Keywords: Ehlers-Danlos Syndrome. Science communication. Nutrition. Genetic.

Introdução

No início do século XX, os dermatologistas Edvard Ehlers e Henri-Alexandre Danlos descreveram pela primeira vez pessoas que possuíam hiper mobilidade articular, fácil aparecimento de hematomas, cicatrizes anormais e hiper extensibilidade da pele (Malfait et al., 2020). A Síndrome de Ehlers-Danlos é uma síndrome rara e subdiagnosticada que possui 14 subtipos, sendo 13 classificados pela Classificação Internacional da Síndrome de Ehlers-Danlos de 2017 definida pelo International EDS Consortium e uma relatada em artigo que possui nome provisório até o momento (Blackburn et al., 2018). Ela é ocasionada por mutações genéticas que afetam a produção ou a maturação de componentes da matriz extracelular, sendo sua maioria em genes da formação da proteína de colágeno (Miller, E. P. e Grosel, J. M., 2020).

O colágeno é uma proteína essencial ao corpo humano estando presente em todo o organismo tendo funções de suporte, elasticidade e resistência dos tecidos, então alterações nessa proteína comprometem tais características, logo, pode ocorrer a fragilidade dos tecidos, a hiper mobilidade da pele, a facilidade da formação dos hematomas, entre outros (Al Sayed, A. e Sumrall, C, 2024).

Pessoas de todos os subtipos da Síndrome de Ehlers-Danlos apresentam sintomas nos mais diversos sistemas do corpo humano, incluindo na parte gastrointestinal, como gastroparesia (retardo no esvaziamento gástrico), transtornos alimentares, como anorexia e compulsão alimentar, constipação intestinal, deficiência de micronutrientes, como as vitaminas B1, B12 e D, e a nutrição pode melhorar essas situações (Do T. et al, 2021).

Metodologia

Foi realizada revisão de literatura ao longo de todo o ano a partir de buscas nas bases de dados PubMed, Web of Science e Science Direct. O conhecimento obtido por meio dos artigos científicos dessas fontes foram utilizados para produção e divulgação científica em postagens no perfil do Instagram @ehlersdanlos.ufrn, em que a equipe publica semanalmente assuntos relacionados à Síndrome de Ehlers-Danlos de maneira clara e com linguagem acessível à população geral. Também foi produzido um folder explicativo sobre aspectos gerais da Síndrome de Ehlers-Danlos, vídeos informativos sobre a síndrome e foram feitos trabalhos para congressos de Nutrição, o X Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Clínica e Esportiva, e Genética, o XVII Congresso da Mutagen-Brasil, relacionando a síndrome com outra linha de pesquisa do grupo, o lipedema, e com o reparo de DNA.

Por meio deste perfil, também foi realizada uma live com uma pessoa que vive com essa síndrome e que faz parte do grupo de pesquisa. Essa live teve o intuito de responder algumas dúvidas sobre o diagnóstico e experiência dessa pessoa, sendo mediada pela professora orientadora e por outra componente do grupo.

Em 2025, foi obtida a aprovação do Comitê de Ética para dar início à parte experimental da pesquisa, assim, foram recrutadas pelo Instagram pessoas com a Síndrome de Ehlers-Danlos maiores de 18 anos, com diagnóstico clínico e/ou genético que tivessem interesse em participar. Até o momento, 3 pacientes que vivem em Natal foram submetidas à pesquisa, sendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e tendo seu sangue coletado

para análises do subtipo da síndrome, e respondido dois questionários, um sobre seu diagnóstico e sintomas e outro sobre sua alimentação do dia anterior, o qual é o Recordatório de 24 horas.

Além disso, um artigo sobre um dos genes relacionados está em processo de escrita.

Resultados e Discussões

Foi realizada uma reunião 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) e estabelecida uma parceria em que a associação reposta as publicações semanais do grupo de pesquisa, o que possibilitou um maior alcance da divulgação científica e uma maior quantidade de interessados em participar da pesquisa de diversas partes do Brasil. Por esse motivo, foi elaborada uma emenda do projeto de pesquisa e enviada ao Comitê de Ética para ampliar a localidade dos participantes para que pessoas de todo o Brasil possam ser incluídas. Esse documento está em processo de análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Os trabalhos científicos escritos foram submetidos ao X Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Clínica e Esportiva (X CONNAE) e ao XVII Congresso da Mutagen-Brasil intitulados respectivamente “Abordagens nutricionais para pessoas com lipedema e Síndrome de Ehlers-Danlos: Uma revisão de literatura” e “Is there an association between defective DNA repair and Ehlers-Danlos Syndrome? A review”.

Os vídeos científicos publicados no perfil do Instagram @ehlersdanlos.ufrn relacionaram a síndrome com os sintomas gastrointestinais vistos na literatura e com o tema abordado no trabalho do X CONNAE. Esses materiais foram os que tiveram maior alcance, chegando a quase 3500 visualizações, sendo a maioria de pessoas que não seguiam o perfil.

Os dados obtidos dos pacientes incluídos na pesquisa estão em análise para associar o subtipo da síndrome presente e a alimentação habitual com os sintomas gastrointestinais para observar a influência da alimentação nos sintomas gastrointestinais de pessoas com cada subtipo.

Por meio do perfil do Instagram, o grupo responde frequentemente dúvidas de pessoas com a síndrome e conscientiza profissionais da saúde e a população em geral sobre a existência da Síndrome de Ehlers-Danlos, além de mostrar os seus mais diversos aspectos, como nutrição, sintomas gastrointestinais, saúde mental, disautonomias, síndromes associadas e condições semelhantes que podem ser confundidas.

Conclusão

Portanto, conclui-se que a pesquisa sobre a Síndrome de Ehlers-Danlos obteve grandes avanços nesse último ano, pois conseguiu parcerias e uma maior visibilidade a seus conteúdos científicos por meio de seus vídeos, trabalhos para congressos e publicações semanais. Além disso, a parte experimental da pesquisa pôde ser iniciada devido a ter recebido a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no começo de 2025, assim, começaram a ser realizadas coletas de sangue, questionários sobre o diagnóstico, sintomas e alimentação

habitual com pessoas da cidade de Natal no Rio Grande do Norte, os quais foram feitos no prédio do Instituto de Medicina Tropical na UFRN. Recentemente, a equipe recebeu a aprovação da emenda enviada ao Comitê de Ética em Pesquisa para ampliar o atendimento da pesquisa para que possa ser realizada com pessoas de qualquer parte do Brasil a partir da aplicação remota de seus questionários. Também está sendo escrito um artigo para uma revista científica que deve ser publicado em breve.

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.

DO, T. et al. Nutritional Implications of Patients with Dysautonomia and Hypermobility Syndromes. **Current Nutrition Reports**, v. 10, n. 4, p. 324–333, 2021.

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.

Anexos

Figura 1 - Parte externa do folder informativo sobre a Síndrome de Ehlers-Danlos

Figura 2 - Parte interna do folder informativo sobre a Síndrome de Ehlers-Danlos

CÓDIGO: SB0487

AUTOR: JOÃO VÍTOR CABRAL DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: Estudo molecular e análises bioinformáticas de nova variante patogênica no gene *BSCL2* em um novo caso de Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia

Resumo

O tecido adiposo é um órgão endócrino importante para a manutenção da homeostase corporal, atuando com funções endócrinas, metabólicas e regulatórias. A secreção de proteínas bioativas, denominadas adipocinas, se mostra como principal função regulatória do tecido adiposo, formando uma rede extensa com os outros sistemas do corpo, bem como sendo associadas ao surgimento de distúrbios metabólicos. Coordenando os adipócitos está a seipina, proteína codificada pelo gene *BSCL2*, apresentando funções relacionadas ao desenvolvimento e maturação das vesículas lipídicas. Quando mutado, *BSCL2* gera uma proteína deficiente, causando lipodistrofias e doenças neurológicas – doenças essas que são extremamente raras. Sendo assim, o trabalho desenvolvido tem como objetivo compreender a nova variante patogênica associada a esse gene, bem como sobre como ele altera a proteína seipina, em sua forma e função por meio de análises moleculares e bioinformáticas. Compreendendo a raridade das doenças, o presente trabalho se relaciona com o objetivo 3 do Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU, o qual diz respeito à saúde e ao bem-estar.

Palavras-chave: Neuropatia. Seipina. Predições bioinformáticas. Doenças raras.

TITLE: Molecular study and bioinformatic analyses and description of a novel *BSCL2* gene pathogenic variant in a new case of Progressive Encephalopathy with or without Lipodystrophy

Abstract

The adipose tissue is an important endocrine organ to maintenance of organic homeostasis, performing endocrine, metabolic and regulatory functions. The secretion of bioactive proteins, called adipokines, is shown to be the main regulatory function of adipose tissue, forming an extensive network with other body systems and being associated with the emergence of metabolic disorders. Coordinating adipocytes is seipin, a protein encoded by *BSCL2* gene, which has functions related to the development and maturation of lipid vesicles. When mutated, *BSCL2* generates a deficient protein, causing lipodystrophies and neurological diseases - diseases that are extremely rare. Therefore, the study aims to understand the new pathogenic variant associated with this gene, as well as how it alters the form and function of the seipin protein through molecular and bioinformatics analyses. Understanding the rarity of diseases, this work relates to objective 3 of the UN 2030 Agenda for Sustainable Development, which concerns 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 dispõem 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). Essa proteína possui três transcritos, sendo o maior de 462 aminoácidos o mais expresso no tecido nervoso, mas também outro de 398 aminoácidos, este sendo mais comum no tecido adiposo. Por isso, além de estar associado à PELD, apresenta papel no surgimento da Lipodistrofia Generalizada Congênita do tipo 2 (LGC2) – um distúrbio causado pela perda generalizada do tecido adiposo subcutâneo desde o nascimento. 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).

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, uma nova variante patogênica foi encontrada associada a um novo caso do PELD no Brasil, apresentando-se em um padrão de herança de heterozigose composta, com uma variante clássica para LGC2 (c.517insA) e uma deleção completa do éxon 11 do gene. Com isso, este trabalho se propõe a descrever as características relacionadas à variante, como o rastreo familiar da mutação e como ela impacta a proteína a nível estrutural e funcional.

Metodologia

Estudo da história clínica

A paciente chegou ao serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário Onofre Lopes, aos 22 anos, acompanhada da família, apresentando o prontuário médico e laudo genético, constatando a presença da mutação em heterozigose composta. Filha de pais não-consanguíneos, e sem histórico prévio de caso semelhante na família, com história perinatal normal, embora desde a infância ter apresentado fenótipo lipodistrófico, recebendo diagnóstico clínico de Síndrome de Berardinelli-Seip. Apesar disso, seguiu com neurodesenvolvimento normal até os 18 anos, quando começou um quadro de neurodegeneração progressiva. Aos 21 anos, foi examinada pela Genética Médica,

apresentando escassez de tecido adiposo subcutâneo, síndrome extrapiramidal, rigidez global, disfagia e distonia orofacial, membros e tronco. Exames laboratoriais apresentaram apenas HDL abaixo do valor de referência e ressonância magnética de crânio apresentou atrofia cerebral.

Construção de *primers*, PCR, eletroforese e sequenciamento capilar

Para análise das variantes, foram construídos um par de *primers* específico para amplificação da mutação, já que se tratava de uma nova variante. Os *primers* foram usados em uma Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), amplificando a região da mutação e possibilitando o rastreo da variante nos demais indivíduos da família, por meio de eletroforese em gel de agarose. Para a variante clássica para LGC2 foi usado um *primer* já existente para c.517insA e o produto de amplificação foi utilizado no sequenciamento capilar, também usado para determinação de quem possui a mutação.

Análises de sequência e estrutura proteicas

A sequência do gene foi obtida no banco de dados *Genome Browser*, e manipulada retirando o éxon 11, bem como adicionando a região de 3' UTR. Essa sequência foi utilizada no software *Translate Tool ExPASy* para gerar a sequência de aminoácidos específica para a variante nova. Foi feito, também, a geração da sequência sem modificação, considerada referente à proteína selvagem. Para comparação entre as sequências selvagem e mutada, foi utilizado os programas *PsiPRED* e T-COFFEE. As sequências obtidas foram utilizadas no programa ChimeraX para gerar a estrutura tridimensional das proteínas selvagem e mutada. Por se tratar de uma proteína transmembranar, os softwares TMHMM e CCTOP foram utilizados para predição das regiões transmembrana da seipina.

Resultados e Discussões

Resultados moleculares

A PCR e eletroforese em gel de agarose referente à nova variante confirmou uma perda significativa de nucleotídeos que confirmam a deleção do éxon 11 na paciente e na sua mãe, sem a presença dessa variante nos alelos paternos. A deleção da variante se apresentou em heterozigose na mãe e na filha. O produto de amplificação da variante c.517insA foi utilizado no sequenciamento capilar, que apresentou uma perda na qualidade do sequenciamento a partir da posição do nucleotídeo de adenina inserido, demonstrando a heterozigose. Essa variante está presente somente na paciente e no seu pai. Dessa forma, os dados confirmam o padrão de heterozigose composta, tendo como portador da variante c.517insA o pai, e da deleção do éxon 11, a mãe.

Alterações na sequência

A sequência resultante da deleção revela alterações significativas na região C-terminal da seipina, enquanto as demais regiões permanecem conservadas. A exclusão do éxon 11 provoca uma mudança no quadro de leitura e a perda do códon de parada existente no final do éxon 11, fazendo com que a tradução se estenda para a região 3' UTR até encontrar um códon de parada subsequente. Essa modificação gera uma mudança drástica na sequência de aminoácidos a partir da posição 412, resultando em uma proteína truncada com 425 aminoácidos, em comparação aos 462 da proteína selvagem. Nesse ponto, a sequência

original [...]GSWEDAALLTEANLPA[...] é substituída por [...]EKRGRLLTFQHFPT- na proteína mutante. Até essa posição, entretanto, a sequência permanece conservada, indicando que a alteração se restringe à região C-terminal citoplasmática da seipina.

Além da diminuição do tamanho da proteína devido ao *frameshift*, 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, demonstrando que as interações proteicas realizadas nessa região são prejudicadas pela diferença drástica na polaridade dos aminoácidos dessa região.

Alterações na estrutura proteica

A estrutura tridimensional predita pelo *ChimeraX* demonstra que a estrutura se mantém conservada, até a posição 412, onde há a diminuição considerável da cauda C-terminal citoplasmática, ao ser comparada com a selvagem. Além disso, com finalidade de observar a organização da proteína na membrana do RE, as predições realizadas pelo TMHMM e CCTOP, forneceram duas regiões transmembrana, uma região interna ao retículo endoplasmático e as regiões N e C-terminais voltadas ao citosol, como é predito por Salo, 2023. No entanto, a região C-terminal se apresenta consideravelmente reduzida.

A variante c.517insA possui predição e mecanismos descritos, 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. Essa modificação leva à perda de um domínio transmembrana e a uma redução de cerca de 71% da sequência em comparação à seipina selvagem, comprometendo de forma significativa sua função. Além disso, a região C-terminal, originalmente voltada para o citoplasma, passa a se orientar para o lúmen do RE. Essa inversão afeta o loop presente no lúmen do RE, já que grande parte dessa região é perdida, prejudicando a captação de triacilgliceróis e, consequentemente, a formação adequada da gotícula lipídica (Craveiro Sarmiento et al., 2020).

Mecanismo fisiopatológico associado à variante de deleção do éxon 11

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 (Saito et al., 2022).

Outra questão a ser levada em conta é 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, uma vez que prejudica a concentração de cálcio intracelular e no RE. 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).

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

Este trabalho serve como um ato inicial na compreensão dessa nova mutação, elucidando os impactos estruturais causados por ela na proteína em questão. Apesar de ainda se manterem obscuros, os mecanismos fisiopatológicos têm correlação com tais alterações demonstradas nesse ensaio. 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. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. D1, p. D12–D17, 4 jan. 2017.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. et al. The worldwide mutational landscape of Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Mutation research. Reviews in mutation research*, v. 781, p. 30–52, 1 jul. 2019.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. et al. Changes in redox and endoplasmic reticulum homeostasis are related to congenital generalized lipodystrophy type 2. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, v. 1865, n. 4, 1 abr. 2020.

GUILLÉN-NAVARRO, E. et al. A new seipin-associated neurodegenerative syndrome. *Journal of medical genetics*, v. 50, n. 6, p. 401–409, 2013.

SAITO, S. et al. A motor neuron disease-associated mutation produces non-glycosylated Seipin that induces ER stress and apoptosis by inactivating SERCA2b. *eLife*, v. 11, 29 nov. 2022.

SALO, V. T. Seipin—still a mysterious protein? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 11, 3 fev. 2023.

SÁNCHEZ-IGLESIAS, Sofia 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. Exploring Seipin: From Biochemistry to Bioinformatics Predictions. *International journal of cell biology*, v. 2018, 2018.

CÓDIGO: SB0501

AUTOR: GABRIELLA FERNANDES DUTRA DA SILVA

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Análise quântica e energética de um potencial inibidor contra o vírus do Nilo Ocidental (WNV)

Resumo

Com o objetivo de compreender a relação energética entre a proteína ligante do vírus do Nilo Ocidental (WNV) NS2B-NS3 e a protease em complexo com 3,4-diclorofenilacetil-Lys-Lys-GCMA, foram utilizados cálculos de química quântica baseados na teoria do funcional da densidade (DFT) e o método de Fragmentação com Capas Conjugadas (MFCC), uma ferramenta computacional. Neste trabalho, foram analisados os aminoácidos, bem como as regiões de maior atração e repulsão. De acordo com o estudo, observou-se que a energia de interação convergiu em 9,0 Å. O estudo visa aprimorar as técnicas e compreender os efeitos entre esses elementos, suas interações e níveis de energia, com o intuito de selecionar compostos que possam ser utilizados como fármacos antivirais. Esses compostos poderão ser aprimorados posteriormente para combater o vírus WNV de forma mais eficiente.

Palavras-chave: MFCC. DFT. VÍRUS. NILO. WVN

TITLE: Energetic Quantum Analysis Of A Potential Inhibitor Against West Nile Virus (WNV)

Abstract

With the aim of understanding the energy relationship between the ligand protein of the West Nile virus (WNV) NS2B-NSm3 and the protease in complex with 3,4-dichlorophenylacetyl-Lys-Lys-GCMA, quantum chemistry calculations based on the density functional theory (DFT) and the Fragmentation with Conjugated Caps (MFCC) method, a computational tool, were employed. In this study, amino acids and regions of higher attraction and repulsion were analyzed. According to the study, the interaction energy converged at 9.0 Å. The research aims to enhance techniques and comprehend the effects among these elements, their interactions, and energy levels, with the purpose of selecting compounds that can be used as antiviral drugs. These compounds may be further improved to more efficiently combat the WNV virus.

Keywords: MFCC. DFT. VÍRUS. NILE. WVN

Introdução

O Vírus do Nilo Ocidental (WNV) pertence ao gênero Flavivirus, família Flaviviridae, assim como os vírus da Dengue e da Febre Amarela. Sua transmissão

ocorre em ciclos de infecção entre pássaros e mosquitos hematófagos, principalmente do gênero *Culex*. A disseminação para mamíferos e humanos acontece acidentalmente pela picada de mosquitos que se alimentam de aves infectadas ou por transfusões sanguíneas. Relatos no México, Caribe, América Central e Canadá apontam mais de mil mortes anuais (BLUT; KRANKHEITSERREGER, 2013; TOMLINSON; WATOWICH, 2008).

Quanto aos sintomas, cerca de 80% das infecções são assintomáticas. Nos demais casos, variam desde febre baixa (95% dos sintomáticos) até encefalite ou meningite, em cerca de 20% dos casos. Entre os sintomas estão febre do WNV com dor de cabeça, fraqueza, vômitos e manifestações inespecíficas, como dores musculares ou no pescoço, confusão e fala arrastada. A disseminação está associada à permanência em áreas rurais. Atualmente, não existem vacinas ou antivirais específicos para a febre do Nilo, e o tratamento é apenas paliativo para aliviar sintomas.

Compreender a performance viral reforça a importância da análise molecular para interpretar estrutura e replicação. O WNV é pequeno, com nucleocapsídeo cercado por dupla camada lipídica. O nucleocapsídeo contém cópias da proteína C e RNA viral. A camada externa é composta pelas proteínas E (revestimento) e M (membrana). A proteína E atua na ligação e fusão durante a entrada do vírus na célula hospedeira.

O vírus se liga por receptores como DC-SIGNR ou integrina $\alpha v \beta 3$. A clatrina possibilita sua entrada; o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e o RNA viral traduzido em poliproteína em pH baixo. Essa poliproteína é clivada em dez proteínas funcionais pela protease viral NS2B-NS3 e proteases do hospedeiro. A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) em NS5 gera novas cadeias de RNA, em conjunto com proteínas celulares e virais. As membranas intracelulares formam novas partículas e, após clivagem mediada pela furina, os vírions são liberados. Inibir proteases NS2B-NS3 pode ser uma estratégia promissora de antivirais contra o WNV.

Nesse contexto, frente ao mecanismo de replicação, o controle ainda se restringe ao combate ao vetor. Entretanto, segundo Pletnev et al. (2002), avanços recentes em tecnologia de DNA recombinante permitiram desenvolver vacinas de flavivírus atenuados vivos. Essa abordagem é viável pela conservação entre flavivírus quanto à organização do genoma, número de proteínas, estratégia replicativa, expressão gênica, estrutura do vírion e morfogênese.

São objetivos deste trabalho compreender a relação proteína-ligante, seu caráter energético e particularidades, analisando se a ligação é atrativa ou repulsiva e em que nível energético se estabelece. Tal investigação é crucial para entender os efeitos de fármacos e apoiar estratégias contra o vírus do Nilo Ocidental. Esse entendimento também possibilita implementar estudos *in silico*, fundamentais para o avanço no desenvolvimento de tratamentos futuros.

Metodologia

Materiais e métodos

Preparação das estruturas

As metodologias aplicadas foram realizadas por meio do inibidor da protease do Vírus do Nilo Ocidental (WNV) NS2B-NS3, em complexo com 3,4-diclorofenilacetil-Lys-Lys-GCMA, obtida através da estrutura 2YOL disponível no site do PDB. O estado de protonação da estrutura 2YOL foi verificado através do programa MarvinSketch para análise e simulação em um meio com pH de 7,2 a 7,4, forma desprotonada ácida, compatível ao sanguíneo, com o objetivo de examinar a experimentação ocorrendo em um meio semelhante ao corpo humano. Após este processo, foi realizado o ajuste de ligações por meio do Discovery Studio Visualizer, uma ferramenta utilizada para a visualização, análise e compartilhamento de proteínas. Desse modo, foi aplicado com o intuito de verificar a ligação entre hidrogênio e moléculas de água, para examinar e otimizar as interações entre essas estruturas.

A Teoria funcional da Densidade (DFT) e Método de Fragmentação com Capas Conjugadas (MFCC)

Em segundo plano, foi realizada a estimativa da concentração energética com a relação proteína NS2B-NS3 e o inibidor EBN 2170, calculada com base na proposta do método de Fragmentação com Capas Conjugadas (MFCC) associado à Teoria Funcional da Densidade (DFT), seguindo Morgon e Custódio (1994). A pesquisa demonstrou que essa metodologia busca presumir propriedades moleculares quantitativamente ou tendências qualitativas dessas propriedades e explicar a natureza da ligação química, estando entre os principais objetivos da Química Quântica. Atualmente, o MFCC tem sido amplamente utilizado para calcular a energia de ligação proteína-ligante, permitindo a investigação de vários resíduos de aminoácidos em uma proteína de forma computacionalmente eficiente e precisa. O método de fracionamento foi originalmente desenvolvido para obter um cálculo ab initio escalável e linear das energias de interação proteína-ligante, fragmentando a molécula de proteína em partes de aminoácidos devidamente protegidos. Uma característica distintiva do MFCC em relação a outros métodos de fragmentação, que empregam capeamento de ligações fracionadas, é a utilização de tampas que correspondem a porções das seções vizinhas da molécula. Essa abordagem fornece uma representação eficiente do ambiente local durante os cálculos dos fragmentos individuais.

Marcando a molécula do ligante como L e o resíduo interagindo com L como Ri (i denota o índice do i-ésimo resíduo de aminoácido), a energia de interação individual entre L e cada Ri, $E(L-Ri)$, em nível DFT é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$E(L-Ri) = E(L + C1i Ri Ci+1) - E(C1i Ri Ci+1) + E(L + C1i Ci+1) + E(C1i Ci+1) \quad (1)$$

Nessa equação, o primeiro termo $E(L + C1i Ri Ci+1)$ representa a energia total do sistema formado pelo ligante e o resíduo capeado. O segundo termo, $E(C1i Ri Ci+1)$, corresponde à energia total do resíduo capeado isolado. O terceiro termo $E(L + C1i Ci+1)$ é a energia total do sistema formado pelo conjunto de capas e o ligante L, enquanto o quarto e último termo $E(C1i Ci+1)$ é a energia total do sistema

formado pelas capas isoladas. Além disso, as moléculas de água cristalográficas foram incluídas como parte do resíduo mais próximo, ao qual estão ligadas por pontes de hidrogênio.

Conduziu-se um estudo de convergência da energia de interação em relação ao raio de ligação do ligante, com o intuito de estabelecer um limite para o número de resíduos de aminoácidos a serem analisados, garantindo a preservação das interações importantes. Esse processo teve o propósito de estabilizar a energia de ligação total. A energia de ligação total foi obtida pela soma das energias de resíduo-ligante dentro de um raio e das energias de ligação consecutivas. A investigação abrangeu a variação da energia de interação total, levando em consideração todas as contribuições dos resíduos de aminoácidos em uma esfera de raio, originando-se no ligante. Para cada resíduo de aminoácido (R_i), foram considerados os três aminoácidos anteriores ($Ci1$) e os três seguintes ($Ci+1$).

Neste estudo, utilizamos a combinação da abordagem de fragmentação de capas conjugadas (MFCC) e diferentes constantes dielétricas (ϵ) para tornar o ambiente simulado mais similar ao ambiente proteico. Essa abordagem nos permitiu estimar os efeitos de energia, incluindo a polarização eletrostática promovida pelo solvente, para assim, simular uma experimentação compatível com as condições ocorridas na realidade e investigar os níveis energéticos presentes na relação proteína-ligante entre o Vírus do Nilo Ocidental NS2B-NS3 protease em complexo com 3,4-diclorofenilacetil-Lys-Lys-GCMA.

Diante disso, a partir da implementação da abordagem MFCC, possibilita a visualização mais detalhada acerca da energia de ligação em detrimento do raio, de cada aminoácido individualmente. Por meio disso, é possível averiguar as regiões de maior interação e estabilização, tal informação é de suma importância para a abordagem e implementação de futuros tratamentos contra o vírus do Nilo.

Resultados e Discussões

Segmentação do fármaco

Para análise mais detalhada e precisa, foi realizada a divisão do fármaco em regiões I, II, III e IV, tal segmentação auxilia na observação mais precisa e organizada de cada aminoácido significativo presente no sistema, de modo facilitar a visualização sobre em qual localidade possui quantidade mais elevada de ligações e qual a natureza das associações.

Fig. 01: Visualização do complexo 3,4-diclorofenilacetil-Lys-Lys-GCMA, segmentado por regiões I, II, III e IV.

Resíduos relevantes

Nessa perspectiva, tendo em vista os resíduos mais significativos, na imagem 2 é possível observar o nível de energia de cada resíduo de aminoácido em uma escala de -10 a 5 Kcal/mol. Distâncias menores indicam uma interação mais próxima e possivelmente mais forte entre o 3,4-diclorofenilacetil-Lys-Lys-GCMA e os aminoácidos da proteína, como analisado nos resíduos Phe85, Asp90, Ile155 e

Tyr1161, que caracterizam-se por serem atrativos. Em contrapartida a Asp1129 e a Gly83 demonstram-se repulsivos.

Fig. 02 Ilustração gráfica BIRD que destaca os resíduos mais significativos na interação com o ligante, apresentando as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante.

Sob essa ótica, na figura 03, nota-se a variação de energia, determinada por quilo caloria por mol com variação de 5 a 50, em detrimento do raio, este é calculado por meio da unidade de medida armstrong, com escala de 2 a 10, para análise mais assertiva foi considerado os fragmentos de aminoácidos e interações mais relevantes.

Fig. 03 Energia de interação total em função do raio, calculado durante o estudo de convergência considerando constante dielétrica de 10 e 40.

Nesse sentido, na figura 03, foi realizada a experimentação no vácuo com a constante dielétrica de 10 e 40, considerando a constante dielétrica de 10 nota-se variações significativas nos resíduos de Gly1151, Pro1131 e Met1156, caracterizando como segmentos mais repulsivos e Trp1050 e Ser1163, como mais atrativos. Ademais, considerando valores de energia mais realistas, considera-se a constante dielétrica de 40, que apresenta Gly1151, Ser1071, Ile1162, como mais repulsivos e Tyr1161, Ser1163 e Leu1149 como mais atrativos. No sistema verifica-se grande nível de desestabilização nos raio de 2,0 a 8,0, em detrimento da proximidade fármaco proteína, a partir deste, as variações tendem a cessar, de maneira menos expressiva, não contribuindo com oscilações significativas.

Essa identificação dos resíduos-chave é crucial para compreender quais aminoácidos da proteína estão envolvidos nas interações com o fármaco no sítio de ligação. Através dessa análise, é possível destacar resíduos específicos que desempenham um papel significativo na ligação do vírus do nilo à proteína, fornecendo insights valiosos sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessa interação.

Interações relevantes

Região I

Fig. 04 Representação das interações moleculares entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína, evidenciando van der Waals (em amarelo), pontes de hidrogênio (em vermelho) e interações π -alquil (em verde).

Na Região I, o ligante estabelece interações com Thr1132, Gly1151, Tyr1161 e Asp1129, com distâncias variando de 1.8 Å a 4.9 Å, abrangendo desde ligações de hidrogênio fortes até interações hidrofóbicas fracas.

A Thr1132 possui um grupo hidroxila na cadeia lateral, o que permite atuar como doador ou aceptor de hidrogênio. A distância observada (2.93 Å) está dentro do intervalo típico para ligações de hidrogênio moderadas (Jeffrey, 1997). Desse modo, a interação ocorre entre o oxigênio do -OH da treonina e um grupo polar do ligante, como carbonila ou nitrogênio heterocíclico.

A Gly1151, pode formar ligações de hidrogênio por meio do oxigênio do grupo carbonila ou do nitrogênio da amida presentes no esqueleto peptídico. A distância de 1.9 Å indica uma ligação de hidrogênio extremamente forte, possivelmente estabilizada por boa orientação geométrica e complementaridade eletrônica (Desiraju & Steiner, 1999).

A Tyr1161 contém um anel aromático com grupo fenólico, permitindo tanto ligações de hidrogênio como interações π . No entanto, a distância de 4.9 Å é longa para ligações de hidrogênio, sugerindo aqui uma interação hidrofóbica fraca, possivelmente do tipo π -alquil (Nishio, 2014).

O Asp1129 apresenta um grupo carboxilato com carga negativa, atuando de maneira eficiente como aceptor de ligações de hidrogênio e como sítio de interação iônica. A distância de 1.8 Å está dentro da faixa de ligações de hidrogênio fortes e pode até indicar interação eletrostática significativa com grupo carregado positivamente no ligante (Bissantz et al., 2010). O grupo terminal P1 guanidínio interage com o carboxilato de Asp1129 através de duas pontes de hidrogênio (HAMMAMY, 2014).

Região II

Fig. 05 Representação das interações moleculares entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína, evidenciando pontes de hidrogênio (em vermelho) e interações π -alquil (em verde).

Na Região II observa-se que o ligante interage com três resíduos principais: Thr1132, Tyr1161, Gly1153, Asn1152, His1051, Gly83 e Val1072. As distâncias medidas (2.93 Å, 2.04 Å e 2.63 Å, respectivamente para os três primeiros resíduos) estão dentro do intervalo característico para ligações de hidrogênio, que tipicamente variam entre 2.5–3.5 Å, sendo que interações particularmente curtas (< 2.5 Å) indicam ligações fortes (Jeffrey, 1997; Bissantz et al., 2010). Em conjunto nota-se as distâncias de 2.67 Å, 2.53 Å e 2.30 Å para os seguintes resíduos: Asn1152, His1051, Gly83 são compatíveis com ligações de hidrogênio, enquanto o valor de 4.50 Å observado para Val1072 sugere interação hidrofóbica do tipo π -alquil (Bissantz et al., 2010; Nishio, 2014).

O resíduo Thr1132 apresenta cadeia lateral contendo um grupo hidroxila (-OH), capaz de atuar tanto como doador quanto como aceptor de ligação de hidrogênio. A distância de 2.93 Å sugere uma ligação de hidrogênio moderada, provavelmente entre o oxigênio da treonina e um grupo polar do ligante (como carbonila ou amina).

Para Tyr1161, o grupo fenólico na cadeia lateral fornece um oxigênio fortemente eletronegativo, favorecendo a formação de ligação de hidrogênio. A distância de 2.04 Å é indicativa de uma ligação de hidrogênio forte, com elevada direção e intensidade, possivelmente estabelecida entre o -OH aromático e um grupo aceptor/doador de próton no ligante (Desiraju & Steiner, 1999).

Já Gly1153, apesar de não possuir cadeia lateral funcional, pode participar de ligações de hidrogênio através de átomos do esqueleto peptídico, como o oxigênio carbonílico ou o nitrogênio da amida. A distância de 2.63 Å reforça a presença de uma ligação de hidrogênio entre o esqueleto da glicina e um grupo polar do ligante.

O resíduo Asn1152 possui grupo amida na cadeia lateral, funcionalidade capaz de atuar tanto como doador quanto como aceptor de ligação de hidrogênio. A distância de 2.67 Å indica a formação dessa ligação com um grupo complementar no ligante, como carbonila ou nitrogênio heterocíclico.

Na His1051, o anel imidazol contém dois nitrogênios com propriedades distintas: um mais básico, atuando como aceptor, e outro com capacidade de doar hidrogênio. A curta distância de 2,53 Å entre o ligante e um dos nitrogênios sugere a formação de uma ligação de hidrogênio forte.

Gly83, assim como na Região II, não possui cadeia lateral reativa, mas pode formar ligações de hidrogênio por meio do oxigênio carbonílico ou do nitrogênio amídico do esqueleto peptídico. A distância de 2.30 Å. Hammamy (2014) demonstrou que o bolsão S2 é dominado pelo potencial eletrostático negativo originado dos átomos de oxigênio da carbonila dos resíduos NS2B Gly83.

Por fim, Val1072 é um aminoácido apolar, com uma cadeia lateral isopropílica. A distância de 4,50 Å entre essa cadeia e o ligante está além do limite para ligações de hidrogênio, mas se enquadra nos valores típicos de interações hidrofóbicas do tipo π -alquil ou alquil-alquil. Nesses casos, a cadeia lateral apolar se aproxima de superfícies hidrofóbicas ou de sistemas aromáticos do ligante, contribuindo para a estabilização da interação (Nishio, 2014).

Conclusão

Sob a perspectiva de combater o vírus do Nilo Ocidental, o trabalho e seus resultados demonstram que quanto mais negativa é a energia de interação do aminoácido, maior é sua afinidade com a proteína-ligante. Ao analisar o gráfico BIRD (Fig. 2), nota-se que o aminoácido Asp90 possui a energia de interação mais expressiva, com -6 kcal/mol, o que favorece significativamente a ligação. Em contrapartida, o aminoácido Asp1129 apresenta uma energia de interação de +8 kcal/mol, indicando uma força de repulsão considerável, o que não contribui para a estabilidade da ligação.

Além disso, nota-se a importância do aminoácido Tyr1161, para o desenvolvimento de fármacos, pois de acordo com Ourique (2018), foi destacado a interação de ponte de hidrogênio com o ligante, que segundo Rang & Dale (2003), tal ligação é ideal para fármacos que atuam nos receptores de nosso organismo, pois sabemos que o efeito desejado terá um tempo limitado. Esta observação sugere que pode ser possível desenvolver um novo inibidor peptídico ou até mesmo melhorar o desempenho.

Tendo em vista a melhoria dos métodos de combate ao vírus, este representa uma ameaça significativa à saúde pública brasileira, tanto humana quanto veterinária. Ademais, é importante ter em mente que a doença causada por este vírus não pode ser tratada por vacinas humanas ou medicamentos antivirais comumente usados. Serrano et. al (2023). Nessa perspectiva, faz-se necessária a

busca por fármacos ou vacinas que contribuam diretamente para o combate dessa doença.

Neste contexto, há a necessidade latente de descobertas a respeito do combate ao vírus do Nilo. No presente trabalho, foi abordado a relação proteína ligante sob a ótica de destacar os resíduos mais significativos (atrativos e repulsivos), por meio de cálculos de energia, demonstrando quais as ligações presentes e sua importância para todo o sistema. Nos últimos anos, tem observado um crescente surgimento de ferramentas computacionais que têm se mostrado uma nova e valiosa abordagem para enfrentar esse desafio. Essas ferramentas têm sua base em princípios matemáticos, físico-químicos, termodinâmicos e químicos, e estão se tornando uma importante aliada no campo da descoberta de novos fármacos. Especificamente, o uso de técnicas de triagem virtual baseadas na estrutura molecular tem mostrado resultados promissores, o que levou à sua ampla adoção nos últimos dez anos (QUEVEDO, 2016).

Como visão para o futuro, espera-se uma busca exponencial por meio de testes in silico com um número cada vez maior de moléculas, com tendo em vista obter novos resultados que sejam igualmente ou até mais satisfatórios do que os alcançados atualmente. Além disso, prevê-se que haverá uma continuação da validação dos resultados obtidos através de testes de dinâmica molecular e ensaios experimentais.

Referências

SILVA, Tales Natan Freitas da et al. Estudo in silico de compostos como potenciais fármacos antivirais contra o Vírus do Nilo Ocidental. *Revista de Pesquisa em Ciências da Saúde*, v. 10, n. 2, p. 628, 2023. Disponível em: <https://periodicos.ifsul.edu.br/index.php/thema/article/view/2199/2106>, Acesso em: 24 jul 2024.

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. Uma investigação de química quântica de um potencial medicamento inibidor contra o vírus da dengue. , | *RSC Adv*, 9 pg, 6 de jun 2016. Acesso em: 24 de jul 2024. Ourique, Mariana da Costa. Estudo in silico da interação de inibidores peptídicos com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) de diferentes espécies, 130 pg, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/26084/1/Estudoinilico_Ourique_2018.pdf. Acesso em: 24 de jul 2024.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. O vírus do Nilo Ocidental. *Microbiologia. Ciência Rural*, v. 39, n. 2, abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000070>. Acesso em: 24 jul 2024. BRASIL. Ministério da Saúde. Febre do Nilo Ocidental. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-nilo-ocidental>. Acesso em: 24 de jul 2024.

HAMMAMY, M. Zouhir. Desenvolvimento e caracterização de um novo peptídeomimético inibidores da protease NS2B-NS3 do vírus do Nilo Ocidental.

Erlangung des Doktorgrades vorgelegt von dem Fachbereich Pharmazie aus Aleppo/Síria Marburgo/Lahn 2014 der Philipps-Universität Marburg. Acesso em: 24 de jul 2024. Rang H.P. and Dale M.M., Pharmacology. 5th ed. Elsevier, Amsterdam (2003). Acesso em: 24 de jul 2024.

QUEVEDO, C. V. Triagem virtual em banco de dados de ligantes considerando propriedades físico-químicas de um modelo de receptor totalmente flexível. 2016. 161 f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciência da Computação) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Acesso em: 24 de jul 2023.

PLETNEV, Alexander et al. Quimeras do vírus do Nilo Ocidental/vírus da dengue tipo 4 com redução da neurovirulência e da virulência periférica sem perda de imunogenicidade ou eficácia protetora. CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, [s. l.], v. 99, ed. 5, 5 mar. 2002. SERRANO, Caroline Paredes et al. ARBOVÍRUS EM EMERGÊNCIA: INFECÇÃO PELO VÍRUS DO NILO OCIDENTAL NO BRASIL.

JEFFREY, G. A. An Introduction to Hydrogen Bonding. Oxford: Oxford University Press, 1997. DESIRAJU, G. R.; STEINER, T. The Weak Hydrogen Bond: In Structural Chemistry and Biology. Oxford: Oxford University Press, 1999.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; ST AHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. Journal of Medicinal Chemistry, v. 53, n. 14, p. 5061–5084, 2010. DOI: 10.1021/jm100112j. NISHIO, M. CH/ π hydrogen bonds in biological macromolecules. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 16, n. 24, p. 12648–12683, 2014. DOI: 10.1039/C4CP00038E.

Anexos

Fig. 01: Visualização do complexo 3,4-diclorofenilacetil-Lys-Lys-GCMA, segmentado por regiões I, II, III e IV.

Fig. 02 Ilustração gráfica BIRD que destaca os resíduos mais significativos na interação com o ligante, apresentando as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante.

Fig. 03 Energia de interação total em função do raio, calculado durante o estudo de convergência considerando constante dielétrica de 10 e 40.

Fig. 04 Representação das interações moleculares entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína, evidenciando van der Waals (em amarelo), pontes de hidrogênio (em vermelho) e interações π -alquil (em verde).

Fig. 05 Representação das interações moleculares entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína, evidenciando pontes de hidrogênio (em vermelho) e interações π -alquil (em verde).

CÓDIGO: SB0502

AUTOR: RAFAELA TORRES DANTAS DA SILVA

ORIENTADOR: NAIANNE KELLY CLEBIS

TÍTULO: Estabelecimento de linhagens primárias de cultura de células: isolamento, diferenciação e polarização de monócitos da medula óssea de camundongos Balb/c

Resumo

No atual cenário de transição epidemiológica, o câncer se destaca como a segunda principal causa de morte no Brasil. O estudo do sistema imune e sua interação com patologias crônicas é crucial para o desenvolvimento de novas terapias. O microambiente tumoral (TME) é um ecossistema complexo onde células não tumorais, como os macrófagos, podem ser "reprogramadas" para atuar a favor do tumor. Macrófagos pró-inflamatórios (tipo M1) são desejáveis no combate ao câncer, enquanto os anti-inflamatórios (tipo M2) estão associados a um pior prognóstico. Com o objetivo de criar uma ferramenta terapêutica, este estudo buscou estabelecer um protocolo eficaz para a diferenciação e polarização de macrófagos. Pesquisadores isolaram células da medula óssea de camundongos e as diferenciaram em macrófagos usando GM-CSF. Em seguida, essas células foram polarizadas para o fenótipo M1 com a adição de LPS e IFN- γ . A eficácia do protocolo foi confirmada por meio de análises. A análise morfológica revelou a característica de macrófagos M1, enquanto a citometria de fluxo demonstrou um aumento significativo de células CD68⁺ (um marcador de macrófagos) no grupo tratado. Assim, o protocolo se mostrou eficiente tanto na captação de células-tronco da medula óssea quanto na sua diferenciação para a linhagem de macrófagos, abrindo caminho para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam reverter o comportamento pró-tumoral dessas células.

Palavras-chave: Cultivo de células, Polarização, Macrófagos, Medula óssea.

TITLE: Establishment of primary cell culture lines: isolation, differentiation, and polarization of monocytes from Balb/c mouse bone marrow.

Abstract

In the current epidemiological landscape, cancer stands out as the second leading cause of death in Brazil. Studying the immune system and its interaction with chronic diseases is crucial for developing new therapies. The tumor microenvironment (TME) is a complex ecosystem where non-tumor cells, such as macrophages, can be "reprogrammed" to act in the tumor's favor. Pro-inflammatory M1 macrophages are desirable in fighting cancer, while anti-inflammatory M2 macrophages are associated with a poorer prognosis. This study aimed to establish an effective protocol for differentiating and polarizing macrophages to create a therapeutic tool. Researchers isolated bone marrow cells from mice and differentiated them into macrophages using GM-CSF. These cells were then polarized to the M1 phenotype by adding LPS and IFN- γ . The protocol's effectiveness was confirmed through analysis. Morphological analysis revealed the characteristics of M1 macrophages, while flow

cytometry showed a significant increase in CD68⁺ cells (a macrophage marker) in the treated group. The protocol proved efficient in both capturing bone marrow stem cells and differentiating them into the macrophage lineage. This opens the door for developing therapeutic strategies that can reverse the pro-tumor behavior of these cells.

Keywords: Cell Culture, Polarization, Macrophages, Bone Marrow.

Introdução

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a projeção é até 2050 o número de novos casos de câncer aumentar mundialmente para 35 milhões, um crescimento de 77% em relação a 2022. Para o maior entendimento da interação complexa de doenças crônicas, como o câncer com o organismo, é importante entender o funcionamento do nosso sistema imune e como ele pode ser utilizado a nosso favor. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do nosso corpo, os macrófagos são células da imunidade inata e são células apresentadoras de antígenos (APCs) que fazem a ponte com a imunidade adaptativa ao serem capazes de ativar uma resposta imune humoral a partir da ativação de linfócitos T (ABBAS, A. K., et al. 2019). O microambiente tumoral (MAT) é o ambiente que cerca o tumor, contendo um conjunto de células, moléculas e outros fatores que interagem com o tumor e estando relacionados com a progressão tumoral. A interação do tumor com células não tumorais ocorre por meio de liberação de moléculas e citocinas por células tumorais e esse ambiente polariza as células não tumorais para trabalharem a favor do crescimento e permanência do tumor (XIAO; YU, 2021) (LIRA et al., 2024). Os macrófagos podem ser polarizados para diferentes subtipos de acordo com a influência do ambiente. Quando exposto à presença de Interferon-gama (INF- γ) os macrófagos apresentam uma característica pró-inflamatória, expressando fatores como IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e esse fenótipo é reconhecido como macrófagos do tipo M1. Sob a exposição a outras moléculas como a IL-4, IL-10 é formado um outro subtipo celular com atividade imunossupressora e anti-inflamatória que são os macrófagos do tipo M2 (NASROLLAHZADEH et al., 2020). O estímulo à diferenciação de macrófagos com a utilização do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) leva a uma diferenciação para um perfil mais pró-inflamatórios dos macrófagos. O GM-CSF estimula a ativação de diversas vias de sinalização como, JAK/STAT5, que irá ativar o fator de transcrição STAT5, via PI3K que está ligada a polarização dos macrófagos, via NF- κ B que sua ativação contribui para a expressão de genes pró-inflamatórios, além da ativação de outras vias que irão influenciar a diferenciação e polarização de macrófagos para um perfil M1 (ZHAN et al., 2019). Uma das maneiras mais clássicas de polarização dessas células é utilizando o auxílio do LPS + INF- γ , o estímulo com essa endotoxina e citocina induz a expressão de CXCL10, CXCL9, quimiocinas atrativas de células imunes (LUQUE-MARTIN et al., 2021; A MANTOVANI et al., 2004). Imunoterapias são tratamentos que objetivam direcionar o sistema imune para agir contra doenças complexas, como o câncer, e permitir uma nova perspectiva de tratamento para doenças crônicas. Esses novos tratamentos demonstram uma capacidade de induzir respostas duradouras e mais específicas, diminuindo as chances de aparecimento de efeitos adversos. Por isso, novas pesquisas na área são necessárias para aumentar as taxas de sucesso dessas terapias. (LUSTOSA, Amanda et al 2024). Então, seguindo a relevância das informações citadas anteriormente, este estudo teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo de diferenciação e polarização de macrófagos derivados de células da medula óssea de camundongos. A utilização do GM-CSF seguido com o tratamento por LPS+INF- γ foi escolhido por estarem relacionados na

literatura com a expressão de características de macrófagos com o fenótipo do tipo M1, pró-inflamatório (LUQUE-MARTIN et al., 2021; MAZHER et al., 2022)

Metodologia

O estudo foi realizado devido a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), com certificado de N° 344.026/2023. O protocolo utilizado foi uma modificação de técnicas previamente estabelecidas por Madaan et al. (2014) e Fleetwood et al. (2007). Foi utilizado camundongos BALB/c albinos gerados no biotério central da Fiocruz Pernambuco (AGGEU Magalhães), espécie *Mus musculus*, fêmeas e machos, entre 6-10 semanas de vida. Para a extração de células da medula óssea, os animais foram eutanasiado com uma superdose de cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10%, seguido de deslocamento cervical, segundo recomendação da CEUA/UNIFESP. Com materiais cirúrgicos esterilizados foi realizada uma incisão em cada perna traseira do animal objetivando expor os músculos. Foi cortado a perna traseira acima da articulação pélvica/quadril, para separar o membro inferior do resto do corpo. Deve ser assegurado que as epífises dos ossos permaneçam intactas para que não haja perda de material e o contato da medula com o meio externo, evitando possíveis contaminações. Foi retirado a pele e músculo das pernas traseiras dos animais com o objetivo de expor o osso. Após exposto, ainda com as epífises intactas, o Fêmur e a Tíbia são transferidos para um tubo cônico de 50 mL contendo álcool 70%. Os ossos são submersos no álcool por 2 min, para que haja a desinfecção da superfície do osso e logo após lavados em solução de fosfato salino tampão (PBS). A retirada do material da medula óssea do animal é realizada com o auxílio de uma seringa e agulha 26g, meio RPMI-1640 e o material foi armazenado em um tubo cônico 15mL. O material mantido no tubo cônico passou por processos de purificação para a obtenção de uma suspensão celular mais pura. Foi realizada a pipetagem vigorosa de todo o material extraído no animal, com o objetivo de serem desfeitos os grumos celulares. Quando o material se encontrou mais homogêneo foi efetuada a filtração da suspensão celular com um filtro de 70 μ m cell strainer, para outro falcon com o objetivo de separar materiais indesejados da suspensão de células, como restos de tecido conjuntivo. O material passou por centrifugação, e todas as centrifugações mantiveram as mesmas configurações de 1500 RPM por 8 min. Para purificar o material, o pellet foi ressuspensionado e incubado em 1mL de ACK Lysing Buffer, uma solução que lisante de hemácias, por 5 min. Em seguida foi adicionado mais 10mL de PBS nas células e centrifugado, novamente o sobrenadante é descartado. Para purificar a suspensão de células, esse passo de lavagem é repetido mais 2 vezes. Todo o processo de purificação da suspensão de células da medula óssea está representado na figura 1. Para o processo de diferenciação celular e captura de imagens as células foram contadas e plaqueadas em uma placa de 6 poços a uma densidade celular de 1×10^6 /mL por poço e em uma placa de petri nas dimensões 90x15mm em uma densidade celular final de 2×10^6 /mL, respectivamente. Durante esse período as células foram mantidas em cultura, Foi utilizado meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina e as células foram mantidas incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Todo o processo de diferenciação de monócitos para macrófagos ocorreu durante 6 dias, onde no dia 0 é realizada a primeira suplementação com o fator estimulador de colônia, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), dia 3 a adição de mais meio com o GM-CSF, dia 6 os monócitos encontram-se diferenciadas em macrófagos e, logo após, são tratadas com LPS + INF- γ para estimular a diferenciação em macrófagos do tipo M1, para a comparação da influência da exposição as citocinas nas células foi realizado a divisão em 3 grupos, Grupo A: Sem diferenciação, Grupo

B: GM-CSF, Grupo C: GM-CSF+LPS+INF- γ . No dia 8 as células se encontram diferenciadas em macrófagos e polarizadas para um perfil celular M1. A linha temporal do trabalho está exposta na figura 2. Para a comprovação do sucesso do protocolo proposto foi realizada a análise morfológica e citometria de fluxo das células. Para a realização da análise morfológica as células foram mantidas nas condições supracitadas em uma placa de petri 90x15mm a uma densidade de 2×10^6 , e as fotos foram tiradas no dia 0, dia 3, dia 6 e após 48h de tratamento por microscopia em campo claro (ZEISS Axio Vert A1). A confirmação da polarização dos macrófagos M1 foi feita por citometria de fluxo, utilizando o marcador CD68. As células foram coletadas de acordo com protocolo padronizado do LAICI. As células aderidas foram apanhadas por meio da utilização de um cell scraper, centrifugadas e lavadas com tampão PBS 1x e ressuspensas em PBA 0,5% e incubadas por 45 min para bloqueio de sítios inespecíficos em temperatura ambiente. O anticorpo monoclonal anti-CD68-FITC (1:500; Invitrogen, REF MA1-82739) conjugado com o fluoróforo FITC foi diluído em SFB com fator de diluição 1:500, as células após a centrifugação foram ressuspensas com o anticorpo e mantidas em câmara fria até a leitura no aparelho. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo modelo DxFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Science, Indianapolis, IN, USA), e pelo menos 10.000 eventos foram registrados por amostra. A população CD68+ foi considerada representativa dos macrófagos M1, de acordo com parâmetros previamente descritos na literatura por Mazher et al. (2022). A análise dos dados foi feita utilizando o software FlowJo 10.10 e GraphPad Prism 9, com estabelecimento de gates baseados na população de interesse e exclusão de detritos e células duplas.

Resultados e Discussões

É possível observar na figura 3 que acontece uma mudança na morfologia celular do dia 0 (setas pretas) para o dia 6 (setas amarelas) e essas alterações se intensificam após as 48h de tratamento (setas vermelhas), sendo possível observar um alongamento nas extremidades da célula. No dia 0 as células apresentam uma configuração oval e não aderente compatível com monócitos e passa a demonstrar uma morfologia alongada, aderente e estrelar, morfologia de macrófagos M1 já bem estabelecidas na literatura por autores como Zajac et al. (2013). As análises morfológicas permitiram observar características compatíveis com a linhagem macrófágica, enquanto a citometria de fluxo possibilitou a identificação de marcadores específicos de superfície celular, confirmando a diferenciação obtida após a indução com GM-CSF e o estímulo com LPS + IFN- γ (MAZHER et al., 2022). Nos dados obtidos por citometria de fluxo na figura 4 podemos observar o gráfico de dot plot, onde foi realizado um gate que indica a presença de células CD68+. Pode ser observado um aumento da quantidade de células marcadas comparando o gráfico do grupo A com os outros grupos, sendo mais evidenciado esse aumento em relação ao gráfico do grupo C. Os dados da intensidade de fluorescência foram transferidos para dados numéricos pelo software Flowjo e utilizados para análise estatística no GraphPad Prism. Na figura 5 observamos o gráfico de barras gerado comparando a porcentagem de células CD68+ com o grupo A - sem diferenciação. É evidente que há uma maior quantidade dessas células marcadas no grupo C - GM-CSF + LPS + INF- γ . Comparando os 3 grupos é possível afirmar que houve a diferenciação dessas células HSCs em macrófagos e que o tratamento de 48h com o LPS+INF- γ intensificou a diferenciação aumentando a quantidade dessas células. Os resultados presentes neste estudo mostram que houve uma maior diferenciação para macrófagos no grupo que, após o estímulo com GM-CSF foi tratado com LPS + INF- γ , o que corrobora com a literatura, em estudo realizado por Hayes, Wang e Norcross (1995) foi observado para que ocorra a produção de

interleucina-12 (IL-12) é necessário o tratamento prévio dessa célula com INF- γ que prepara a célula para responder o estímulo de LPS e consequentemente produzir a citocina.

Conclusão

Alguns autores como Luque-Martin et al, (2021) apontam a capacidade que o INF- γ sozinho tem de promover a diferenciação de monócitos humanos em macrófagos, assim abre a oportunidade para em próximos estudos comparar as características fenotípicas de monócitos estimulados por fatores como o GM-CSF com apenas o estímulo de INF- γ , e se essas características de monócitos humanos será capaz de se reproduzir com monócitos de camundongos. Em atividades internas experimentais no grupo de pesquisa a qual eu participo já foi bem estabelecido a importância do conhecimento sobre o entendimento de macrófagos e seus fenótipos. Jorquera-Cordero et al. (2022) mostrou em seu trabalho complexo que a utilização de macrófagos M1 para extração de vesículas extracelulares podem ser utilizadas para influenciar o ambiente ao qual o tumor está inserido. Em outro estudo do grupo, Araújo Júnior et al. (2023) discorre sobre a via STAT3/NF-K β e como ela pode influenciar o ambiente induzindo imunossupressão e a proliferação do fenótipo M2-TAMs, ao entender o funcionamento o autor propôs uma maneira inovadora com a utilização de ácido retinóico e anti-PD-L1 para inibir a ativação dessa via de sinalização, reduzindo a polarização de M2-TAMs (JORQUERA-CORDERO et al., 2022; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2023). Conforme exposto, a linha de pesquisa e utilização de macrófagos para o entendimento do funcionamento do TME e as células presentes no TIME é um caminho amplamente estudado no meu grupo de pesquisa. Meu trabalho complementa os conhecimentos adquiridos pelo grupo e abre novas possibilidades de acesso a essas células para futuramente serem testadas novas abordagens e direcionamento do ambiente ao qual os macrófagos possam estar inseridos no organismo. Dessa forma, após todas as análises realizadas, conclui-se que o protocolo implantado é eficaz na captação de células-tronco da medula óssea e na sua diferenciação para a linhagem de macrófagos. Essa diferenciação foi induzida com o uso de GM-CSF e potencializada por meio do tratamento com LPS e IFN- γ , demonstrando a viabilidade do modelo proposto para estudos relacionados à polarização e função macrofágica.

Referências

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier.

A MANTOVANI, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends In Immunology*, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 677-686, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.

ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina (org.). *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: Epsjv, Ioc, 2010. p. 254

ARAÚJO JÚNIOR, Raimundo Fernandes de et al. Retinoic acid-loaded PLGA nanocarriers targeting cell cholesterol potentialize the antitumour effect of PD-L1 antibody by preventing epithelial-mesenchymal transition mediated by M2-TAM in colorectal cancer. *Translational*

Oncology, [S.L.], v. 31, p. 101647, maio 2023. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101647>

ARAUJO JUNIOR, Raimundo Fernandes de et al. Ceramide and palmitic acid inhibit macrophage-mediated epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer. *Molecular And Cellular Biochemistry*, [S.L.], v. 468, n. 1-2, p. 153-168, 28 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-020-03719-5>.

BISGAARD, Line S. et al. Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression – implications for atherosclerosis research. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-10, 13 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep35234>

CAVALCANTE, Rômulo S. et al. STAT3/NF- κ B signalling disruption in M2 tumour-associated macrophages is a major target of PLGA nanocarriers/PD-L1 antibody immunomodulatory therapy in breast cancer. *British Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 178, n. 11, p. 2284-2304, 31 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15373>.

CARVALHO, Thaís Gomes de et al. Inhibition of murine colorectal cancer metastasis by targeting M2-TAM through STAT3/NF- κ B/AKT signaling using macrophage 1-derived extracellular vesicles loaded with oxaliplatin, retinoic acid, and Libidibia ferrea. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.L.], v. 168, p. 115663, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115663>.

CHANMEE, Theerawut et al. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers*, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 1670-1690, 13 ago. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers6031670>.

FLEETWOOD, Andrew J et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: implications for csf blockade in inflammation. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 178, n. 8, p. 5245-5252, abr. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5245>.

GARNER, Robert. *Political animals: animal protection politics in Britain and the United States*. Basingstoke: Macmillan. 1998.

GORDON, Siamon; MARTINEZ, Fernando O.. Alternative Activation of Macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 593-604, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>.

HAYES, Mark P.; WANG, Jinhai; NORCROSS, Michael A.. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood*, [S.L.], v. 2, n. 86, p. 646-650, 15 jul. 1995.

HE, Yuanyuan et al. Effective breast cancer therapy based on palmitic acid-loaded PLGA nanoparticles. *Biomaterials Advances*, [S.L.], v. 145, p. 213270, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213270>.

JORQUERA-CORDERO, Carla et al. Extracellular Vesicles from M1-Polarized Macrophages Combined with Hyaluronic Acid and a β -Blocker Potentiate Doxorubicin's

Antitumor Activity by Downregulating Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer. *Pharmaceutics*, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 1068, 17 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14051068>.

LERNER, M. Modernization and Health: A Model of the Health Transition. Documento apresentado na Reunião Anual da American Public Health Association, São Francisco, Califórnia, 1973. Inédito.

LIRA, George et al. High M2-TAM Infiltration and STAT3/NF- κ B Signaling Pathway as a Predictive Factor for Tumor Progression and Death in Cervical Cancer. *Cancers*, [S.L.], v. 16, n. 14, p. 2496, 9 jul. 2024. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers16142496>.

LUSTOSA, Amanda et al. IMUNOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER: AVANÇOS RECENTES E FUTURAS DIREÇÕES NA ONCOLOGIA. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 813–820, 2024. DOI: 10.51891/rease.v10i3.13211. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/13211>. Acesso em: 17 maio. 2025.

LUQUE-MARTIN, Rosario et al. IFN- γ Drives Human Monocyte Differentiation into Highly Proinflammatory Macrophages That Resemble a Phenotype Relevant to Psoriasis. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 207, n. 2, p. 555-568, jul. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2001310>.

MADAAN, Alka et al. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *Journal Of Biological Methods*, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1, 7 fev. 2014. *Journal of Biological Methods*. <http://dx.doi.org/10.14440/jbm.2014.12>.

MAMILOS, Andreas et al. Macrophages: from simple phagocyte to an integrative regulatory cell for inflammation and tissue regeneration.: a review of the literature. *Cells*, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 276, 11 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells12020276>.

MAZHER, Mayada; MOQIDEM, Yomna Adel; ZIDAN, Mona; SAYED, Ahmed A.; ABDELLATIF, Ahmed. Autophagic reprogramming of bone marrow-derived macrophages. *Immunologic Research*, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 229-246, 1 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-022-09344-2>.

NASROLLAHZADEH, Elaheh et al. Pro-tumorigenic functions of macrophages at the primary, invasive and metastatic tumor site. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, [S.L.], v. 69, n. 9, p. 1673-1697, 4 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02616-6>.

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

CÓDIGO: SB0513

AUTOR: CARLOS VINICIUS DE SOUZA FELIPE

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DA ENCEFALOPATIA
PROGRESSIVA ASSOCIADA À LIPODISTROFIA (PELD): ESTUDO DE CASO E
REVISÃO DE LITERATURA

Resumo

A Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia (PELD) é uma doença neurodegenerativa pediátrica rara, autossômica recessiva, causada por variantes patogênicas do gene BSCL2. Caracteriza-se por declínio neuropsicomotor e evolução fatal ainda na infância, com ou sem fenótipo lipodistrófico associado. Apresentações atípicas, de progressão mais lenta, já foram descritas. Esta pesquisa, de natureza qualitativa e descritiva, é um estudo de caso associado a uma revisão narrativa da literatura. O caso estudado é o de uma paciente com suspeita de quadro atípico de PELD. Foram coletadas amostras de sangue da paciente e dos seus pais para investigação da presença da mutação associada à PELD. Simultaneamente, realizou-se levantamento bibliográfico sobre PELD em bases científicas. O caso descrito envolve paciente brasileira, heterozigota composta para variantes patogênicas de BSCL2 - uma delas ainda não descrita na literatura -, com fenótipo lipodistrófico e quadro extrapiramidal progressivo, mas de evolução lenta e sem regressão neuropsicomotora grave nem alterações metabólicas significativas. Um estudo comparativo preliminar levantou questionamentos relevantes acerca do diagnóstico e dos mecanismos fisiopatológicos da doença. Ao fim da pesquisa, espera-se ainda apresentar a relação genótipo-fenótipo atualizada para PELD com base em todos os casos já descritos, incluindo o nosso; e explorar os questionamentos já levantados.

Palavras-chave: Encefalopatias; Lipodistrofia Generalizada Congênita; Mutação.

TITLE: GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION IN PROGRESSIVE
ENCEPHALOPATHY WITH OR WITHOUT LIPODYSTROPHY (PELD): A CASE
STUDY AND LITERATURE REVIEW

Abstract

Progressive Encephalopathy with or without Lipodystrophy (PELD) is a rare pediatric neurodegenerative disease, autosomal recessive, caused by pathogenic variants in the BSCL2 gene. It is characterized by neuropsychomotor decline and fatal progression in childhood, with or without an associated lipodystrophic phenotype. Atypical presentations, with slower progression, have already been described. This research, qualitative and descriptive in nature, is a case study associated with a narrative literature review. The case studied is that of a patient with suspected atypical PELD. Blood samples were collected from the patient and her

parents to investigate the presence of the mutation associated with PELD. Simultaneously, a bibliographic search on PELD was conducted in scientific databases. The case described involves a Brazilian patient, compound heterozygous for pathogenic BSCL2 variants - one of them not yet described in the literature - with a lipodystrophic phenotype and progressive extrapyramidal condition, but with slow progression and without severe neuropsychomotor regression or significant metabolic alterations. A preliminary comparative study raised relevant questions regarding the diagnosis and pathophysiological mechanisms of the disease. At the end of the research, it is also expected to present an updated genotype-phenotype correlation for PELD based on all cases already described, including ours, and to further explore the questions raised.

Keywords: Encephalopathies; Congenital Generalized Lipodystrophy; Mutation.

Introdução

Nas últimas décadas, ampliou-se o conhecimento acerca do papel do tecido adiposo na fisiologia normal e na fisiopatologia das doenças metabólicas [1,2]. Além de funções clássicas, como armazenamento de energia, isolamento térmico e proteção mecânica, o tecido adiposo atua na regulação metabólica local e sistêmica, com secreção de hormônios e moléculas bioativas[1,2]. Entre estas estão as adipocinas, que regulam saciedade, inflamação, imunidade, função cardiovascular e o desenvolvimento de doenças como diabetes e câncer[3,4,5].

Diante disso, tem-se que alterações na composição e distribuição do tecido adiposo comprometem suas funções e causam repercussões patológicas. Um exemplo é a lipodistrofia – síndrome de ausência parcial ou completa de tecido adiposo subcutâneo, congênita ou adquirida[6,7]. O déficit de adipócitos impede o armazenamento normal de gordura, levando a esteatose ectópica, dislipidemia e resistência insulínica[6,8].

Um subgrupo importante são as lipodistrofias congênitas generalizadas (CGL), caracterizadas por ausência quase completa de tecido adiposo desde a infância[7]. A prevalência mundial é de 1 caso/12 milhões, mas no Rio Grande do Norte foi estimada em 1/31.000 habitantes[9]. Entre os subtipos, a CGL2, causada por variantes patogênicas do gene BSCL2, responsável pela proteína seipina - envolvida no metabolismo lipídico e na adipogênese -, se destaca por ser a forma mais grave[7]. Pacientes com CGL2 apresentam ausência total de tecido adiposo desde o nascimento, hipertrigliceridemia e esteatose hepática mais precoces e severas, além de possível comprometimento do sistema nervoso[6].

Nesse contexto, a Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia (PELD), ou Encefalopatia de Celia, é uma doença neurodegenerativa autossômica recessiva rara, de início precoce e prognóstico fatal na primeira década de vida. Também causada por variantes de BSCL2, pode ser considerada um subtipo de CGL2 com comprometimento neurológico grave[10,11]. Em um estudo de 2021[11], apenas 23 casos haviam sido descritos, sendo apenas um no Brasil.

A variante clássica da PELD é a c.985C>T, localizada no éxon 7 do transcrito longo da seipina[10,11]. Ela leva à intronização desse éxon e à formação da chamada seipina de Celia. O acúmulo dessas proteínas, principalmente no sistema nervoso, causa estresse do retículo endoplasmático, acúmulo nuclear e morte neuronal. Há outras variantes patogênicas cujo mecanismo ainda não está bem esclarecido, mas em todos os casos há ganho de função tóxico com acúmulo de proteínas mutadas[11].

Clinicamente, os pacientes apresentam atraso no desenvolvimento que evolui para involução, perda de fala, distúrbios de marcha, espasticidade, convulsões graves, dificuldades de deglutição e progressiva desconexão com o ambiente. As principais causas de morte são pneumonia aspirativa e status epilepticus. As manifestações de lipodistrofia variam: homozigotos para a mutação clássica costumam apresentar alterações metabólicas discretas, enquanto heterozigotos compostos com uma variante clássica de CGL2 associam lipodistrofia generalizada e quadro neurológico. Há relatos atípicos, como o de uma paciente heterozigota composta que sobreviveu até os 28 anos, sem lipodistrofia clássica nem convulsões, mas com neurodegeneração mais lenta e parkinsonismo na vida adulta[11].

Tendo em vista a raridade da PELD e considerando que um possível caso foi identificado no Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL-UFRN), faz-se necessário documentar a alteração genética do paciente e comparar suas características clínicas e genéticas com os relatos disponíveis na literatura.

Esta pesquisa objetiva, então, realizar uma revisão da literatura sobre casos de PELD no mundo e estudar o perfil genético de um paciente atendido no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL-UFRN) e da sua família.

Metodologia

Trata-se de uma pesquisa de natureza qualitativa e descritiva, classificada metodologicamente como um estudo de caso associado a uma revisão da literatura.

A primeira etapa consistiu na coleta de amostras de sangue periférico da paciente-alvo do estudo e de seus familiares. As amostras foram devidamente processadas, armazenadas e submetidas à extração de DNA genômico, seguida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior eletroforese em gel, com registro de todos os resultados obtidos. Como requisito para a realização da PCR, foi confeccionado um primer específico correspondente à mutação nova da paciente.

Paralelamente, desenvolveu-se uma revisão narrativa da literatura sobre a Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia (PELD), abrangendo publicações disponíveis em bases

científicas internacionais. Essa revisão foi utilizada como suporte para análise e discussão dos achados.

Além disso, procedeu-se à análise do caso clínico da paciente, baseada em registros médicos e exames complementares pregressos.

Resultados e Discussões

REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura ainda está em andamento e engloba os seguintes tópicos: gene BSCL2 e proteína seipina - estrutura e função; doenças associadas a variantes patogênicas do gene BSCL2; lipodistrofia congênita generalizada tipo 2; história e descrição inicial da PELD; caracterização clínica da PELD e variabilidade fenotípica; variantes patogênicas de BSCL2 associadas à PELD; hipóteses para os mecanismos patogênicos das mutações que levam à PELD. O maior foco é a revisão mais atual dos casos de PELD globalmente, de 2021, do grupo de pesquisa espanhol que originalmente caracterizou a síndrome. Ela apresenta o estado da arte do conhecimento sobre a condição e estabelece a relação genótipo-fenótipo entre todas as mutações associadas a PELD já descritas na literatura e as manifestações clínicas nos respectivos indivíduos acometidos. Também está sendo feita a busca individual por cada relato de caso já publicado.

RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A relação genótipo-fenótipo para a PELD, com base em todos os casos já descritos na literatura, será feita a partir da análise de cada um dos casos individualmente reportados e do estudo da revisão mais recente que os reuniu, realizada em 2021 por Sánchez-Iglesias et al [11]. A relação será representada a partir de um quadro-resumo contendo informações sobre 1) a identificação dos casos; 2) a variante patogênica detectada e; 3) as manifestações clínicas documentadas para cada paciente. Também será feita uma discussão comparando os casos entre si e o caso descrito nesta pesquisa com todos os demais.

ESTUDO DO CASO

Sob a luz da revisão de literatura, o estudo do caso da paciente está em progresso. O material base para esse estudo consiste nos prontuários médicos da equipe de saúde que atende a paciente e nos resultados de exames prévios realizados: exame físico geral e neurológico, exames laboratoriais, exames de imagem e sequenciamento genético. A análise deste caso foca tanto nas variantes patogênicas reveladas pelo sequenciamento genético quanto no quadro clínico evidenciado pelos registros médicos e demais exames.

O relato clínico do caso da paciente está descrito conforme a seguir. A paciente chegou à nossa equipe acompanhada da família, portando cópias do seu prontuário médico dos

serviços onde é acompanhada e um laudo de diagnóstico genético por sequenciamento de nova geração (NGS) - a maioria das informações sobre sua história clínica foram extraídas dos prontuários.

A paciente é filha de pais não consanguíneos, hígidos, e não há história de casos semelhantes ao seu na família. Sua história perinatal é normal, sem intercorrências notáveis. É relatado que a paciente apresentava, desde a infância, fenótipo lipodistrófico e hepatomegalia. Foi acompanhada desde então por um serviço de hepatologia pediátrica, recebeu o diagnóstico clínico (sem teste molecular) de síndrome de Berardinelli-Seip, e evoluiu com desenvolvimento neuropsicomotor e ganho de peso adequados.

Aos 18 anos, então, é descrito que a paciente iniciou sintomas neurológicos extrapiramidais, incluindo blefaroespasmos, distonia de língua e distonia de membros, que pioraram progressivamente. A síndrome extrapiramidal levou a restrição da mobilidade e disfagia, que culminaram em desnutrição. Foi avaliada por um equipe de genética médica aos seus 21, e o exame físico revelou desnutrição, escassez de tecido adiposo subcutâneo, hipertrofia muscular e síndrome extrapiramidal com rigidez muscular global, distonia orofacial, distonia de membros e tronco, marcha parkinsoniana, movimentos coreicos e desequilíbrio, além de tremor de intenção e disdiadococinesia bilateral. Atualmente, aos 22 anos, a paciente continua sendo acompanhada por equipe multidisciplinar. Se alimenta predominantemente por gastrostomia, está sob teste de responsividade com uso de levodopa para o parkinsonismo. Considera-se início de terapia com leptina recombinante.

Os exames laboratoriais e de imagem apresentados, realizados no início de 2024, mostraram poucas alterações. O perfil glicêmico estava normal, e o perfil lipídico mostrou apenas níveis baixos de HDL (35,1 mg/dL), apesar de história prévia de hipertrigliceridemia. Dosagens de creatina fosfoquinase, cortisol, aldosterona, eletrólitos, vitaminas lipossolúveis e testes de lesão e função hepática foram todos normais. Uma ressonância magnética de crânio mostrou atrofia cerebral, e ultrassonografias abdominais não revelaram alterações, apesar de história prévia de hepatomegalia.

No intuito de melhor compreender o caso da paciente no contexto das descrições atuais de PELD na literatura, também foi realizado um estudo comparativo entre o nosso caso e um outro relatado no passado, na Espanha. Ambos parecem ser apresentações atípicas de PELD, semelhantes na medida em que: ambos têm encefalopatia associada a variantes patogênicas de BSCL2, em heterozigose composta; ambos tiveram progressão muito mais lenta do que o normal e; em ambos predominam sintomas de síndrome extrapiramidal. Contudo, há diferenças importantes, a saber: apenas um tem fenótipo lipodistrófico associado; em um, a encefalopatia começou na infância, ainda que também tenha tido progressão lenta; apenas um teve regressão marcante do desenvolvimento neuropsicomotor e; os dois pares de mutação são bastante distintos. As principais questões levantadas pelo estudo comparativo foram: como é possível confirmar o diagnóstico de PELD em casos atípicos - é necessário comprovar o skipping do éxon 7? Quais motivos levaram à tão lenta progressão da PELD

nesses casos - é a característica da variante patogênica ou a influência de fatores protetores genéticos e ambientais? Tais questões serão exploradas após término da revisão de literatura em associação com o estudo de caso da paciente.

Conclusão

A Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia (PELD) é uma condição rara, de evolução geralmente precoce e fatal, associada a variantes patogênicas do gene BSCL2. Embora a maioria dos casos apresente curso acelerado e manifestações neurológicas graves, há descrições de apresentações atípicas que cursam, por exemplo, com progressão lenta e sintomas predominantemente extrapiramidais.

A presente pesquisa, ainda em andamento, relata o caso de uma paciente com quadro sugestivo de PELD de apresentação atípica, atendida no ambulatório de Endocrinologia do HUOL-UFRN. A paciente apresenta heterozigose composta para variantes de BSCL2, com fenótipo lipodistrófico e quadro extrapiramidal progressivo, mas sem regressão neuropsicomotora grave ou manifestações metabólicas intensas, o que a aproxima de outros relatos atípicos previamente descritos. Um estudo comparativo preliminar, realizado entre o nosso caso e os demais relatados, já levantou questionamentos importantes, como a necessidade de comprovação do skipping do éxon 7 para o diagnóstico definitivo de PELD e os possíveis fatores que explicam a evolução mais lenta nos pacientes com quadro atípico. Ao fim da pesquisa, espera-se ainda apresentar a relação genótipo-fenótipo atualizada para PELD com base em todos os casos já relatados, incluindo o nosso; e explorar os questionamentos acima descritos.

Este trabalho reforça a importância de estudos de caso detalhados em doenças raras e do esforço para reuni-los e compará-los de forma sistemática. Também, demonstra a relevância de integrar a análise genética aos dados clínicos, a fim de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos em tais doenças.

Referências

1. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2004 [cited 2024 Sep 26]; 89(6):2548-2556. Available from: <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>.
2. Richard AJ, White U, Elks CM, Stephens JM. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. [Updated 2020 Apr 4]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>.
3. Clemente-Suárez VJ, Redondo-Flórez L, Beltrán-Velasco AI, Martín-Rodríguez A, Martínez-Guardado I, Navarro-Jiménez E, Laborde-Cárdenas CC, Tornero-Aguilera JF. The Role of Adipokines in Health and Disease. *Biomedicine* [Internet]. 2023 [cited 2024 Sep

26]; 11(5). Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10216288/#B1-biomedicines-11-01290>.

4. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Invest* [Internet]. 2015 [cited 2024 Sep 26]; 21(1):57-74. Available from:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25781552/>.

5. Gomes BF, Accardo CM. Mediadores imunoinflamatórios na patogênese do diabetes mellitus. *Einstein (São Paulo)* [Internet]. 2019 [citado 26 set 2024]; 17(1). Disponível em:https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2019RB4596.

6. Akinci B, Gular MC, Oral EA. Lipodystrophy Syndromes: Presentation and Treatment. [Updated 2024 Aug 21]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513130/>.

7. Lima JG, Feijo BMXCRR, Lima DN, Campos JTADM. Lipodistrofias de base genética: apresentação clínica, diagnóstico, comorbidades e tratamento. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* [Internet]. 1o de abril de 2021 [citado 26 de novembro de 2024];31(1):44–51. Disponível em:<http://socesp.org.br/revista/edicao-atual/lipodistrofias-de-base-genetica-apresentacao-clinica-diagnostico-comorbidades-e-tratamento/111/811/>.

8. Valerio CM, Viola LF, Guidorizzi NR, Lima JG, Godoy-matos AF, Hohl A et al. Brazilian expert consensus on the diagnosis, classification, screening for complications and treatment of familial partial lipodystrophy. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 2025 [cited 2025 Jun 03]; 17(1):186. Available from:<https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13098-025-01733-5>.

9. Medeiros LBA, Dantas VKC, Sarmiento ASC, Agnez-Lima LF, Meireles AL, Nobre TTX, Lima JG, Campos JTAM. High prevalence of Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in Rio Grande do Norte State, Northeast Brazil. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 26]; 9:1-6. Available from:<https://doi.org/10.1186/s13098-017-0280-7>.

10. Guillén-Navarro E, Sánchez-Iglesias S, Domingo-Jiménez R, Victoria B, Ruiz-Riquelme A, Rábano A, et al. A new seipin-associated neurodegenerative syndrome. *J Med Genet* [Internet]. 2013 [citado 8 de novembro de 2024];50(6):401–9. Available from:<https://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2013-101525>.

11. Sánchez-Iglesias S, Fernández-Pombo A, Cobelo-Gómez S, Hermida-Ameijeiras Á, Alarcón-Martínez H, Domingo-Jiménez R, et al. Celia's encephalopathy (Bsc12-gene-related): current understanding. *JCM* [Internet]. 1 de abril de 2021 [citado 8 de novembro de 2024];10(7):1435. Available from:<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/7/1435>.

CÓDIGO: SB0548

AUTOR: EMILY LIMA OLIVEIRA

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Diferenciação e maturação de células dendríticas da medula óssea de camundongos BALB/c: um modelo para estudos imunoterapêuticos experimentais.

Resumo

As células dendríticas (DCs) fazem parte da classe de células responsáveis por fazer a ponte entre as imunidades inata e adaptativa, processando e apresentando antígenos. Este estudo buscou estabelecer um modelo de DCs in vitro a partir de camundongos BALB/c para realização de testes de formulações imunoterapêuticas. Para isso, precursores da medula óssea de camundongos foram diferenciados por sete dias com GM-CSF e em seguida, foram ativados com Poly I:C, um agonista de TLR3. Análises morfológicas mostraram a maturação das DCs, com mudanças progressivas e aumento de prolongamentos citoplasmáticos. A análise fenotípica confirmou a diferenciação, com alta expressão de CD11c, especialmente no grupo tratado com Poly I:C. A expressão gênica de TLR6 aumentou, sugerindo uma regulação cruzada entre TLRs. Os ensaios de ELISA revelaram que a diferenciação com GM-CSF elevou a produção de IL-1 β . No entanto, o tratamento com Poly I:C não aumentou a produção de citocinas, o que pode indicar uma limitação relacionada com a forma de administração deste agonista. O estudo conclui que o protocolo é eficaz na obtenção de DCs maduras e funcionais in vitro, validando o modelo para estudos imunoterapêuticos ao padronizar um modelo experimental reprodutível e relevante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: sistema imunológico inato, imunoterapia, GM-CSF, Poly I:C.

TITLE: Differentiation and maturation of bone marrow-derived dendritic cells from BALB/c mice: a model for experimental immunotherapeutic studies.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are part of the class of cells responsible for bridging the innate and adaptive immune systems, by processing and presenting antigens. This study aimed to establish an in vitro DC model from BALB/c mice for testing immunotherapeutic formulations. For this purpose, bone marrow precursors from mice were differentiated for seven days with GM-CSF and then activated with Poly I:C, a TLR3 agonist. Morphological analyses showed DC maturation, with progressive changes and an increase in cytoplasmic extensions. Phenotypic analysis confirmed the differentiation, with high expression of CD11c, especially in the Poly I:C-treated group. Gene expression of TLR6 increased, suggesting a potential cross-regulation among TLRs. ELISA assays revealed that differentiation with GM-CSF increased IL-1 β production. However, Poly I:C treatment did not increase cytokine production, which may indicate a limitation related to this agonist's administration method. The study concludes that the protocol is effective in obtaining mature and functional DCs in vitro, validating the model for immunotherapeutic studies by

standardizing a reproducible and relevant experimental model for the development of new therapeutic strategies.

Keywords: innate immune system, immunotherapy, GM-CSF, Poly I:C.

Introdução

O sistema imunológico é um sistema complexo do nosso organismo, composto por diversas células, tecidos e moléculas, com capacidade de reconhecer e eliminar ameaças ao organismo a qual pertence, sejam essas ameaças patógenos ou células autógenas que sofreram alterações nocivas, como células neoplásicas [1]. Esse sistema pode ser dividido em: sistema inato — do latim *innatus*, ‘nascido com’ — o qual é a parte do sistema imunológico presente desde o nascimento, com resposta inespecífica e sem memória imunológica — e adaptativo, caracterizado por suas células especializadas que passam por reorganizações genéticas em resposta às ameaças detectadas [2].

A primeira vez em que a ideia de que o sistema imunológico adaptativo dependia do sistema imunológico inato para ser ativado foi introduzida em 1989 por Charles Janeway, no seu estudo intitulado “Aproximando-se do ponto de equilíbrio? Evolução e Revolução em Imunologia” [3]. Nesse estudo, Janeway sugeriu que as células do sistema imunológico possuíam Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), capazes de identificar Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) — que seriam apresentados quando células autógenas estão sofrendo apoptose ou necrose e, consequentemente, liberando moléculas intracelulares não comumente expostas ao sistema imunológico — e que a partir do reconhecimento desses padrões, células do sistema imunológico inato apresentariam o antígeno ao sistema imunológico adaptativo por meio da interação entre o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e os receptores de células T ou B (TCR e BCR, respectivamente).

Atualmente, sabe-se que três sinalizações diferentes são necessárias para uma ativação completa e eficaz do sistema imunológico adaptativo: a apresentação de um antígeno conjugado ao MHC para o TCR/BCR; a ligação de proteínas dos checkpoints imunológicos compostos por pares de moléculas co-estimulatórias expressas pelas APCs e pelos linfócitos T/B, que transmitem sinais para ativação ou manutenção da tolerância para esses linfócitos; e secreção de citocinas pelas APCs [4-7]

As DCs são células advindas de precursores da medula óssea que formam uma população fenotipicamente e funcionalmente heterogênea, estando presentes em praticamente todos os tecidos do organismo, com exceção do cérebro, fazendo uma função de sentinela imunológica [8]. E além do seu papel como sentinela, as DCs desempenham um papel fundamental no microambiente tumoral, exercendo um papel central como sentinelas e moduladoras da resposta imunológica adaptativa, conferindo múltiplos benefícios à resposta antitumoral [8].

Além da capacidade de promover a ativação e diferenciação de linfócitos T naíve em efetores, essas células secretam quimiocinas que favorecem o recrutamento de linfócitos T ao interior do tumor, contribuindo para a formação de um microambiente imunologicamente ativo. Estratégias baseadas no uso de DCs têm demonstrado indução de respostas T específicas e duradouras, além de sinergia com outras modalidades terapêuticas, como quimioterapia, radioterapia e anticorpos monoclonais [9-11].

Em suma, as DCs são alvos estratégicos no desenvolvimento de novas imunoterapias, onde há crescente interesse em abordagens capazes de promover uma ativação imunológica específica e eficaz contra células tumorais [12]. Contudo, o desenvolvimento dessas estratégias terapêuticas exige modelos experimentais confiáveis que permitam avaliar a interação entre as DCs e os agentes terapêuticos.

Assim, o presente trabalho propõe a diferenciação de células dendríticas a partir da medula óssea de camundongos BALB/c, seguida de maturação com Poly I:C, visando analisar suas características morfológicas, fenotípicas e funcionais, com foco em sua aplicabilidade como ferramenta em imunoterapia e modelos experimentais.

Metodologia

Animais experimentais e condições de alojamento

Esse estudo foi aprovado pela CEUA/UFRN sob certificado n.º 344.026/2023 (anexo A). Seis camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem isogênica BALB/c (3 machos e 3 fêmeas), com idade entre 6-10 semanas e peso entre 20-28 g, foram utilizados para a coleta da medula óssea.

Isolamento da medula óssea

Os camundongos foram eutanasiados com a administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (64 mg/kg), seguida de deslocamento cervical. Foi feita uma incisão nos membros posteriores do camundongo com uma tesoura cirúrgica estéril, para retirada da pele e exposição dos músculos. Após retirada da pele, o membro do animal foi retirado a partir de um corte acima da articulação pélvica, a dissecação do fêmur e tíbia foi realizada, e em seguida as epífises de ambos os ossos foram cortadas, expondo a medula óssea, coletada com o auxílio de uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha de calibre 26G e meio de cultivo celular RPMI (RPMI-1640, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat. n.º 31800089).

Preparação da suspensão de células

As células foram homogeneizadas até que uma suspensão de células completamente homogênea fosse atingida, foram filtradas e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 8 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com tampão de lise de hemácias (ACK Lysing Buffer, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat. n.º A1049201). Após o tempo de incubação, 10 mL de solução salina tampão com fosfato (PBS) foram adicionados à suspensão de células, sendo feita mais uma centrifugação a 1500 rpm por 8 minutos, processo que foi repetido mais duas vezes. Na sequência, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripiano (Trypan Blue, Sigma-Aldrich, Cat. n.º T8154, EUA) para que somente as células viáveis fossem contabilizadas.

Cultivo celular

As células foram distribuídas em placas de 6 poços com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Bio Nutrientes, Cat. n.º FEO-500, Brasil) + 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), na densidade populacional de 5×10^5 células/mL e suplementadas duas vezes, nos dias 1 e 4 a partir do início do cultivo celular, com GM-CSF (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Cat. n.º PMC2015) na concentração 20 ng/mL. No dia 7, as células foram consideradas prontas para coleta e continuidade dos ensaios in vitro.

Tratamento de células diferenciadas com Poly I:C

No sétimo dia após início da suplementação com GM-CSF, as células foram tratadas com meio RPMI (controle negativo) e Poly I:C (Sigma-Aldrich, Cat. n.º P1530, EUA) na concentração de 200 µg/mL. Os tratamentos foram aplicados por 48 horas, após as quais foram realizados os ensaios subsequentes.

Análise morfológica

As células foram plaqueadas na densidade 5×10^5 para análise morfológica. Nos dias 1 e 4, as células receberam suplementação com GM-CSF a 20 ng/mL e no dia 7, foram tratadas com Poly I:C (200 µg/mL). Em cada um dos dias citados e 48h após o início do tratamento com Poly I:C, as células foram fotografadas em um microscópio óptico Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha), nos aumentos de 200x, 400x e 630x.

Citometria de fluxo

Após o tratamento, as células foram separadas com um raspador de células e bloqueadas com PBS + albumina bovina a 0,5% (PBA) por 45 minutos. Em seguida, as células foram marcadas com Anti-CD11c (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. n.º 13-0114-82, RRID:AB_466363, 1:100) a 4 °C por 30 minutos, seguido de incubação com um anticorpo secundário Anti-Mouse, FITC (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. n.º F2761, RRID:AB_2536524, 1:200) em temperatura ambiente por 40 minutos. Após uma etapa final de lavagem, as aquisições dos eventos foram realizadas em citômetro de fluxo DxFLX (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, EUA), e os dados foram analisados com o software FlowJo, versão 10.10.0 (BD Life Sciences, Ashland, OR, EUA). Células não selecionadas por gating, exceto para a exclusão de detritos. Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em quadruplicata, com no mínimo 8.000 eventos contabilizados por amostra.

Análise da expressão gênica de TLR2 e TLR6 por qRT-PCR

Após tratamento, os seguintes genes tiveram sua expressão analisada, com amostras em triplicata: β -actina (F, 5' - GTGGATCAGCAAGCAGGAGT - 3' e R, 5' - TGTCACCTTCACCGTTCCAG - 3'), TLR2 (F, 5' - CGAGTGGTGCAAGTACG - 3' e R, 5' - GGTAGGTCTTGGTGTTCATTATC - 3'), e TLR6 (F, 5' - CCGGTGGAGTACCTCAAT - 3' e R, 5' - TCAGCAAACACCGAGTATAGC - 3'). O qRT-PCR foi realizado usando o PowerUp SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, Cat. n.º 100029284, Waltham, MA, EUA) e a ciclagem térmica foi realizada conforme protocolo recomendado pelo fabricante, utilizando as condições padrão com ativação da polimerase a 95 °C por 2 minutos, seguida de quarenta ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto. A expressão gênica foi quantificada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Para realizar a quantificação de citocinas, após 48 horas de tratamento, os sobrenadantes da cultura de células diferenciadas, em duplicata, foram coletados e realizou-se a técnica de ELISA sanduíche. As concentrações de IL-1 β e TNF- α foram determinadas utilizando os kits Mouse IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA (Cat. n.º DY401, R&D Systems, EUA) e Mouse TNF- α DuoSet ELISA (Cat. n.º DY410, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), respectivamente, conforme o protocolo do fabricante.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Análise morfológica

As células coletadas da medula óssea apresentaram características morfológicas clássicas de células pluripotentes: morfologia inespecífica, formato homogêneo e redondo, além de um tamanho reduzido, conforme a (Figura 1A, 1E e 1I). Três dias após o início da suplementação com GM-CSF (Figura 1B, 1F e 1J), a população celular já começava a perder sua homogeneidade, com uma parte das células mostrando um início de diferenciação, podendo ser percebido pela sua aderência nas placas de cultivo e a mudança no seu formato, que passou de um formato arredondado para a presença de pequenas ramificações. Já no sexto dia após o início da suplementação (Figura 1C, 1G e 1K), a maioria das células já apresentava características de diferenciação bem sucedida, com uma população heterogênea e células de maior tamanho. Ao final de 48 horas de tratamento com Poly I:C (Figura 1D, 1H e 1L), as células apresentaram uma morfologia semelhante à de células dendríticas maduras, que podem ser distinguidas dos macrófagos presentes na população por meio do seu formato mais arredondado e pseudópodes mais longos, finos e em maior quantidade.

Expressão do marcador CD11c por citometria de fluxo

As células foram marcadas com o anticorpo mouse anti-CD11c seguido de uma marcação com um anticorpo FITC anti-mouse visando observar as mudanças fenotípicas apresentadas pelas células como resultado da suplementação com GM-CSF e posteriormente com o tratamento com Poly I:C. Foram feitos controles com células que não receberam nenhum anticorpo (não marcadas) e células que receberam somente o anticorpo secundário, a fim de delimitar a marcação inespecífica devido à fluorescência do anticorpo FITC. As células suplementadas com GM-CSF tiveram um leve aumento na quantidade de células na população CD11c+, um aumento não suficiente para ser considerado significativo. Já o grupo que recebeu o tratamento com Poly I:C durante as 48h teve um aumento de 32 vezes na

quantidade de células pertencentes a população CD11c+ quando comparado ao grupo que recebeu somente GM-CSF ($p < 0,0001$).

qRT-PCR

A expressão gênica relativa dos receptores TLR2 e TLR6 foi avaliada por qRT-PCR em células diferenciadas e em células diferenciadas tratadas com Poly I:C (200 $\mu\text{g/mL}$). Para o TLR2, não foi observada alteração significativa na expressão relativa entre ambos os grupos, o que sugere que o estímulo das células com o agonista de TLR3 não altera a transcrição desse gene. Em contrapartida, a análise de TLR6 mostra um aumento expressivo e estatisticamente significativo ($p < 0,001$) na expressão desse gene em células que receberam o tratamento, indicando que o Poly I:C pode ter um papel na indução da expressão desse receptor frente a um estímulo imunológico promovido pelo tratamento.

ELISA

As citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β tiveram sua secreção quantificada por meio de ELISA no sobrenadante das células indiferenciadas, diferenciadas e diferenciadas tratadas com Poly I:C (200 $\mu\text{g/mL}$). A quantificação de TNF- α não teve uma diferença significativa estatisticamente entre os grupos, com sua concentração de mantendo estável em todos os três, indicando que a ativação do receptor TLR 3 não impacta na produção dessa citocina. Por outro lado, o grupo com células diferenciadas apresentou um aumento significativo na secreção de IL-1 β quando comparado ao grupo indiferenciado ($p < 0,01$) e o grupo tratado com Poly I:C (200 $\mu\text{g/mL}$) teve uma concentração semelhante de IL-1 β em relação ao grupo diferenciado, embora sem significância estatística detectável, indicando que a produção dessa citocina está associada à diferenciação das células, porém não é potencializada devido ao tratamento com Poly I:C.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado com sucesso a capacidade de diferenciar células mieloides derivadas da medula óssea de camundongos BALB/c em DCs *in vitro*, utilizando o fator de crescimento GM-CSF. Além disso, evidenciamos que essas células possuem a crucial capacidade de ativação e maturação, características indispensáveis para que as DCs atinjam seu potencial máximo como APCs [13]. A diferenciação de precursores da medula óssea em DCs por meio do GM-CSF é um método estabelecido e amplamente utilizado, mimetizando processos fisiológicos onde o GM-CSF desempenha um papel chave na mielopoiese e na geração de DCs [14].

Na análise morfológica, observou-se que, após sete dias de cultivo com GM-CSF, as células apresentaram alterações compatíveis com a morfologia de DCs imaturas (figura 1C, 1G e 1K), incluindo o aumento de tamanho, a formação de pequenos prolongamentos citoplasmáticos e forte aderência ao fundo da placa de cultura, quando comparadas às células inicialmente isoladas da medula óssea. Esses achados são consistentes com estudos prévios que descrevem tais mudanças como reflexo da reorganização do citoesqueleto, da redistribuição da membrana plasmática e da preparação da célula para funções de captura de antígenos [15].

Posteriormente, as células foram tratadas com Poly I:C e apresentaram características morfológicas condizentes com o processo de maturação, tais como prolongamentos citoplasmáticos mais longos e numerosos, aumento na relação núcleo/citoplasma e adesão

ainda mais intensa à placa [16-18]. Essas mudanças são características de DCs em maturação e estão associadas à preparação da célula para a migração aos órgãos linfoides e ativação de linfócitos T [19, 20].

A análise fenotípica das células diferenciadas revelou um aumento na população de células CD11c+, um marcador amplamente utilizado para caracterização de DCs [21-23], após 48h de tratamento com Poly I:C. Observou-se que a expressão de CD11c foi significativamente aumentada após a estimulação com Poly I:C (figura 2). Esse aumento pode ser atribuído ao processo de ativação e subsequente maturação das DCs em resposta ao tratamento com o Poly I:C [24-26]. A maturação induzida por estímulos de agonistas de TLRs, como o Poly I:C, é fundamental para que as DCs adquiram competência funcional como APCs, expressando níveis elevados de MHC, CD80/CD86 e a secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-12, essenciais para a ativação eficiente de linfócitos T naïve [27].

A análise da expressão gênica demonstrou que a estimulação com Poly I:C também levou a um aumento significativo na expressão de TLR6 (figura 3), apesar deste TLR não ser diretamente ativado pelo Poly I:C, o qual é um agonista clássico do TLR3. Estudos prévios sugerem que a ativação do TLR3 pode, indiretamente, ativar a expressão de outros receptores do tipo Toll, como o TLR2, por meio da modulação do ambiente inflamatório e do aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias [28, 29]. Além disso, a heterodimerização de alguns TLRs - como comumente ocorre com o TLR2 e TLR6 - tem sido descrita como mecanismo de amplificação da resposta imunológica inata, resultando na amplificação da gama de reconhecimento patogênico das APCs [30, 31], já que a ativação de TLRs combinadamente pode potencializar a maturação e a capacidade de apresentação antigênica dessas células [32].

Em relação à produção de citocinas, a análise do sobrenadante celular indicou que os níveis de TNF- α permaneceram semelhantes entre os grupos indiferenciado, diferenciado e tratado com Poly I:C, sugerindo que esse marcador inflamatório não foi significativamente modulado pelas condições testadas (figura 4). No entanto, observou-se um aumento significativo na secreção de IL-1 β no grupo diferenciado com GM-CSF em comparação ao grupo indiferenciado ($p < 0,01$), embora esse aumento não tenha sido estatisticamente significativo no grupo estimulado com Poly I:C. O aumento significativo da secreção de IL-1 β no grupo tratado com GM-CSF sugere que as células diferenciadas adquiriram capacidade funcional de iniciar uma resposta pró-inflamatória [33, 34]. Entretanto, a ausência de aumento adicional na secreção de IL-1 β após o tratamento com Poly I:C indica que o uso desse agonista na sua forma solúvel pode não ter sido suficiente para potencializar a liberação de IL-1 β , devido à localização celular do TLR3 [35]. Ainda assim, o aumento basal de IL-1 β após a diferenciação representa um indicativo funcional de que o protocolo utilizado pode gerar DCs com potencial pró-inflamatório, relevante para futuras aplicações em modelos de imunoterapia tumoral, onde a ativação do eixo IL-1 pode contribuir para a ruptura da tolerância imunológica e o favorecimento da resposta citotóxica.

Os dados obtidos neste estudo demonstram que o protocolo utilizado é eficaz na diferenciação de células mieloides derivadas da medula óssea de camundongos BALB/c em células dendríticas imaturas, por meio da suplementação com GM-CSF, bem como na indução de sua ativação e progressão para um fenótipo funcionalmente mais maduro após a estimulação com Poly I:C. A presença de alterações morfológicas compatíveis com a maturação, o aumento da expressão de CD11c e a modulação de citocinas e receptores do tipo Toll corroboram a aquisição gradual de características típicas de APCs ativas [36].

No entanto, é importante destacar que alguns aspectos observados sugerem mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Um exemplo disso é o aumento da expressão de TLR6 em resposta ao Poly I:C, agonista clássico do TLR3, indicando a possibilidade de interação cruzada entre vias de sinalização distintas, fenômeno já descrito em outras populações celulares, mas ainda pouco caracterizado no contexto da diferenciação e maturação de DCs. Além disso, a ausência de alterações significativas na secreção de TNF- α e IL-1 β após a estimulação com Poly I:C solúvel sugere que a forma de administração do agonista pode influenciar sua eficácia — sendo já relatado na literatura que a transfecção de Poly I:C, ao garantir sua internalização eficiente, promove respostas inflamatórias mais robustas [35].

Esses achados apontam para a necessidade de estudos complementares que explorem não somente outras vias de entrega do Poly I:C, como também a avaliação de um painel mais amplo de marcadores de superfície (como CD80, CD86, MHC II e CD40) e de citocinas imunomodulatórias (como IL-6, IL-12p70 e IFN- β), que são tradicionalmente associados ao processo de maturação funcional de DCs. Ainda, a inclusão de ensaios funcionais, como a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T ou de migrar em resposta a quimiocinas, poderia fornecer uma visão mais abrangente da competência imunológica das DCs geradas *in vitro*, aprofundando a compreensão sobre sua aplicabilidade em modelos pré-clínicos e terapêuticos.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram que a diferenciação de células pluripotentes da medula óssea de camundongos BALB/c em células dendríticas derivadas de monócitos pode ser realizada com sucesso por meio da suplementação com GM-CSF, gerando células com características morfológicas e fenotípicas compatíveis com células dendríticas imaturas, sendo, portanto, um modelo reprodutível e funcionalmente relevante para estudos *in vitro*. Além disso, a estimulação subsequente com Poly I:C mostrou-se capaz de promover alterações morfológicas, fenotípicas e moleculares compatíveis com o processo de maturação das DCs, como a elevação na expressão do marcador de superfície CD11c e a modulação positiva da expressão do TLR6.

Adicionalmente, os dados de expressão gênica revelaram um aumento significativo na expressão do receptor Toll Like 6, apesar do tratamento com um agonista do receptor Toll Like 3. Esse achado sugere a existência de um possível mecanismo de regulação cruzada entre esses dois receptores, o que pode amplificar a capacidade de reconhecimento patogênico e ativação do sistema imunológico advindo dessas células, ainda que o funcionamento desse possível mecanismo careça de elucidação.

Além disso, a secreção de citocinas pró-inflamatórias evidenciou a capacidade de aumentar significativamente a produção de IL-1 β pelo GM-CSF, enquanto o TNF- α permaneceu inalterado ao longo de todos os grupos. A ativação com Poly I:C não promoveu uma elevação significativa na secreção de IL-1 β , possivelmente devido à localização intracelular do TLR3 e à limitação da estimulação com Poly I:C na sua forma livre.

Dessa forma, este trabalho contribui para a caracterização funcional de um modelo *in vitro* de diferenciação e ativação de células dendríticas derivadas de células pluripotentes da medula óssea, fornecendo uma base experimental relevante para estudos futuros. Investigações complementares são necessárias, incluindo a análise de outros marcadores de ativação como

a análise molecular de TLR3 e quantificação de outras citocinas, como IL-12p70, bem como o uso de diferentes formas de entrega do Poly I:C, a fim de elucidar mais profundamente mecanismos envolvidos na ativação dessas células e seu papel na modulação da resposta imunológica.

Referências

- [1] DUNN, Gavin P; OLD, Lloyd J ; SCHREIBER, Robert D. The three Es of cancer immunoediting. Annual review of immunology, v. 22, p. 329–60, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032581/>>.
- [2] CARPENTER, Susan ; LUKE A.J. O'NEILL. From periphery to center stage: 50 years of advancements in innate immunity. Cell, v. 187, n. 9, p. 2030–2051, 2024.
- [3] JANEWAY, C.A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 54, n. 0, p. 1–13, 1989.
- [4] RASTOGI, Ichwaku; JEON, Donghwan; MOSEMAN, Jena E.; et al. Role of B cells as antigen presenting cells. Frontiers in Immunology, v. 13, p. 954936, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9493130/>>.
- [5] MANN, Elizabeth R. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 29, p. 9653, 2014.
- [6] TAI, Yu; WANG, Qingtong; KORNER, Heinrich; et al. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. Frontiers in Pharmacology, v. 9, n. 642, 2018.
- [7] VAN DEN EECKHOUT, Bram; TAVERNIER, Jan ; GERLO, Sarah. Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. Frontiers in Immunology, v. 11, 2021.
- [8] WANG, R. et al. The interaction of innate immune and adaptive immune system. MedComm, v. 5, n. 10, p. e714, 2024.
- [9] KATOPODI, Theodora; PETANIDIS, Savvas; CHARALAMPIDIS, Charalampos; et al. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells: Decisive Roles in Cancer Immunosurveillance, Immunoediting, and Tumor T Cell Tolerance. Cells, v. 11, n. 20, p. 3183, 2022.
- [10] WANG, Yingying; XIANG, Ying; XIN, Victoria W.; et al. Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. Journal of Hematology & Oncology, v. 13, n. 1, 2020.
- [11] WCULEK, Stefanie K.; CUETO, Francisco J.; MUJAL, Adriana M.; et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. Nature Reviews Immunology, v. 20, n. 1, p. 7–24, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41577-019-0210-z>>.
- [12] GHASEMI, Ali; AMAIA MARTINEZ-USATORRE; LI, Luqing; et al. Cytokine-armed dendritic cell progenitors for antigen-agnostic cancer immunotherapy. Nature cancer, v. 5, n. 2, p. 240–261, 2023.

- [13] ALLOATTI, Andrés; KOTSIAS, Fiorella; MAGALHAES, Joao Gamelas; et al. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunological Reviews*, v. 272, n. 1, p. 97–108, 2016.
- [14] HELFT, Julie; BÖTTCHER, Jan; CHAKRAVARTY, Probir; et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, v. 42, n. 6, p. 1197–1211, 2015.
- [15] LIU, Juan; ZHANG, Xiaomin; CHENG, Yujie; et al. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 18, n. 11, p. 2461–2471, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41423-021-00726-4>>.
- [16] KYUNG KIM, Min ; KIM, Jaeyun. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Advances*, v. 9, n. 20, p. 11230–11238, 2019. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ra/c9ra00818g>>.
- [17] NIKOLIC, Tatjana. Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *International Immunology*, v. 15, n. 4, p. 515–524, 2003.
- [18] ROUAS, R. et al. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *International Immunology*, Oxford, v. 16, n. 5, p. 767-773, 2004. DOI: 10.1093/intimm/dxh077.
- [19] XIAO, Qin ; XIA, Yuxian. Insights into dendritic cell maturation during infection with application of advanced imaging techniques. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 2023.
- [20] RIDGE, J. P.; DI ROSA, F.; MATZINGER, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, v. 393, n. 6684, p. 474–478, 1998. DOI: 10.1038/30989.
- [21] VASSILIOU, E.; JING, H.; GANEA, D. Prostaglandin E₂ inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cellular Immunology*, v. 223, n. 2, p. 120–132, jun. 2003. DOI: 10.1016/S0008-8749(03)00158-8.
- [22] LEE, HEEJAE; LEE, HEE JIN; SONG, IN HYE; et al. CD11c-Positive Dendritic Cells in Triple-negative Breast Cancer. *In Vivo*, v. 32, n. 6, p. 1561–1569, 2018.
- [23] IN, Hyunju; PARK, Ji Soo; SHIN, Hyun Soo; et al. Identification of dendritic cell precursor from the CD11c+ cells expressing high levels of MHC class II molecules in the culture of bone marrow with FLT3 ligand. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1179981, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38094300/>>. Acesso em: 17 abr. 2024.
- [24] LÖVGREN, T. et al. Enhanced stimulation of human tumor-specific T cells by dendritic cells matured in the presence of interferon- γ and multiple toll-like receptor agonists. *Springer*, v. 66, n. 10, p. 1333–1344, 2017. DOI: 10.1007/s00262-017-2029-4
- [25] KOHRGRUBER, Norbert; HALANEK, Nicole; GRÖGERMarion; et al. Survival, Maturation, and Function of CD11c– and CD11c+ Peripheral Blood Dendritic Cells Are Differentially Regulated by Cytokines. *The Journal of Immunology*, v. 163, n. 6, p. 3250–3259, 1999.

- [26] U O'DOHERTY; PENG, M; S GEZELTER; et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. PubMed, v. 82, n. 3, p. 487–93, 1994.
- [27] KADOWAKI, Norimitsu; ANTONENKO, Svetlana ; LIU, Yong-Jun. Distinct CpG DNA and Polyinosinic-Polycytidylic Acid Double-Stranded RNA, Respectively, Stimulate CD11c–Type 2 Dendritic Cell Precursors and CD11c+Dendritic Cells to Produce Type I IFN. The Journal of Immunology, v. 166, n. 4, p. 2291–2295, 2001.
- [28] TEIXEIRA, Hellen S.; ZHAO, Jiawei; KAZMIERSKI, Ethan; et al. TLR3-Dependent Activation of TLR2 Endogenous Ligands via the MyD88 Signaling Pathway Augments the Innate Immune Response. Cells, v. 9, n. 8, p. 1910, 2020.
- [29] AGARWAL, Sandeep K; WU, Minghua; LIVINGSTON, Christopher K; et al. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. Arthritis Research & Therapy, v. 13, n. 1, p. R3–R3, 2011.
- [30] COLLESELLI, Katrin; STIERSCHNEIDER, Anna ; WIESNER, Christoph. An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Pro- and Anti-Inflammatory Processes. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 15, p. 12464, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10419760/>>.
- [31] AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi ; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- [32] BANCHEREAU, Jacques ; STEINMAN, Ralph M. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 1998.
- [33] GARDELLA, S. et al. Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells. Blood, v. 95, n. 12, p. 3809-3815, 2000.
- [34] DINARELLO, Charles A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews, v. 281, n. 1, p. 8–27, 2017.
- [35] RAJAN, Jayant V.; WARREN, Sarah E.; MIAO, Edward A.; et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by intracellular poly I:C. FEBS Letters, v. 584, n. 22, p. 4627–4632, 2010.
- [36] LEÓN, Beatriz; LÓPEZ-BRAVO, María ; ARDAVÍN, Carlos. Monocyte-derived dendritic cells. Seminars in Immunology, v. 17, n. 4, p. 313–318, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955712/>>.

Anexos

Figura 1 - Imagens obtidas por microscopia de óptica em diferentes aumentos (200×, 400× e 630×) demonstram a morfologia celular nos dias 1 (A, E, I), 4 (B, F, J), 7 (C, G, K) e 9 (D, H, L)

Figura 2 - Análise da expressão do marcador CD11c por citometria de fluxo.

Figura 3 - Gráficos de barras representam a média da expressão relativa dos genes TLR2 e TLR6, normalizada por gene de referência, em células dendríticas diferenciadas com GM-CSF (controle) e após estimulação com Poly I:C (200 µg/mL) por 48 horas.

Figura 4 - As concentrações de TNF- α e IL-1 β foram determinadas no sobrenadante de culturas de células dendríticas indiferenciadas, diferenciadas com GM-CSF e após estimulação com Poly I:C (200 µg/mL) por 48 horas.

Anexo A - Certificado da CEUA.

CÓDIGO: SB0551

AUTOR: SARAH LIMA ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: BRUNO CAVALCANTE BELLINI

TÍTULO: Nova espécie de Appendiciphora (Hexapoda, Collembola, Symphypleona) para a região Neotropical.

Resumo

O gênero *Katianna* Börner, 1906 compreende cerca de 40 espécies reconhecidas, distribuídas majoritariamente em regiões vinculadas às antigas massas continentais da Gondwana, sendo aproximadamente 20 descritas para a América do Sul e Central. Apesar dessa diversidade, não há registros formais no Brasil, indicando lacunas no conhecimento sobre a fauna de Katiannidae, situação já observada em outros grupos de Collembola. O gênero é diagnosticado pela presença de 2+2 ou 3+3 espinhos robustos na região frontal da cabeça, diferindo de *Sminthurinus* Börner, 1901, que possui cerdas finas, e pela cerda cefálica sd1, espinhosa em *Katianna* e fina em outros Katiannidae. Além disso, não apresenta cerda abdominal neosminturóide e a cerda a0 do pequeno abdômen é simples. Este estudo descreve uma nova espécie neotropical de *Katianna*, coletada no Chile e depositada na Coleção de Collembola da UFRN. O material foi triado, montado e analisado em microscópio óptico, com representações da cabeça, abdome e apêndices. A espécie distingue-se por antenômero IV não subdividido, vértice cefálico com 4+4 espinhos, úngues com pseudoníquia, unguículos com lamela interna serrilhada e dentes internos diferenciados, além de fórmula de cerdas ventrais do dens 1...2,4. Similar a *Katianna kuschelli* da Argentina, difere pelo complexo empodial e quetotaxia dental. O estudo contribui ao ODS 15 da Agenda 2030 da ONU.

Palavras-chave: Katiannidae, Fauna edáfica, Região Neotropical, Collembola.

TITLE: New species of Appendiciphora (Hexapoda, Collembola, Symphypleona) for the Neotropical region.

Abstract

The genus *Katianna* Börner, 1906 comprises about 40 recognized species, distributed mainly in regions linked to the ancient continental masses of Gondwana, with approximately 20 described for South and Central America. Despite this diversity, there are no formal records in Brazil, indicating gaps in knowledge about the fauna of Katiannidae, a situation already observed in other groups of Collembola. The genus is diagnosed by the presence of 2+2 or 3+3 robust spines in the frontal region of the head, differing from *Sminthurinus* Börner, 1901, which has fine bristles, and by the cephalic bristle sd1, which is spiny in *Katianna* and fine in other Katiannidae. In addition, it does not have a neosminturoid abdominal seta, and the a0 seta of the small abdomen is simple. This study describes a new neotropical species of *Katianna*, collected in Chile and deposited in the Collembola Collection of UFRN. The material was sorted, mounted, and analyzed under an optical microscope, with representations of the head, abdomen, and appendages. The species is distinguished by its

unsubdivided antennomer IV, cephalic vertex with 4+4 spines, ungules with pseudonychia, unguicula with serrated internal lamella and differentiated internal teeth, and ventral bristle formula of dens 1...2.4. Similar to *Katianna kuschelli* from Argentina, it differs in its empodial complex and dental chetotaxy. The study contributes to SDG 15 of the UN 2030 Agenda.

Keywords: Katiannidae, Edaphic fauna, Neotropical region, Collembola

Introdução

Collembola é atualmente uma das quatro classes de Hexapoda, juntamente com Protura, Diplura e Insecta (Zhang 2011, Bellinger et al. 2016). A classe é composta 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 Abdome I (BETSCH & WALLER 1989); os Apêndices subanaís 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 descrever uma 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, da 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 2022, onde pranchas descritivas foram organizadas. Para descrição taxonômica, a nova espécie foi comparada com congêneres neotropicais.

Resultados e Discussões

A seguir é apresentada a descrição da nova espécie e suas respectivas notas taxonômicas. 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 0 machos e 2 fêmeas, mesmos dados do holótipo. Antena. Antenômero I com 5 cerdas, sendo duas curtas e três alongadas; antenômero II com 16 cerdas; antenômero III com 24 cerdas, órgão apical com bastões em cavidades independentes (Fig. 1A); antenômero IV íntegro, sem divisão em subsegmentos, com verticilos de cerdas bem organizados, totalizando 146 cerdas (Fig. 1B).

Cabeça. com 8+8 olhos; região frontal com 4+4 espinhos entre as linhas de cerdas B e D, fórmula total 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, seguindo a fórmula: 5, 7(+1), 5, 4, 8(+1), 5, 5, respectivamente, região central de assimetria de cerdas circulada na figura 2. Com 3+3 cerdas pré-labrais (Fig. 2).

Perna I. Epicoxa com uma cerda reduzida, subcoxa com uma cerda pequenas, coxa com 3 cerdas, uma com tamanho reduzido; trocânter com 3 cerdas (uma reduzida); fêmur com 15 cerdas; tibiotarso com 45 cerdas, sendo 9 cerdas do tipo tenent hair na região apical; pré-tarso com 2 cerdas. Unguis com um dente interno, com pseudoníquia (com cristas serrilhadas); unguículo com um dente interno e lamela interna serrilhada (Fig. 3).

Perna II. Epicoxa com uma cerda reduzida, subcoxa com uma cerda, coxa com duas cerdas; trocânter com 5 cerdas, uma reduzida com alvéolo com formato alongado (órgão metatrocanteral); fêmur com 15 cerdas; tibiotarso com 44 cerdas, sendo 13 do tipo tenent hair; pré-tarso com 2 cerdas. Unguis, com um dente interno, com pseudoníquia (com cristas serrilhadas); unguículo com dois dentes principais internos e lamela interna serrilhada (Fig. 4).

Perna III. Epicoxa com uma cerda, subcoxa com uma cerda, coxa com 3 cerdas, sendo uma delas de tamanho reduzido e alvéolo largo ovalado; trocânter com 6 cerdas, sendo 2 reduzidas, e uma em alvéolo alargado (órgão metatrocanteral); fêmur com 15 cerdas, 3 delas de tamanho reduzido; tibiotarso com 46 cerdas totais, dessas, 13 terminais do tipo tenent hair; pré-tarso com 2 cerdas. Unguis sem dentes internos evidentes, túnica com pseudoníquia (com cristas serrilhadas); unguículo com dois dentes principais internos e lamela interna serrilhada (Fig. 5).

Grande abdome. Globoso, sem segmentação aparente, com quetotaxia densa, cerdas simples e lisas, espinhos dorsais ausentes; Tricobótrias A-C não observadas; Área parafurcal com 10 cerdas, sem cerda neosminturóide (Fig. 6).

Pequeno abdome. Formado pelos segmentos V e VI; tricobótria D presente e alongada; valva dorsal com cerdas as2-4, ms1-5, mps1-3, ps1-2, cerdas ms1 e ps1 ímpares. Valvas ventrais com cerdas aail-3, ail-8, mil-6, mpi1-2, pil-3;cerda mi5 como apêndice subanal característico do gênero; valva ventral com um espinho cuticular (Fig. 7).

Fúrcula. Manúbrio com 8 cerdas dorsais de cada lado; dens dorsal com 17 cerdas dorsais e 7 cerdas ventrais, seguindo a fórmula da base para o ápice: 1...2, 4. Mucro com lamela interna serrilhada e externa lisa, cerda mucronal ausente (Fig. 8).

Notas taxonômicas: As principais características diagnósticas da nova espécie são: antenômero IV íntegro, sem subsegmentação, região frontal da cabeça (vértice) com 4+4 espinhos largos, úngues com pseudoníquia e sem dentes laterais, unguículos com lamela interna serrilhada e com um dente interno principal na perna I, e dois nas pernas II-III, manúbrio com 8 cerdas dorsais, e dens com fórmula de cerdas ventrais como: 1...2, 4. Entre os táxons neotropicais, nossa nova espécie é mais similar a *Katianna kuschelli* Delamare-Deboutteville & Massoud, 1963 da Argentina, pela presença do antenômero IV sem subdivisões, vértice da cabeça com 4+4 espinhos e pseudoníquia nos ungues. Mesmo assim, a nova espécie difere de *K. kuschelli* pela presença de dois dentes internos nos unguículos das pernas II-III (apenas um em *K. kuschelli*), valva anal com espinho cuticular (sem espinho em *K. kuschelli*) e fórmula das cerdas ventrais do dens como 1...2, 4 (1...1, 2, 3 em *K. kuschelli*) (Delamare-Deboutteville & Massoud, 1963).

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

- AMARAL, Maria Luiza Oliveira do. Revisão do gênero *Hypogastrura* Bourlet, 1839 (Collembola, Poduromorpha, Hypogastruridae) na Região Neotropical, com descrição de uma nova espécie. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.
- BELLINI, Bruno Cavalcante; WEINER, Wanda Maria; WINCK, Bruna Raquel. Systematics, ecology and taxonomy of Collembola: Introduction to the special issue. *Diversity*, v. 15, n. 2, p. 221, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/d15020221>.
- BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. Checklist of the Collembola of the World. 1996–2013. Disponível em: <http://www.collembola.org>. Acesso em: 24 ago. 2025.
- BERNARD, Ernest C. *Katianna maryae* n. sp. (Collembola: Katiannidae), a southern Appalachian species of a Gondwanan genus. *Zootaxa*, v. 3754, n. 2, p. 148–158, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3754.2.2>.

BÖRNER, Carl. Die Familien der Collembolen. Zoologischer Anzeiger, v. 41, p. 315–322, 1913.

BRETFELD, Gerhard. Synopses on Palaearctic Collembola. Volume 2: Symphypleona. Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz, v. 71, p. 1–318, 1999.

BRETFELD, Gerhard. New records and species of Symphypleona (Insecta, Collembola) from canopy fogging in the central Amazonian rainforest of Brazil. Andrias, v. 15, p. 15–26, 2002.

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.

LIMA, Maria Geovana de Mesquita et al. Collembola diversity across vegetation types of a Neotropical island in a river delta. Diversity, v. 16, n. 8, p. 445, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/d16080445>.

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.

PALACIOS-VARGAS, José G.; VACAFLORES-ARGANDOÑA, Ma René. A new genus and species of Katiannidae (Collembola: Symphypleona) from Bolivia. Zootaxa, v. 4819, n. 2, p. 201–215, 2020. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4819.2.4>.

RAPOPORT, Eduardo H. The geographical distribution of Neotropical and Antarctic Collembola. Pacific Insects Monograph, v. 25, p. 99–118, 1971.

SILVA, Clécio Danilo Dias da. Ecologia e Taxonomia de Collembola (Arthropoda: Hexapoda) no Pampa brasileiro. 2023. Dissertação (Doutorado em Sistemática e Evolução) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

ZHANG, Zhi-Qiang (Ed.). Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Zootaxa, v. 3148, p. 1–237, 2011. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3148.1.1>.

Anexos

Figura 1. Antena da nova espécie de Katianna. A. antenômeros I, II e III. B. antenômero IV.

Figura 2. Cabeça dorsal da nova espécie de Katianna, * indica cerdas ímpares.

Figura 3. Perna I da nova espécie de Katianna.

Figura 4. Perna II da nova espécie de Katianna.

Figura 5. Perna III da nova espécie de Katianna.

Figura 6. Grande abdome da nova espécie de Katianna.

Figura 7. Pequeno abdome da nova espécie de Katianna.

Figura 8. Fúrcula da nova espécie de Katianna. A. Manúbrio. B. Dens. C. Mucro.

CÓDIGO: SB0567

AUTOR: JÉSSICA LOHHAYNE DE MELO LÚCIO

COAUTOR: DOROTH MIRANDA ALMEIDA SILVA

COAUTOR: INGRID ELAINE RODRIGUES DOMINGOS

COAUTOR: ANA CAROLAINÉ GOMES DE LIMA

ORIENTADOR: KEMAL ALI GER

TÍTULO: Impacto da salinização de água doce sobre a microalga *Cryptomonas obovata*

Resumo

A salinidade influencia a estrutura das comunidades e o funcionamento de ecossistemas aquáticos, e sua intensificação em corpos de água doce, causada por mudanças climáticas e ações antrópicas, representa risco à biodiversidade. Microalgas dulcícolas, por sua sensibilidade, podem atuar como bioindicadoras da qualidade ambiental. Este estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações de NaCl (0–1.8 g/L) sobre o crescimento de *Cryptomonas obovata*, gênero comum e nutricionalmente relevante para herbívoros, em laboratório. Sete tratamentos com três réplicas foram monitorados durante 17 dias por espectrofotometria e contagem celular. A ANOVA unifatorial confirmou o efeito significativo da salinidade ($F = 4,534$; $p < 0,001$), e o teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou que 0–1,5 g/L não diferiram estatisticamente, enquanto 1,8 g/L apresentou crescimento reduzido. Concentrações de 0 a 0,6 g/L favoreceram maior abundância celular e taxas de crescimento ($\sim 0,4\text{--}0,45\text{ d}^{-1}$), enquanto $\geq 1,5$ g/L inibiram o crescimento. Assim, testou-se a hipótese de que *C. obovata* apresenta crescimento satisfatório apenas em baixas concentrações ($< 1,0$ g/L), com forte inibição em níveis mais elevados. Como no semiárido nordestino, incluindo o RN, há registros de sódio entre 0,0025 e 2,8 g/L, muitos corpos d'água já excedem esse limiar de tolerância. Esses resultados reforçam o uso de microalgas como bioindicadoras e contribuem para a compreensão dos impactos da salinização em ecossistemas de água doce.

Palavras-chave: Salinização. *Cryptomonas obovata*. Microalgas dulcícolas

TITLE: Impact of freshwater salinization on the microalga *Cryptomonas obovata*

Abstract

Salinity influences the structure of communities and the functioning of aquatic ecosystems, and its intensification in freshwater bodies, caused by climate change and anthropogenic actions, poses a risk to biodiversity. Freshwater microalgae, due to their sensitivity, can act as bioindicators of environmental quality. This study evaluated the effect of different concentrations of NaCl (0–1.8 g/L) on the growth of *Cryptomonas obovata*, a common species nutritionally relevant to herbivores, in the laboratory. Seven treatments with three replicates were monitored for 17 days by spectrophotometry and cell counting. One-way ANOVA confirmed the significant effect of salinity ($F = 4.534$; $p < 0.001$), and Tukey's test

($p < 0.05$) indicated that 0–1.5 g/L did not differ statistically, while 1.8 g/L showed reduced growth. Concentrations of 0 to 0.6 g/L favored greater cell abundance and growth rates (~ 0.4 – 0.45 d^{-1}), while ≥ 1.5 g/L inhibited growth. Thus, the hypothesis that *C. obovata* shows satisfactory growth only at low concentrations (< 1.0 g/L), with strong inhibition at higher levels, was tested. As in the northeastern semi-arid region, including RN, there are records of sodium between 0.0025 and 2.8 g/L, many water bodies already exceed this tolerance threshold. These results reinforce the use of microalgae as bioindicators and contribute to the understanding of the impacts of salinization on freshwater ecosystems.

Keywords: Salinization. *Cryptomonas obovata*. Freshwater microalgae

Introdução

A salinidade é um dos principais fatores abióticos que regulam a distribuição e o funcionamento das comunidades aquáticas, sendo determinante para a composição de espécies e para os processos ecológicos em rios, lagos e reservatórios (CANEDO-ARGÜELLES et al., 2013; PAPASTERGIADOU et al., 2015). A salinização representa uma das maiores ameaças aos ecossistemas de água doce em nível global e aos sistemas naturais a eles ligados, afetando a biodiversidade e o bem-estar humano, uma vez que compromete a qualidade e a disponibilidade de água, além dos serviços ecossistêmicos associados (CUNILLERA-MONTCUSÍ et al., 2022). Em regiões semiáridas, como o Nordeste do Brasil, esse processo tende a ser ainda mais severo devido à redução das precipitações e ao aumento da evaporação, ampliando o risco de perda de habitats aquáticos (LEWITUS et al., 2000; PAPASTERGIADOU et al., 2015).

Pequenos aumentos na salinidade (< 1 g/L de NaCl) já podem impactar organismos dulcícolas, incluindo microalgas, sendo que diferentes espécies de fitoplâncton apresentam tolerâncias variáveis a esse estressor (CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2017). Esses impactos são variáveis entre os grupos biológicos, uma vez que algumas espécies de fitoplâncton mostram alta sensibilidade enquanto outras exibem maior tolerância, resultando em mudanças na composição das comunidades (CUNILLERA-MONTCUSÍ et al., 2020). Pesquisas com outros grupos de microrganismos dulcícolas, como as cianobactérias, revelam que a elevação do sal causa diminuição no crescimento, e na morfologia celular (DOMINGOS, 2021). No semiárido nordestino, incluindo o Rio Grande do Norte, a salinização de corpos d'água continentais já é evidente, com concentrações de sódio variando entre 2,5 e 2.800 mg L^{-1} , valores capazes de afetar significativamente organismos sensíveis e alterar a estrutura das comunidades aquáticas (FREIRE et al., 2020).

Nesse contexto, o fitoplâncton se destaca como organismos modelo para investigar as respostas fisiológicas e ecológicas à salinização. Elas constituem a base da produção primária, sustentam redes alimentares aquáticas e apresentam respostas rápidas a estressores ambientais, o que as torna bioindicadores eficientes (HUSZAR, 2011; TUNDISI, 2008). As Criptófitas, grupo de microalgas que compõem o fitoplâncton, ocupam posição singular entre as espécies fotossintetizantes. São microalgas caracterizadas por uma biologia peculiar, incluindo relações únicas entre envelope nuclear e cloroplasto (GIBBS, 1962) e, em algumas espécies, a produção de polissacarídeos extracelulares com papel ecológico relevante, atuando como barreiras protetoras e tamponantes osmóticos (PAULSEN, 1992). A espécie *Cryptomonas obovata*, de ocorrência dulcícola, compartilha essas características gerais do grupo e é reconhecida por sua plasticidade adaptativa. Contudo, ainda existem lacunas sobre seus limites fisiológicos frente a estressores ambientais, como a salinidade. Investigar esses

limites é urgente, pois o futuro da humanidade está ligado à preservação das águas e ecossistemas (Krenak, 2019)

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de salinidade NaCl sobre o crescimento da microalga *Cryptomonas obovata*, cultivada em condições laboratoriais controladas. Partimos da hipótese de que a espécie apresenta crescimento satisfatório apenas em baixas concentrações de sal ($< 1,0$ g/L), com forte inibição em níveis mais elevados, refletindo sua baixa tolerância à salinidade. Para isso, foram monitorados parâmetros de abundância celular e taxa intrínseca de crescimento, a fim de compreender os limites fisiológicos da espécie e discutir suas implicações para ecossistemas de água doce sujeitos ao processo de salinização.

Metodologia

- Organismo de estudo e manutenção do cultivo

O experimento foi realizado com a microalga *Cryptomonas obovata* (CCMA - UFSCar 148, WDCM835), cedida pela Universidade Federal de São Carlos. Trata-se de uma espécie eucariótica unicelular de ampla ocorrência em ambientes de água doce (GUIRY & GUIRY, 2025). Os cultivos foram mantidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 70 mL de meio Wright's Cryptophyte – WC (Guillard & Lorenzen, 1972). O meio foi previamente autoclavado (120°C , 1 atm, 15 min) e suplementado com 35 μL de solução vitamínica (proporção de 500 $\mu\text{L/L}$). As culturas foram incubadas sob condições controladas: temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro e iluminação artificial homogênea com uma intensidade de ~ 50 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para evitar sedimentação celular, os frascos foram agitados manualmente de forma periódica.

- Delineamento experimental

Foram testadas sete concentrações de NaCl: 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 e 1.8 g L^{-1} . Cada tratamento contou com três réplicas independentes, totalizando 21 unidades experimentais. A inoculação foi feita a partir de um mesmo lote celular, padronizado para densidade inicial de 3.000 células mL^{-1} , a fim de garantir comparabilidade entre os tratamentos. O experimento teve duração de 17 dias (imagem 1).

- Monitoramento do crescimento

O crescimento foi acompanhado a cada dois dias por meio de leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 680 nm (clorofila a) e 750 nm (densidade celular) e contagem celular em microscopia. Esses procedimentos possibilitaram o monitoramento não destrutivo das culturas e aumentou a precisão das estimativas de densidade.

- Estimativa da taxa intrínseca de crescimento

Foram feitas contagens de células por meio de microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer a cada dois dias. As amostras foram armazenadas em tubos Falcon de 10 mL contendo 4 mL de cultura; em seguida, 1 μL foi pipetado para a câmara de Neubauer para contagem celular. A taxa de crescimento (r) foi medida através da seguinte fórmula:

$$r = \ln(C_f/C_i)/t$$

Onde:

Cf = Concentração final

Ci = Concentração inicial

t = Tempo, em dias

- Análises estatísticas

Os dados de abundância e taxa de crescimento foram organizados em planilhas eletrônicas e expressos como média $\pm$ desvio-padrão. As diferenças entre tratamentos foram avaliadas por ANOVA unifatorial ($p < 0,05$), seguida do teste de Tukey (HSD), quando aplicável. Para verificar a interação entre salinidade e tempo, foi ajustado o modelo bifatorial. Todas as análises estatísticas e a elaboração dos gráficos foram realizadas no software Rstudio.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos neste experimento evidenciam de forma clara os efeitos da salinidade sobre o crescimento da microalga *Cryptomonas obovata*, tanto em termos de abundância celular (células/mL), quanto por meio de medidas indiretas de crescimento via absorbância nos comprimentos de onda de 680 nm e 750 nm.

No gráfico de interação entre salinidade e tempo no crescimento (células/mL) observa-se que os tratamentos com baixa salinidade (0, 0,3 e 0,6 g/L) apresentaram as maiores densidades celulares, atingindo valores próximos a 30000 células/mL no 17º dia de cultivo. Por outro lado, concentrações mais elevadas de salinidade (1,5 e 1,8 g/L) resultaram em densidades celulares bastante reduzidas, com valores próximos a zero. Esse padrão indica que a microalga possui tolerância limitada à salinidade, sendo capaz de crescer bem em condições de água doce e até 0,9 g/L, mas com forte inibição em condições mais a partir de 1,2g/L.

A trajetória de densidade celular se mantém nos resultados de absorbância em 680 (gráfico 2a) e 750 nm (gráfico 2b), que são indicadores indiretos de biomassa. Ambas as medidas mostraram crescimento mais acelerado nos tratamentos de 0 a 0,6 g/L, atingindo picos no intervalo entre o 12º e 17º dia. Nos tratamentos de 1,5 e 1,8 g/L, praticamente não houve aumento de absorbância ao longo do tempo, confirmando a inibição do crescimento celular. O fato de os comprimentos de onda diferentes apresentarem resultados semelhantes sugere que o efeito da salinidade sobre a biomassa foi consistente.

Por fim, a taxa de crescimento específico (r) calculada para cada tratamento reforça essa conclusão. Os valores médios de r foram mais altos nas salinidades de 0 a 0,9 g/L (variando de $\sim 0,4$ a 0,45), enquanto houve um declínio progressivo a partir de 1,2 g/L, chegando a valores próximos de 0,1 em 1,8 g/L. Esse padrão demonstra que a salinidade atua como fator limitante direto, reduzindo a eficiência do crescimento celular em concentrações mais elevadas (gráfico 3).

A análise estatística por ANOVA unifatorial confirmou o efeito significativo da salinidade sobre a taxa de crescimento ($F = 4,534$; $p < 0,001$). O teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou que os tratamentos entre 0 e 1,5 g/L não diferiram estatisticamente entre si (grupo “a”), enquanto

a concentração de 1,8 g/L formou um grupo distinto (grupo “b”), apresentando crescimento significativamente menor (gráfico 4).

Comparando com a literatura, resultados semelhantes já foram observados em outros estudos com microalgas. Segundo Silva et al. (2019), espécies de criptófitas apresentam sensibilidade à salinidade acima de 1,0 g/L, o que está de acordo com os dados aqui obtidos. Além disso, estudos com outras microalgas dulcícolas, como *Chlorella vulgaris*, também relatam queda acentuada do crescimento em condições salinas (Wang et al., 2020). Essa limitação fisiológica é relacionada ao aumento da pressão osmótica, que dificulta o balanço hídrico e iônico das células, afetando processos metabólicos essenciais como a fotossíntese.

Assim, nossos resultados reforçam que *Cryptomonas obovata* possui maior potencial de cultivo e sobrevivência em ambientes com concentração de NaCl abaixo de 1,5 g/L, e não tolera concentrações elevadas. Esse padrão é relevante não apenas do ponto de vista ecológico, mas também para aplicações em ecotoxicologia e cultivo experimental, pois estabelece limites para o uso da espécie em sistemas mais salinos. Porém, a capacidade de adaptação ou efeitos crônicos devido à exposição com maior tempo seria importante para melhorar nosso entendimento do nicho salino dessa espécie de microalga.

Conclusão

A sensibilidade evidencia que *Cryptomonas obovata* possui tolerância restrita à salinidade, o que a torna um organismo modelo promissor para estudos de estresse osmótico e um bioindicador eficiente da salinização em ambientes de água doce. Do ponto de vista ecológico, tais resultados sugerem que aumentos relativamente modestos na salinidade de reservatórios e açudes do semiárido podem comprometer a produtividade primária, afetando a disponibilidade de recursos para níveis tróficos superiores e a estabilidade das redes alimentares aquáticas.

Além disso, a metodologia empregada, integrando espectrofotometria e calibração por contagem direta, mostrou-se eficaz para estimar com precisão a dinâmica populacional e os limites fisiológicos da espécie, representando uma ferramenta útil em estudos de ecotoxicologia e limnologia aplicada. Conclui-se, portanto, que compreender os limites de tolerância de microalgas dulcícolas, como *Cryptomonas obovata*, é fundamental para antecipar os efeitos da salinização sobre ecossistemas aquáticos continentais, especialmente em regiões semiáridas, onde esse processo tende a se intensificar com as mudanças climáticas e pressões antrópicas.

Como próximos passos, recomenda-se aprofundar a investigação dos mecanismos fisiológicos envolvidos, testar se *Cryptomonas obovata* consegue se ajustar a incrementos graduais e comparar a tolerância de diferentes tipos de sais. Essas abordagens permitirão estabelecer limiares críticos para a gestão de reservatórios do semiárido frente ao avanço da salinização.

Referências

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. *Cryptomonas obovata* Skuja. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=155332

BEATTY, S. J.; MORGAN, D. L.; RASHNAVADI, M.; LYMBERY, A. J. Salinity tolerances of endemic freshwater fishes of south-western Australia: implications for conservation in a biodiversity hotspot. *Marine and Freshwater Research*, v. 62, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1071/MF10100>

CANEDO-ARGÜELLES, M. et al. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environmental Pollution*, v. 173, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.011>

DOMINGOS, I. E. R. Efeito da salinidade no biovolume, crescimento e morfologia de cianobactérias formadoras de florações. 2021. 43 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

GIBBS, S. P. Nuclear envelope–chloroplast relationships in algae. *Journal of Cell Biology*, v. 14, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.14.3.433>

LEWITUS, A. et al. Estuários da costa atlântica sul da América do Norte: suas assinaturas geográficas. *Estuaries*, v. 23, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2307/1353027>

PAPASTERGIADOU, E. et al. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. *Hydrobiologia*, v. 750, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2169-x>

PAULSEN, B. S. Structure of extracellular polysaccharides produced by a soil *Cryptomonas* sp. (Cryptophyceae). *Journal of Phycology*, v. 28, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00061.x>

SARMA, S. S. S.; NANDINI, S.; MORALES-VENTURA, J.; DELGADO-MARTÍNEZ, I.; GONZÁLEZ-VALVERDE, L. Effects of NaCl salinity on the population dynamics of rotifers and cladocerans from freshwater habitats. *Aquatic Ecology*, v. 40, p. 349–360, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10452-006-9039-1>

HUSZAR, V. L. M. Biodiversity of phytoplankton in Brazil. In: VAL, A. L.; BICUDO, C. E. M. (orgs.). *Biodiversidade do Brasil: conhecimento, conservação e uso*. Manaus: INPA, 2011.

KRENAK, A. *Ideias para adiar o fim do mundo*. São Paulo: Companhia das Letras, 2019.

TUNDISI, J. G. Limnologia no Brasil: passado, presente e futuro. *Oecologia Australis*, v. 12, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1202.01>

FREIRE, R. H. F. et al. Salinização de ecossistemas aquáticos do semiárido brasileiro. *Limnetica*, v. 39, n. 1, p. 107–121, 2020. DOI: <https://doi.org/10.23818/limn.39.08>

CUNILLERA-MONTCUSÍ, D. et al. Freshwater salinisation: a research agenda for a saltier world. *Limnetica*, v. 39, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.23818/limn.39.02>

CAÑEDO-ARGÜELLES, M. et al. A review of recent advances and future challenges in freshwater salinization. *Limnetica*, v. 39, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.23818/limn.39.02>

Anexos

Imagem 1

Gráfico 1

Gráfico 2a

Gráfico 2b

Gráfico 3

Gráfico 4

CÓDIGO: SB0570

AUTOR: VINICIUS EDUARDO DA SILVA

COAUTOR: EVELLYN JHADY NEGRIS DE CARVALHO

COAUTOR: RYAN CARLOS DE QUEIROZ AQUINO

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Utilização de algoritmos de Inteligência Artificial para a determinação da sobrevida e do gerenciamento do tratamento de Câncer Cervical de pacientes da LIGA Contra o Câncer em Natal-RN

Resumo

O estudo propôs a criação de modelos de Machine Learning para prever o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma cervical atendidas na LIGA Contra o Câncer (Natal-RN). Foram analisados 691 casos, registrados entre 2003 e 2023, considerando informações sociodemográficas, clínicas, laboratoriais e moleculares. Dois modelos foram criados: o Modelo 1, com os classificadores Random Forest (RF), SVM, KNN e Regressão Logística (RL), e o Modelo 2, com RF, Gradient Boosting (GB), KNN e RL, este último aprimorado pela exclusão de variáveis pouco relevantes e pela otimização de hiperparâmetros por Grid Search. A análise contou com validação cruzada (k-folds=10), estratégia One-vs-One e balanceamento de classes por SMOTE. O Modelo 1 apresentou acurácia média de 90,72% (DP = 5,71%), enquanto o Modelo 2 alcançou 93,23% (DP = 1,98%), mostrando resultados mais consistentes e estáveis. As matrizes de confusão revelaram baixo índice de erros, com maior precisão entre “vivos sem recidiva” e “vivos com recidiva”. A substituição do SVM pelo GB se mostrou mais eficiente para lidar com dados não lineares. Esse estudo evidencia o potencial da inteligência artificial como ferramenta de apoio à tomada de decisão precoce e personalizada no manejo de pacientes com câncer cervical.

Palavras-chave: Câncer Cervical.Machine Learning.Prognóstico.Inteligência Artificial.

TITLE: Use of Artificial Intelligence algorithms for determining survival and managing cervical cancer treatment in patients at Liga Contra o Câncer in Natal, RN

Abstract

The study proposed the development of Machine Learning models to predict the prognosis of patients with cervical adenocarcinoma treated at LIGA Against Cancer (Natal-RN). A total of 691 cases recorded between 2003 and 2023 were analyzed, considering sociodemographic, clinical, laboratory, and molecular information. Two models were created: Model 1, with the classifiers Random Forest (RF), SVM, KNN, and Logistic Regression (LR), and Model 2, with RF, Gradient Boosting (GB), KNN, and LR, the latter improved by excluding less relevant variables and optimizing hyperparameters through Grid Search. The analysis included cross-validation (k-folds = 10), a One-vs-One strategy, and class balancing with

SMOTE. Model 1 achieved an average accuracy of 90.72% (SD = 5.71%), while Model 2 reached 93.23% (SD = 1.98%), showing more consistent and stable results. The confusion matrices revealed a low error rate, with higher precision between “alive without recurrence” and “alive with recurrence.” The replacement of SVM with GB proved more effective in handling non-linear data. This study highlights the potential of artificial intelligence as a tool to support early and personalized decision-making in the management of patients with cervical cancer.

Keywords: Cervical Cancer. Machine Learning. Prognosis. Artificial Intelligence

Introdução

O câncer cervical (CC) ainda é uma das neoplasias mais agressivas em mulheres no Brasil, sendo a terceira mais incidente quando se exclui o câncer de pele não melanoma na população feminina[1]. Projeções do INCA (Instituto Nacional de Câncer) estipulam aproximadamente 17 mil novos casos por ano para o triênio 2023-2025[2]. A análise da sobrevida destes pacientes é essencial para o planejamento e avaliação da conduta terapêutica a ser seguida pelos serviços de saúde. Além disso, a identificação e validação de fatores prognósticos são importantes para definição do protocolo de tratamento a ser seguido [3], uma vez que eles orientam a tomada de decisão terapêutica e a alocação de recursos, desde que as metodologias apresentem boa discriminação, sob risco de decisões clínicas enviesadas [4].

Durante as últimas décadas, estudos epidemiológicos têm utilizado modelos estatísticos, geralmente baseados em preditores pré-estabelecidos para o prognóstico de sobrevida em pacientes com câncer cervical [5]. Estas técnicas apresentam limitações principalmente relacionadas à adaptação de modelos, mudanças no perfil fisiológico populacional, tanto associado a fatores de risco, como em alterações no estilo de vida, além de potencial redução na precisão analítica ao longo do tempo[6]. Os modelos estatísticos mais comuns utilizados se apropriam de métodos lineares e partem de descrições explícitas das relações entre os dados e aplicações reais[7].

Atualmente, a inteligência artificial (IA) vem sendo cada vez mais empregada no auxílio ao diagnóstico de diversas doenças e na avaliação da sobrevivência [8,9]. A técnica de Machine Learning (ML), aplicação baseada em dados de inteligência artificial, na qual é possível treinar sistemas que aprendem e aprimoram automaticamente sem programação explícita a partir de comandos prévios[9], tem sido utilizada na busca por uma avaliação que exige menos recursos humanos, possivelmente mais precisa e perene. O emprego de sistemas com IA favorece a sua aplicação em mais diversos contextos por serem rápidos e adaptáveis a novas realidades e a sua utilização já tem sido testada em estudos oncológicos[10].

Na última década, dados de registro de câncer, como o US Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), têm sido cada vez mais usados para prever mortalidade ou sobrevivência nos EUA usando inteligência artificial [9,11]. Como os modelos que utilizam aprendizagem automática não fornecem estrutura e parâmetros de forma explícita e com possibilidade de interpretação facilitada, faz-se necessário investigar a sua utilização de

forma interpretável e integralizada a clínica, além de sua precisão com dados clínicos reais de pacientes oncológicos [12,13].

De acordo com as diretrizes da National Comprehensive Cancer Network (NCCN), o tratamento primário do câncer cervical em estágio inicial é a cirurgia[14]. No entanto, as diretrizes atuais não distinguem diferentes estratégias para carcinoma de células escamosas (CEC) e adenocarcinoma (AC), os quais possuem características moleculares e fenotípicas distintas, necessitando de protocolos diferenciados e específicos[15].

Diante disso, o presente estudo tem por objetivo a construção de modelos experimentais baseados em Machine Learning para a predição do prognóstico clínico de pacientes do sexo feminino com adenocarcinoma cervical.

Metodologia

População do estudo

Foram incluídas no estudo pacientes do sexo feminino atendidas entre 2003 e 2023, residentes no estado do Rio Grande do Norte, totalizando 691 casos com diagnóstico de adenocarcinoma cervical. Os dados foram extraídos do Setor epidemiológico da LIGA Norte Rio Grandense Contra o Câncer.

Seleção de variáveis

2.1 Dados sociodemográficos

Considerou-se relevante informações acerca da profissão, raça/etnia, idade em anos completos na data do diagnóstico e a escolaridade classificada em níveis formais de ensino das pacientes. As variáveis foram selecionadas por sua relevância na caracterização da população estudada e importância como determinantes sociais de saúde.

2.2 Histórico clínico e dados antropométricos

Incluiu-se como histórico de comorbidades para diabetes mellitus, hipertensão arterial e cardiopatias. Além disso, também registrou-se hábitos de vida de tabagismo e etilismo, outros cânceres prévios, história gineco-obstétrica das pacientes e IMC (Índice de Massa Corporal). Justifica-se a seleção dessas variáveis por sua relevância clínica, uma vez que comorbidades e hábitos de vida podem influenciar a resposta ao tratamento oncológico, o risco de complicações e o prognóstico, enquanto fatores gineco-obstétricos têm implicações na história natural do câncer de colo uterino [16,17].

2.3 Exames laboratoriais

Foram analisados os resultados laboratoriais obtidos no momento do diagnóstico oncológico, antes do início de qualquer tratamento. Para esse critério, foi incluída a concentração de

hemoglobina, a contagem total de leucócitos e a contagem de plaquetas. Essas variáveis foram selecionadas devido à sua relevância prognóstica previamente descrita na literatura, estando associadas ao estado clínico geral da paciente e à resposta imunológica [18].

2.4 Tratamento oncológico e sobrevida

Foram coletadas informações sobre o tipo de tratamento realizado, incluindo cirurgia, braquiterapia, radioterapia e quimioterapia. Para cada modalidade, foram registradas a quantidade de sessões, detalhes técnicos como o tipo de cirurgia, dose e classe de quimioterápico. Ademais, também foram avaliados a sobrevida global e sobrevida livre de recorrência. Os indicadores mencionados são amplamente utilizados em oncologia por refletirem a efetividade terapêutica e controle da doença ao longo do tempo [19,20].

2.5 Dados moleculares

Para a seleção de dados moleculares realizou-se um estudo da expressão proteica de imunomarcadores por imunohistoquímica. Incluiu-se marcadores de imunossupressão (PD-L1, CD25, CD204, CD163, FOXP3 e IL-10), de angiogênese (VEGF1 e MIF), de invasão e metástase (Vimentina, SNAIL, E-caderina e MMP9), de proliferação celular (Ki-67 e STAT3), de sobrevivência (BCL2) e inflamação (IL-17 e NF- κ B). A escolha desses biomarcadores fundamentou-se em evidências do seus papéis na modulação do microambiente tumoral, no potencial metastático, na resistência terapêutica e no prognóstico de pacientes com câncer cervical [21].

Construção dos modelos computacionais

O desenvolvimento dos modelos foi realizado em parceria com o Instituto Mauá de Tecnologia (São Paulo, Brasil), responsável pela criação da metodologia computacional dos algoritmos. Com o objetivo de testar diferentes abordagens, foram implementadas duas arquiteturas com funcionalidades distintas, denominadas Modelo 1 e Modelo 2.

Ambas as versões foram construídas em linguagem Python, utilizando as bibliotecas Pandas, Matplotlib, Scikit-learn, Scipy, Numpy, Joblib e Time. A escolha dessas ferramentas se justificou pela necessidade de manipulação do conjunto de dados, aplicação de estratégias de validação cruzada, uso de métodos lineares de regressão logística, tarefas de classificação e avaliação de problemas multiclasse.

O Modelo 1 foi desenvolvido sob os classificadores Random Forest (RF), Support Vector Machine (SVM), K-Nearest Neighbors (KNN) e Regressão Logística (RL). O Modelo 2 manteve os mesmos classificadores, exceto pelo SVM, que foi substituído pelo Gradient Boosting (GB) por se adequar melhor à característica de linearidade dos dados.

Além disso, no Modelo 2 adotou-se o Grid Search para otimização individual de cada classificador, ajustando seus hiperparâmetros com base nas configurações que determinam seu funcionamento. Assim, foram identificadas as especificações ideais para RF, GB, KNN e RL, obtendo o melhor desempenho individual de cada um.

Treinamento dos modelos e estratégias de análise

O treinamento da IA foi realizado com o conjunto de 80% dos dados e a validação com o conjunto de testes dos restantes 20% para garantir a capacidade de generalização do modelo. Mediante a robustez do grupo de dados, fez-se necessário a realização da estratégia de K-folds, baseada na validação cruzada em 10 etapas, no qual é realizada uma triagem comparativa do melhor classificador para cada análise.

A estratégia de avaliação One vs One (OvO) foi realizada para impedir um viés de seleção do algoritmo, tornando-o tendencioso. Essa estratégia confronta cada classificador um a um, na busca da melhor combinação.

Como o conjunto de dados estava desbalanceado, empregou-se o recurso Smote, permitindo nivelar parâmetros com dados minoritários, sem alterar a sua distribuição, com a adoção de variáveis dummy para os dados categóricos, atribuindo valores binários (0 e 1) a categorias classificatórias.

Análise estatística e validação dos modelos

O desempenho dos algoritmos foi avaliado por validação cruzada, obtendo-se a matriz de confusão do conjunto de testes, para verificar o desempenho dos modelos em cada classe de predição, retornando variáveis como vivo com recidiva, vivo sem recidiva, óbito com recidiva e óbito sem recidiva. Para cada classificador, obteve-se a média da acurácia e o desvio padrão, ambos expressos em porcentagem. As curvas ROC foram construídas para os treinamento e teste, utilizando a métrica AUC para avaliar os modelos. Todas as análises foram executadas no Google Colab usando Python.

Resultados e Discussões

O primeiro sistema preditivo (Modelo 1), estruturado com os classificadores SVM, KNN, RF e RL sob a abordagem One vs One (OVO), apresentou desempenho médio de acurácia de 90,72%, com desvio padrão médio de 5,71%. A matriz de confusão obtida nos testes (Figura 2) evidencia a capacidade do algoritmo de distinguir corretamente cada uma das quatro classes prognósticas do estudo, a exemplo da classe 1 (vivos sem recidiva), que teve 367 acertos e apenas 2 erros de classificação, estes direcionados para a classe 2 (vivos com recidiva). Na classe 3 (óbitos com recidiva), o acerto foi absoluto: 45 casos corretamente classificados. Já a classe 4 (óbitos sem recidiva) obteve 147 acertos e apenas um equívoco.

O Modelo 2, teve ainda a exclusão de 19 variáveis e passou por otimização de hiperparâmetros, alcançando 93,23% de acurácia média, com desvio padrão médio de apenas 1,98%. A matriz de confusão correspondente (Figura 3) demonstra predominância de acertos na diagonal principal, e o menor desvio padrão reforça a maior estabilidade e consistência dos resultados.

O objetivo central foi desenvolver dois modelos de Machine Learning capazes de estimar o prognóstico de pacientes com câncer cervical. Os números obtidos mostram que as estratégias adotadas, desde o pré-processamento até a escolha dos classificadores, foram

determinantes para o bom desempenho. A etapa de limpeza de dados antes dos testes foi crucial, evitando ruídos e inconsistências que poderiam comprometer o aprendizado. Outro ponto essencial foi o uso da técnica de Smote, que corrigiu o desequilíbrio inicial entre as classes já que a categoria “vivo sem recidiva” representava cerca de metade da amostra, evitando que o modelo se tornasse enviesado e compromettesse a precisão geral.

A aplicação de validação cruzada associada à abordagem OvO também foi decisiva para a confiabilidade dos resultados. Com a divisão de 80% dos dados para treino e 20% para teste, de forma aleatorizada, reduziu-se a influência de padrões artificiais e garantiu maior generalização. O método OvO, por sua vez, distribuiu a decisão final por meio de um sistema de votação entre diferentes classificadores, reduzindo fragilidades individuais e fortalecendo o desempenho coletivo.

A comparação entre os dois modelos evidencia clara vantagem do segundo: além de apresentar acurácia mais elevada, sua menor variabilidade indica previsões mais consistentes. Essa evolução está diretamente relacionada à redução de variáveis pouco relevantes, à substituição do SVM pelo GB, já que este é mais adequado para lidar com dados de natureza não linear (como já constatado em estudo de aplicação de ferramentas de ML para classificação de nódulos pulmonares)[22], e também à aplicação do Grid Search para ajuste fino dos hiperparâmetros. O SVM, por tratar-se de um classificador linear, encontra limitações diante de interações complexas e múltiplas exceções presentes em dados médicos, cenário no qual o GB se mostrou mais eficiente.

Apesar de ambos os modelos apresentarem poucos erros, as confusões mais recorrentes ocorreram entre “vivos sem recidiva” e “vivos com recidiva”, possivelmente devido a semelhanças clínicas e demográficas entre essas categorias. Um detalhe importante é que a primeira matriz inclui dados de treino e teste, o que pode suavizar visualmente as falhas, enquanto a segunda reflete apenas dados de treino, oferecendo uma visão mais fiel do desempenho.

Comparado à literatura, os resultados se mostram consistentes. Estudos recentes também enfatizam a importância da validação cruzada em bases reduzidas e do tratamento rigoroso dos dados, práticas estas, integralmente aplicadas neste estudo[23,24]. Além disso, a presença de RF, GB e RL entre os classificadores confirma alinhamento com abordagens consolidadas na área, inclusive para outros tipos de cânceres[25-27]. A substituição do SVM pelo GB, respaldada pelo desempenho observado, mostrou-se uma decisão metodológica eficiente e aplicável.

Ainda existe um amplo espectro para avanços das técnicas de IA e ML no contexto clínico. Um desafio relevante para estudos futuros consiste no desenvolvimento de modelos capazes de manter elevado desempenho preditivo mesmo quando disponíveis conjuntos de dados reduzidos[28], aspecto de grande importância para suportar decisões clínicas em estágios iniciais do tratamento e ainda mais próximos da realidade na prática médica e oncológica[29].

Ademais, outro ponto a ser destacado para investigações subsequentes é a ampliação do escopo de aplicação dos algoritmos, explorando seu potencial não apenas para prognóstico, mas também para o suporte à medicina personalizada, com definição de estratégias terapêuticas individualizadas.

Conclusão

O presente estudo demonstrou a viabilidade do desenvolvimento de um modelo de Machine Learning capaz de estimar, com elevada precisão, o prognóstico de pacientes com câncer cervical. O modelo obtido apresentou robustez, alta capacidade de generalização e acurácia, superando inclusive alguns resultados reportados na literatura. Este desempenho foi alcançado por meio de uma metodologia prática e funcional que contemplou etapas de filtragem e preparação sistemática dos dados, seleção criteriosa de classificadores e aplicação de técnicas adequadas de validação e otimização.

Dessa forma, o estudo evidencia a relevância científica e clínica da proposta, apresentando resultados iniciais que incentivam a continuidade das pesquisas e a incorporação de soluções de inteligência artificial na abordagem de doenças como o câncer cervical. A aplicação dessas ferramentas tem o potencial de aprimorar a precisão diagnóstica, otimizar o direcionamento terapêutico e, em última análise, contribuir para a melhoria dos indicadores de saúde pública no Brasil e no mundo.

Referências

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Incidência. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 26 set. 2022. Atualizado em: 28 nov. 2023. Acesso em: 18 jan. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-do-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia>.
2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160 p. Acesso em: 6 ago. 2025. Disponível em <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>.
3. QUINTANA, J. M. et al. Patient-reported outcomes as independent prognostic factors for survival in oncology: systematic review and meta-analysis. *Value in Health*, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 250–267, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jval.2020.10.009>. Acesso em: 21 jul. 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33518032/>.
4. VAN CALSTER, B. et al. Calibration: the Achilles heel of predictive analytics. *BMC Medicine*, [S. l.], v. 17, art. 230, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1466-7>. Acesso em: 6 ago. 2025. Disponível em: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1466-7>.
5. YANG, M. et al. Prediction models for prognosis of cervical cancer: systematic review and critical appraisal. *Frontiers in Public Health*, [S. l.], v. 9, p. 654454, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.654454>. Acesso em: 21 jul. 2025.

Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2021.654454/full>.

6. FLEMING, T. R.; RUSSELL, L. J.; ROBERTS, C. Survival analysis in clinical trials: fundamentals and statistical methods. *Contemporary Clinical Trials*, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 170–177, fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cct.2013.11.008>. Acesso em: 21 jul. 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4348437/>.
7. ZHANG, Y.; LIU, Z.; WANG, S. Development and validation of a deep learning survival model for cervical adenocarcinoma patients. *BMC Bioinformatics*, [S. l.], v. 24, n. 146, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05239-7>. Acesso em: 21 jul. 2025. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-023-05239-7>.
8. UDDIN, S. et al. Comparing different supervised machine learning algorithms for disease prediction. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, [S. l.], v. 19, p. 1–16, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12911-019-1004-8>.
9. BATTINENI, G. et al. Applications of machine learning predictive models in the chronic disease diagnosis. *Journal of Personalized Medicine*, [S. l.], v. 10, p. 21, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm10010021>.
10. LEE, C. et al. Application of a novel machine learning framework for predicting non-metastatic prostate cancer-specific mortality in men using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database. *The Lancet Digital Health*, [S. l.], v. 3, p. e158–e165, 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(20\)30297-0](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(20)30297-0).
11. HUANG, S. et al. Artificial intelligence in cancer diagnosis and prognosis: opportunities and challenges. *Cancer Letters*, [S. l.], v. 471, p. 61–71, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.007>.
12. JIANG, J. et al. Predictive model for the 5-year survival status of osteosarcoma patients based on the SEER database and XGBoost algorithm. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 11, p. 5542, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84740-y>.
13. PRELAJ, A. et al. Real-world data to build explainable trustworthy artificial intelligence models for prediction of immunotherapy efficacy in NSCLC patients. *Frontiers in Oncology*, [S. l.], v. 12, p. 1078822, 23 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1078822>.
14. DAI, L. et al. Using machine learning for predicting cancer-specific mortality in bladder cancer patients undergoing radical cystectomy: a SEER-based study. *BMC Cancer*, [S. l.], v. 25, art. 523, 21 mar. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-025-13942-2>.
15. CAMPOS-PARRA, A. D. et al. Molecular differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cervical cancer subtypes: potential prognostic biomarkers. *Current Oncology*, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 4689–4702, 19 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/currncol29070372>.

16. SHEN, Tiantian et al. Hypertension and hyperglycaemia are positively correlated with local invasion of early cervical cancer. *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne), [S. l.], v. 14, art. 1280060, 12 dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1280060>.
17. MAYADEV, Jyoti et al. Alcohol Abuse Decreases Pelvic Control and Survival in Cervical Cancer: An Opportunity of Lifestyle Intervention for Outcome Improvement. *American Journal of Clinical Oncology*, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 451-457, out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000187>.
18. KOULIS, Theodora A. et al. Anemia, leukocytosis and thrombocytosis as prognostic factors in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy: a retrospective cohort study. *Clinical and Translational Radiation Oncology*, [S. l.], v. 4, p. 51-56, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2017.05.001>.
19. LENGLINE, Etienne et al. Composite event-free-survival as an endpoint in oncology drug evaluation: review and guidance perspectives from the Haute Autorité de Santé (HAS). *European Journal of Cancer*, [S. l.], v. 204, art. 114047, abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2024.114047>.
20. YANG, Xi et al. The value of progression-free survival at three years as an endpoint in locally advanced cervical cancer clinical trials. *Journal of Clinical Oncology*, [S. l.], v. 41, n. 16 Suppl., art. 5534, 2023. DOI: https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.5534.
21. LIRA, George et al. High M2-TAM infiltration and STAT3/NF- κ B signaling pathway as a predictive factor for tumor progression and death in cervical cancer. *Cancers*, [S. l.], v. 16, n. 14, art. 2496, 11 jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers16142496>.
22. LIU, C.; WU, J.; ZHAO, S. Comparative performance of XGBoost and support vector machine for pulmonary nodule classification with Bayesian optimization. *Processes*, [S. l.], v. 11, n. 3, art. 734, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr11030734>.
23. AHMED, K. A. et al. Advancing breast cancer prediction: comparative analysis of ML models and deep learning-based multi-model ensembles on original and synthetic datasets. *PLoS One*, [S. l.], v. 20, n. 6, art. e0326221, 18 jun. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0326221>.
24. CHANG, Chin-Chuan et al. Iterated cross validation method for prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma for small size dataset. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 13, art. 1438, 25 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28394-6>.
25. WANG, H.-N.; AN, J.-H.; WANG, F.-Q.; HU, W.-Q.; ZONG, L. Predicting gastric cancer survival using machine learning: a systematic review. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, [S. l.], v. 17, n. 5, art. 103804, 15 mai. 2025. DOI: <https://doi.org/10.4251/wjgo.v17.i5.103804>.
26. SONG, Xuchun et al. Prognostic prediction of breast cancer patients using machine learning models: a retrospective analysis. *Gland Surgery*, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1575-1587, 30 set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.21037/gs-24-106>.

27. GOTE, Pradnyawant et al. Integrating machine learning algorithms: a hybrid model for lung cancer outcome improvement. *Applied Sciences*, [S. l.], v. 15, n. 9, art. 4637, 22 abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/app15094637>.
28. RILEY, R. D. et al. Importance of sample size on the quality and utility of AI-based prediction models for healthcare. *The Lancet Digital Health*, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 100857, jun. 2025. DOI: 10.1016/j.landig.2025.01.013
29. SANTOS, C. S.; AMORIM-LOPES, M. Externally validated and clinically useful machine learning algorithms to support patient-related decision-making in oncology: a scoping review. *BMC Medical Research Methodology*, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 45, 21 fev. 2025. DOI: 10.1186/s12874-025-02463-y.

Anexos

Figura 1. Fluxograma representando o delineamento do estudo e o processo analítico dos modelos prognósticos desenvolvidos.

Figura 2. Matriz de confusão do Modelo 1. A matriz apresenta o desempenho do classificador na previsão das quatro classes prognósticas: Classe 1 (vivos sem recidiva); Classe 2 (vivos com recidiva); Classe 3 (óbitos com recidiva); Classe 4 (óbitos sem reci

Figura 3. Matriz de confusão do Modelo 2. A matriz apresenta o desempenho do classificador na previsão das quatro classes, comparando os rótulos previstos (Predicted label) com os rótulos reais (True label). Os valores na diagonal principal indicam o núme

Figura 4. Curvas ROC médias para cada classe (estratégia One-vs-Rest) do modelo 2. O gráfico apresenta as curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para as quatro classes prognósticas: Classe 1 - vivos sem recidiva (AUC = 0,98); Classe 2 – vivos com

CÓDIGO: SB0573

AUTOR: ALDIELYSON JORGE CAVALCANTE DE BRITO

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Avaliação da Qualidade do Sono na Resposta ao Tratamento com
Cetamina em Pacientes com Depressão Resistente

Resumo

A depressão é uma doença vista como o mal do século XXI, sendo assim uma das doenças mais frequentes. Nesse sentido, este projeto teve como objetivo avaliar a qualidade de sono na resposta ao tratamento com a cetamina em pacientes com depressão resistente. O estudo contou com 23 participantes de ambos os sexos e com idade mínima de 18 anos. Esse estudo avaliou os efeitos de oito sessões de escetamina subcutânea (SC) com auxílio da psicoterapia assistida (PAC) na qualidade do sono de pacientes com DRT, por meio da versão brasileira do Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-Br). Os resultados mostraram que houve uma melhora geral na qualidade de sono dos pacientes, corroborando com as evidências de eficácia da escetamina sc para tratamento da DRT, sendo a qualidade do sono um importante alvo terapêutico.

Palavras-chave: Depressão resistente ao tratamento. Cetamina. Subcutânea. Sono.

TITLE: Assessment of Sleep Quality in Response to Ketamine Treatment in Patients
with Resistant Depression

Abstract

Depression is considered the disease of the 21st century, making it one of the most common. Therefore, this project aimed to evaluate sleep quality in response to ketamine treatment in patients with resistant depression. The study included 23 participants of both sexes, all aged 18 or older. This study evaluated the effects of eight sessions of subcutaneous (SC) esketamine with the aid of psychotherapy-assisted therapy (PAC) on the sleep quality of patients with TRD, using the Brazilian version of the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-Br). The results showed an overall improvement in the patients' sleep quality, corroborating the evidence for the efficacy of SC esketamine for the treatment of TRD, with sleep quality being an important therapeutic target.

Keywords: Treatment-resistant depression. Ketamine. Subcutaneous. Sleep.

Introdução

A depressão maior é um dos transtornos mentais mais prevalentes globalmente, sendo um dos maiores contribuintes para a incapacidade mundial, superando até mesmo doenças cardiovasculares e câncer em termos de carga de incapacidade (Organização Mundial da Saúde, 2017). No Brasil, o transtorno depressivo maior afeta aproximadamente 5,8% da população (Organização Mundial da Saúde, 2017). Alterações no sono são frequentemente relatadas por pacientes com depressão, e o DSM-5 destaca esses distúrbios como um sintoma central do transtorno depressivo. A insônia, caracterizada pela dificuldade em iniciar ou manter o sono, é comum nesses pacientes (Kaplan, 2016). A privação de sono afeta significativamente a qualidade de vida, humor, estresse e ansiedade (Breslau et al., 1996). Queixas sobre sono não reparador e aumento da sonolência contribuem para episódios depressivos devido à suscetibilidade biológica (Chellappa & Araújo, 2007). O sono é essencial para a restauração da energia e para a manutenção da qualidade de vida, sendo que distúrbios no sono podem causar prejuízos em curto e longo prazo (Neves, 2013).

O ciclo circadiano, que regula o sono e a vigília, é crucial para a homeostase corporal, e sua alteração pode afetar a produção de hormônios como cortisol e melatonina (Santiago et al., 2020; Weinberg et al., 1979). A depressão resistente ao tratamento (DRT) apresenta desafios significativos, incluindo sintomas persistentes de humor depressivo e distúrbios do sono. Cerca de 30% dos pacientes com depressão não respondem aos antidepressivos tradicionais (Corrigger & Pickering, 2019). A DRT é definida como uma depressão grave que não responde a pelo menos dois tratamentos adequados (Franco et al., 2020). Estudos recentes têm destacado a cetamina como uma intervenção alternativa eficaz para DRT, devido ao seu rápido efeito antidepressivo (Franco et al., 2020).

No que diz respeito ao efeito da cetamina sobre o sono, este tem sido apontado como um dos possíveis fatores associados à rápida ação antidepressiva da substância (Duncan et al., 2017). Há evidências de que a cetamina gera um aumento na amplitude da atividade de ondas lentas (SWA) durante o sono NREM (Duncan & Zarate, 2013), bem como um aumento nos níveis de BDNF (Wang et al. 2021, Woelfer et al., 2019). Esses indicadores biológicos relacionam a cetamina a um melhor processo de plasticidade cerebral, que é comprometido na depressão.

No entanto, poucos estudos com cetamina têm utilizado uma escala própria para a análise do sono, como a Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), o que aponta para uma limitação na avaliação dessa variável. O único trabalho em que houve a utilização da PSQI foi um estudo de caso (Kwaśny et al., 2023). A falta da aplicação de um instrumento próprio para avaliar a qualidade do sono também foi relatada por Wang et al. (2021) como uma limitação de seu estudo, apesar dos resultados que indicaram melhora no sono dos pacientes após cada infusão de cetamina por meio da análise dos itens 4, 5 e 6 da Escala de Depressão de Hamilton (HAMD-17 SDF).

Sendo assim, o objetivo primário deste estudo foi avaliar a resposta da qualidade do sono, mensurada pela versão brasileira do Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-Br), em pacientes submetidos a um protocolo de oito sessões de cetamina na forma de escetamina com auxílio da psicoterapia assistida (PAC). A rota de administração utilizada no protocolo é a subcutânea (SC), ainda pouco estudada, com o potencial de se tornar uma alternativa de melhor custo-benefício, por ser mais barata do que a intranasal e menos invasiva do que a intravenosa (IV), sem comprometer a eficácia (Cavenaghi et al., 2021).

Metodologia

Desenho Experimental

Este estudo faz parte de um ensaio clínico aberto realizado no Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal, Brasil), que visa avaliar os efeitos do uso de escetamina subcutânea sobre o sono de pacientes com depressão resistente ao tratamento. Após a seleção dos participantes, os indivíduos foram submetidos a 8 sessões de escetamina subcutânea e acompanhados para obtenção de dados referentes à qualidade do sono e a sintomas depressivos.

Participantes

Foram recrutados 82 pacientes, dos quais 23 foram incluídos neste estudo. A triagem dos pacientes consistiu numa avaliação clínica conduzida por um psiquiatra treinado, a qual incluía a aplicação da Entrevista Clínica Estruturada para os Transtornos do DSM-5 (SCID-5).

A DRT foi definida como o uso de pelo menos dois antidepressivos diferentes em dose e duração adequadas (Caldirolì et al., 2021). O episódio depressivo atual elegível para a inclusão no estudo foi de grau moderado à severo, conforme a Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS ≥ 25).

Critérios de Inclusão:

- Os critérios de inclusão foram: idades entre 18 e 60 anos e diagnóstico de Depressão Resistente ao Tratamento (DRT) com episódio depressivo atual.

Critérios de Exclusão:

- Os critérios de exclusão foram definidos como: tratamento prévio com cetamina e condições físicas e mentais que pudessem comprometer a segurança do uso de cetamina, tais quais: falha cardíaca congestiva, hipertensão não controlada ou qualquer outra evidência de comprometimento cardíaco, doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC), obesidade severa, aumento da pressão intracranial ou cerebrospinal, gravidez, hipertireoidismo, resposta adversa prévia à cetamina, sintomas psicóticos, transtorno de esquizofrenia, transtorno esquizoafetivo, sintomas prodrômicos da esquizofrenia e transtorno bipolar.

Pacientes não elegíveis ou que decidam não participar retornaram ao tratamento padrão.

Sessão Experimental

As sessões de cetamina ocorreram na sala de infusão da Neuroimagem do HUOL, equipada com uma maca, duas poltronas, material de suporte do tratamento, fone de ouvido e um computador. No dia da sessão, o paciente chegou ao serviço em jejum de sólidos por 4 horas e líquidos por 2 horas. Ao chegar, o paciente foi recebido por um membro da equipe de pesquisa, que explicou os procedimentos detalhadamente.

Após cada sessão, de aproximadamente 2 horas, os participantes foram avaliados clinicamente e liberados na presença de um acompanhante.

Desfechos

A medida de desfecho primário foi a mudança na qualidade de sono, avaliada pela PSQI, comparando a pontuação basal com as pontuações da primeira, quarta e oitava sessões, bem como os quatro momentos de avaliação pós-tratamento. As demais escalas foram aplicadas para posterior utilização em outros estudos.

Cetamina

A cetamina foi administrada na forma de Dextrocetamina, com dose inicial recomendada de 0,5 mg/kg. Caso não houvesse resposta adequada, a dose foi aumentada para 0,75 mg/kg na segunda infusão e para 1 mg/kg nas subsequentes. A dose mais baixa que resulta em resposta foi mantida ao longo do tratamento.

Psicoterapia Assistida com Cetamina (PAC)

O programa de PAC consiste em três etapas: Preparação, Experiência e Integração.

1. Preparação: Treinamento preparatório para a experiência com cetamina, incluindo psicoeducação sobre os efeitos da substância, técnicas de respiração, regulação emocional, postura e construção de vínculo terapêutico. Esta fase teve duração aproximada de 2 horas.

2. Experiência: Durante a aplicação da cetamina, o participante foi monitorado por um psicólogo treinado para manejar efeitos físicos e dissociativos. O psicólogo auxiliou na verbalização das experiências vivenciadas e garantiu a segurança do paciente.

3. Integração: Ocorreu no dia seguinte à aplicação da cetamina, presencial ou à distância. O objetivo foi abordar a experiência de forma não diretiva, ajudando o participante a compartilhar percepções e manejar dificuldades, compreendendo e ressignificando suas experiências e emoções.

Análise Estatística

Para as análises estatísticas foram incluídos todos os pacientes que completaram as oito sessões de dosagem (23 indivíduos). Após verificação da normalidade dos dados, foi utilizado o teste ANOVA de uma via para medidas repetidas para analisar mudanças na pontuação global da PSQI-Br, com sessão (1ª, 4ª e 8ª) como fator entre sujeitos. Em todas as análises de variância, a prática de exercício físico regular e psicoterapia atual foram incluídas como co-variáveis. Toda a análise estatística foi realizada com o uso do software IBM SPSS Statistics 22, e os gráficos foram gerados no software R (versão 4.4.2)

Aspectos Éticos

Foram seguidas todas as disposições da Resolução nº 466 de 2012, do Conselho Nacional de Saúde. Os participantes foram informados verbalmente e por escrito sobre a pesquisa, seus riscos, garantia de sigilo, direito a indenização e formas de acompanhamento. O participante podia desistir da participação a qualquer momento. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado antes do início de qualquer procedimento.

Resultados e Discussões

Resultados

Após a avaliação da elegibilidade de 82 pacientes, 30 atenderam aos critérios do estudo. No entanto, os dados de sete pacientes foram excluídos da análise, devido a ocorrências que impossibilitaram a continuidade dos pacientes na pesquisa.

A amostra final foi composta por 23 indivíduos, com idade média de $34,83 \pm 12,70$ anos, todos brasileiros, maioria do sexo feminino (65,2%), solteiros (65,2%), escolarizados (somente 4,3% apresentaram menos de 09 anos de educação formal). Os pacientes, em média, preencheram os critérios para depressão moderada a grave pela MADRS ($30,91 \pm 4,89$), relataram sintomas depressivos há aproximadamente 8 anos, 88% dos pacientes apresentaram transtorno depressivo recorrente (ou seja, dois ou mais episódios depressivos) e quase metade (47,8%) teve mais de 4 episódios. A média do BDI-II basal dos pacientes foi de $37,65 \pm 8,83$. Quanto à classificação da gravidade da depressão com base no BDI, observou-se que 4,3% dos participantes foram classificados com depressão leve, 13% apresentaram depressão moderada, e a maioria, 82,6%, foi categorizada com depressão severa.

Dos 23 pacientes, 82,6% estavam em tratamento psicoterapêutico e 30,4% praticavam exercício físico regularmente. Todos os pacientes estavam em uso regular de benzodiazepínicos durante o estudo. Informações mais detalhadas sobre a caracterização sociodemográfica dos pacientes, ocorrências e exclusão de pacientes podem ser encontradas em (Fontes et al., 2024).

A análise de variância com medidas repetidas (RM ANOVA) indicou que houve melhora na qualidade do sono pela redução significativa na pontuação da PSQI ($F(2,40) = 5,161$, $p=0,01$, $\eta^2 = 0,205$). A análise post-hoc mostrou que essa diminuição ocorreu entre as sessões 1 e 8 do tratamento ($p=0,05$), conforme a Figura 1. O teste de esfericidade de Mauchly não indicou violação da suposição de esfericidade, $W(2) = 0,946$, $p = 0,588$, permitindo a interpretação dos resultados sem correções dos graus de liberdade.

Discussão

Os distúrbios do sono são considerados patologias que apresentam uma combinação etiológica com bases biológica e cognitiva, podendo apresentar diferentes elementos também afetados pela depressão maior (Doi, 2000). Com isso, este estudo procurou investigar os efeitos no sono após oito sessões com cetamina em voluntários com DRT e auxílio da psicoterapia assistida, por meio da comparação de escores na Escala de Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh, avaliando-os no início (basal), no meio e no final do tratamento. Logo, nós observamos que houve melhora na qualidade do sono dos pacientes com DRT submetidos ao protocolo de escetamina SC.

A análise dos dados corroboram com as expectativas das hipóteses do projeto revelando melhora da qualidade do sono. O estudo de Liu e colaboradores (2020) analisou a influência da insônia basal na eficácia antidepressiva de administração intravenosa da cetamina IV (0,5 mg/kg durante 40 min), sendo aplicada seis infusões durante doze dias nos voluntários com depressão unipolar e bipolar. As conclusões foram que os pacientes que tiveram uma maior redução no distúrbio do sono, como insônia, na primeira infusão alcançaram uma melhora em seus sintomas depressivos, além de ser observado que os pacientes com alta insônia eram mais prováveis de obter resposta e remissão dos sintomas depressivos que aqueles com baixa insônia. O estudo avalia a qualidade do sono por meio da Escala de Avaliação de Depressão de Montgomery-Asberg (MADRS), que interpreta de modo geral o distúrbio do sono. Este resultado do estudo citado se diferencia dos resultados do projeto uma vez que não avalia a

qualidade do sono com uma escala específica, como a IQSP e a quantidade de aplicação da cetamina.

A revisão de literatura esclarece que a cetamina melhora o sono REM (movimentos rápidos dos olhos) e aumenta significativamente os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína sináptica relacionada fortemente com a atividade de ondas lentas (SWA), melhorando a plasticidade sináptica mediada pelo BDNF e os sintomas depressivos (Franco e Lima, 2020).

Na depressão, há mudanças em mecanismos homeostáticos e circadianos do sono, a saber: arquitetura do sono, expressão dos genes do relógio biológico, bem como a regulação de neurotransmissores, os quais também regulam o humor (Pandi-Perumal, 2020). Pacientes com depressão apresentam alterações no sono REM, incluindo latência reduzida, prolongamento do primeiro período e aumento da densidade REM (Tsuno et al., 2005), e também apresentam menor sono de ondas lentas. Há evidências de um desalinhamento entre o relógio biológico e o ciclo sono-vigília na depressão (Wehr e Wirz-Justice, 1980).

Observa-se pouca literatura específica que discorra sobre a melhora da qualidade do sono em sujeitos com DRT e o uso da cetamina. Com isso, percebe-se a necessidade da possibilidade de uma análise pelos componentes da Escala do IQSP para investigar alterações significativas específicas. Desta forma, nota-se que este estudo se constitui o primeiro em usar a escala IQSP em relação ao uso da cetamina e psicoterapia assistida em pacientes com DRT. Além disso, a avaliação da qualidade do sono foi feita utilizando uma escala de autorrelato, sem avaliação objetiva do sono por meio de EEG ou de polissonografia, o que deve ser abordado em estudos futuros. Ademais, embora não tenhamos um grupo controle para comparação direta dos resultados, é importante ressaltar que poucos estudos abordam a interação da cetamina com aspectos relacionados ao sono, um importante indicador de transtornos mentais, inclusive presente como sintoma de depressão.

Conclusão

Em síntese, identificamos melhorias na qualidade do sono em pacientes com depressão resistente ao tratamento (DRT) após oito sessões de escetamina subcutânea com auxílio da psicoterapia assistida. Apesar das limitações do estudo, até onde temos conhecimento, este é o primeiro trabalho a investigar o efeito dessa via de administração da escetamina sobre o sono de pacientes com DRT. Os achados reforçam a possibilidade de validar futuramente uma forma de aplicação menos invasiva que a intravenosa e mais acessível financeiramente do que a intranasal, atualmente a única aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA). Além disso, o estudo fornece subsídios para pesquisas futuras que tenham como foco principal explorar os mecanismos homeostáticos e circadianos que regulam o sono em indivíduos com depressão resistente.

Referências

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Depression. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>>. Acesso em: 31 ago. 2024.

Kaplan

Breslau N., Roth T., Rosenthal L., Andreski P. Sleep disturbance and psychiatric disorders: a longitudinal epidemiological study of young adults. *Biol Psychiatry*, 39 (1996), pp. 411-418

CHELLAPPA, Sarah Laxhmi; ARAÚJO, JOHN FONTENELE. O sono e os transtornos do sono na depressão. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 34, p. 285-289, 2007

NEVES, G. S. M. L.; GIORELLI, A. S.; FLORIDO, P.; GOMES, M. M. Transtornos do sono: visão geral. *Rev. Bras. Neurol.*, v. 49, n. 2, p. 57-71, 2013.

CUSIN, C.; DOUGHERTY, D. D. Somatic therapies for treatment-resistant depression: ECT, TMS, VNS, DBS. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, v. 2, p. 1-14, 2012. DOI: 10.1186/2045-5380-2-14.

OLFSON, M.; AMOS, T. B.; BENSON, C.; McRAE, J.; MARCUS, S. C. Prospective service use and health care costs of Medicaid beneficiaries with treatment-resistant depression. *J Manag Care Spec Pharm*, v. 24, p. 226-236, 2018.

ZARATE, C. A. et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry*, v. 63, p. 856-864, 2006.

ZARATE Jr, C. A. et al. Relationship of ketamine's plasma metabolites with response, diagnosis, and side effects in major depression. *Biological Psychiatry*, v. 72, p. 331-338, 2012.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves new nasal spray medication for treatment-resistant depression; available only at a certified doctor's office or clinic. 2019.

COYLE, C. M.; LAWS, K. R. The use of ketamine as an antidepressant: A systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, v. 30, p. 152-163, 2015.

LOO, C. K.; GÁLVEZ, V.; O'KEEFE, E.; MITCHELL, P. B.; HADZI-PAVLOVIC, D.; LEYDEN, J.; HARPER, S.; SOMOGYI, A. A.; LAI, R.; WEICKERT, C. S. Placebo-controlled pilot trial testing dose titration and intravenous, intramuscular, and subcutaneous routes for ketamine in depression. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 134, p. 48-56, 2016.

GÁLVEZ, V.; O'KEEFE, E.; COTIGA, L.; LEYDEN, J.; HARPER, S.; GLUE, P.; MITCHELL, P. B.; SOMOGYI, A. A.; DeLORY, A.; LOO, C. K. Long-lasting effects of a single subcutaneous dose of ketamine for treating melancholic depression: a case report. *Biological Psychiatry*, v. 76, p. e1-e2, 2014.

GEORGE, D.; GÁLVEZ, V.; MARTIN, D.; KUMAR, D.; LEYDEN, J.; HADZI-PAVLOVIC, D.; HARPER, S.; BRODATY, H.; GLUE, P.; TAYLOR, R.; MITCHELL, P. B.; LOO, C. K. Pilot randomized controlled trial of titrated subcutaneous ketamine in older patients with treatment-resistant depression. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 25, p. 1199-1209, 2017.

LAI, R.; KATALINIC, N.; GLUE, P.; SOMOGYI, A. A.; MITCHELL, P. B.; LEYDEN, J.; HARPER, S.; LOO, C. K. Pilot dose-response trial of intravenous ketamine in treatment-resistant depression. *World Journal of Biological Psychiatry*, v. 15, p. 579-584, 2014.

LOO, C.; GLOZIER, N.; BARTON, D.; BAUNE, B.; MILLS, N.; FITZGERALD, P.; RODGERS, A. Efficacy and safety of a 4-week course of repeated subcutaneous injections of esketamine for treatment-resistant depression (KADS study): double-blind randomized active-controlled trial. *The British Journal of Psychiatry*, p. 1-9, 2023. DOI: 10.1192/bjp.2023.79.

GLUE, P.; GULATI, A.; LE NEDELEC, M.; DUFFULL, S. Dose- and exposure-response to ketamine in depression. *Biological Psychiatry*, v. 70, p. e9–e10, 2011.

SHORT, B.; FONG, J.; GALVEZ, V.; SHELKER, W.; LOO, C. K. Side-effects associated with ketamine use in depression: a systematic review. *The Lancet Psychiatry*, v. 5, n. 1, p. 65-78, 2018. DOI: 10.1016/S2215-0366(17)30272-9.

American Psychiatry Association (2014). *Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais*. (5 ed.). Porto Alegre: Artmed

FRANCO, Fernanda Moreira et al. Os efeitos do uso da cetamina em pacientes com depressão resistente ao tratamento. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 6, p. 36999-37016, 2020.

FILHO, D. Z. Sono e ritmos circadianos na depressão resistente. *Debates em Psiquiatria*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 24–32, 2014. DOI: 10.25118/2763-9037.2014.v4.240. Disponível <https://revistardp.org.br/revista/article/view/240>. Acesso em: 18 jan. 2022.

RODRIGUES, Nelson B. et al. Do sleep changes mediate the anti-depressive and anti-suicidal response of intravenous ketamine in treatment-resistant depression?. *Journal of Sleep Research*, p. e13400, 2022.

NEVES, G. S. M. L.; GIORELLI, A. S.; FLORIDO, P.; GOMES, M. M. Transtornos do sono: visão geral. *Rev. Bras. Neurol.*, v. 49, n. 2, p. 57-71, 2013.

CHELLAPPA, Sarah Laxhmi; ARAÚJO, JOHN FONTENELE. O sono e os transtornos do sono na depressão. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 34, p. 285-289, 2007

Corrigan A, Pickering G. Ketamine and depression: a narrative review. *Drug Des Devel Ther*. Agosto de 2019;Volume 13:3051–67

C. K. Loo, V. Gálvez, E. O’keefe, P. B. Mitchell, D. Hadzi-Pavlovic, J. Leyden, S. Harper, A. A. Somogyi, R. Lai, C. S. Weickert, Others, Placebo-controlled pilot trial testing dose titration and intravenous, intramuscular and subcutaneous routes for ketamine in depression. *Acta Psychiatr. Scand*. 134, 48–56 (2016)

Liu, Weijian et al. “Baseline insomnia as a predictor of antidepressant efficacy to repeated intravenous ketamine for unipolar and bipolar depression: A preliminary study.” *Journal of affective disorders* vol. 271 (2020): 1-8. doi:10.1016/j.jad.2020.03.048

Cavenaghi, V. B., Da Costa, L. P., Lacerda, A. L. T., Hirata, E. S., Miguel, E. C., & Fraguas, R. (2021). Subcutaneous ketamine in depression: A systematic review. *Frontiers in Psychiatry*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.513068>

Palhano-Fontes, F., Barreto, D., Onias, H., Andrade, K. C., Novaes, M. M., Pessoa, J. A., Mota-Rolim, S. A., Osório, F. L., Sanches, R., Dos Santos, R. G., Tófoli, L. F., de Oliveira Silveira, G., Yonamine, M., Riba, J., Santos, F. R., Silva-Junior, A. A., Alchieri, J. C.,

Galvão-Coelho, N. L., Lobão-Soares, B., Hallak, J. E. C., & Araújo, D. B. (2019). Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychological medicine*, 49(4), 655–663.
<https://doi.org/10.1017/S0033291718001356>

Pandi-Perumal, S. R., Monti, J. M., Burman, D., Karthikeyan, R., BaHammam, A. S., Spence, D. W., Brown, G. M., & Narashimhan, M. (2020). Clarifying the role of sleep in depression: A narrative review. *Psychiatry research*, 291, 113239.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113239>

Wehr, T.A., Wirz-Justice, A., 1980. Internal coincidence model for sleep deprivation and depression. *Sleep*, 26-33.

Anexos

Figura 1: Mudanças na qualidade de sono pela PSQI-Br

Tabela 1: Médias marginais por sessão para cada componente do PSQI-Br e resultados de significância estatística (valor de p)

CÓDIGO: SB0584

AUTOR: JUANNA GABRIELLA DE SOUZA DEHON

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Relação Entre Inflamação e Qualidade do Sono em Estudantes
Universitários: Um Estudo no Projeto UNILIFE da UFRN

Resumo

A má qualidade do sono é um problema frequente entre universitários, com repercussões negativas sobre desempenho acadêmico, saúde mental e bem-estar. Este estudo teve como objetivo estimar a prevalência de má qualidade do sono entre estudantes universitários brasileiros e avaliar sua associação com sexo, idade e região. Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico, recorte do estudo multicêntrico UNILIFE-M, realizado com 3.482 estudantes de dez universidades brasileiras. A má qualidade do sono foi definida como percepção moderada ou grave de impacto dos problemas de sono na qualidade geral, avaliada por pergunta única em escala de 0 a 4. Foram analisadas associações com sexo, idade e região de residência utilizando teste qui-quadrado de Pearson e teste t de Student. A prevalência geral de má qualidade do sono foi de 36,5%, sendo maior no sexo feminino (40,7%) em comparação ao masculino (29,6%) ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa na idade média entre os grupos ($p = 0,9407$). As maiores prevalências regionais ocorreram no Nordeste (36,75%) e Centro-Oeste (36,72%), e a menor no Norte (24,74%), com associação significativa entre região e má qualidade do sono ($p = 0,015$). Conclui-se que a má qualidade do sono é prevalente entre universitários brasileiros e apresenta variações significativas segundo sexo e região, mas não segundo idade, e que estratégias de promoção da saúde do sono devem considerar essas diferenças para maior efetividade.

Palavras-chave: Sono; Universitários; Prevalência; Fatores associados.

TITLE: Prevalence of Perceived Sleep Quality among Brazilian University Students:
Analysis by Sex, Age, and Region

Abstract

Poor sleep quality is a frequent problem among university students, with negative repercussions on academic performance, mental health, and overall well-being. This study aimed to estimate the prevalence of poor sleep quality among Brazilian university students and to assess its association with sex, age, and region of residence. This cross-sectional, observational, and analytical study is a subset of the multicenter UNILIFE-M project, conducted with 3,482 students from ten Brazilian universities. Poor sleep quality was defined as a moderate or severe perceived impact of sleep problems on overall quality, assessed through a single question on a 0–4 scale. Associations with sex, age, and region of residence were analyzed using Pearson's chi-square test and Student's t-test. The overall prevalence of poor sleep quality was 36.5%, higher in females (40.7%) compared to males (29.6%) ($p < 0.001$). There was no significant difference in mean age between groups ($p = 0.9407$). The highest regional prevalences occurred in the Northeast (36.75%) and Midwest (36.72%), and

the lowest in the North (24.74%), with a significant association between region and poor sleep quality ($p = 0.015$). In conclusion, poor sleep quality is prevalent among Brazilian university students and varies significantly according to sex and region, but not age, indicating that sleep health promotion strategies should consider these differences for greater effectiveness.

Keywords: Sleep; University students; Prevalence; Associated factors.

Introdução

A prevalência de má qualidade do sono entre estudantes universitários é elevada e consistente em diferentes contextos internacionais. Estudos transversais e meta-análises recentes demonstram que a prevalência de má qualidade do sono, geralmente avaliada pelo Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), varia amplamente, mas frequentemente atinge valores entre 25% e 65%, dependendo do critério de corte utilizado e da população estudada. Em uma meta-análise abrangente com estudantes universitários chineses, a prevalência de distúrbios do sono foi de 25,7% (IC 95%: 22,5–28,9%), com 20,3% relatando insatisfação com a qualidade do sono e 23,6% apresentando sintomas de insônia.[1] Estudos mais recentes em diferentes regiões da China relatam prevalências de má qualidade do sono entre 26,6% (usando PSQI >7) e 43% (usando PSQI >5).[2-4] Em outros contextos, como na Alemanha, a prevalência de má qualidade do sono (PSQI >5) foi de 48,7%.[5] Em uma amostra italiana, 65% dos estudantes apresentaram má qualidade do sono e 55% sintomas de insônia.[6] Na África, uma meta-análise envolvendo mais de 16 mil estudantes universitários encontrou uma prevalência agrupada de má qualidade do sono de 63,3% (IC 95%: 56,9–65,7%).[7] Estudos em regiões específicas da China também relatam prevalências superiores a 50%.[8] Ademais, a literatura mostra que a privação ou fragmentação do sono prejudica significativamente o desempenho em provas e avaliações, com correlação positiva entre duração/qualidade do sono e notas obtidas. [10-11] O sono insuficiente ou irregular também está relacionado ao aumento da sonolência diurna, que por sua vez exige a capacidade de concentração, memória e aprendizado. [11] Embora a duração do sono seja importante, a qualidade do sono parece ser um fator ainda mais determinante para o rendimento acadêmico e o bem-estar geral. [11] A percepção dos estudantes sobre a má qualidade do sono está fortemente associada a fatores como estresse (relatado por até 85% dos estudantes como causa principal), problemas acadêmicos, preocupações gerais, questões afetivas, mudanças nos hábitos de sono, uso de dispositivos eletrônicos à noite, e condições de saúde física e mental.[9][8] Além disso, fatores como pressão acadêmica, uso de álcool e tabaco, dependência de telefone celular, ambiente de dormitório ruidoso, e baixa resiliência psicológica são consistentemente identificados como preditores de pior qualidade do sono.[3-4][8] Nesse sentido, fatores semelhantes estão associados à má qualidade do sono entre estudantes universitários brasileiros. No entanto, estudos realizados no Brasil ainda apresentam caráter descentralizado, sendo conduzidos de forma isolada em diferentes estados ou instituições, o que limita uma visão abrangente da realidade nacional. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a prevalência da percepção da qualidade do sono em universitários, contemplando todas as regiões do país, a fim de fornecer uma análise mais ampla e representativa do cenário brasileiro, bem como analisar fatores sociodemográficos, como idade e sexo, e suas possíveis repercussões na saúde e no desempenho acadêmico.

Metodologia

Este projeto é um recorte do estudo UNILIFE-M e se configura como uma investigação transversal. O UNILIFE-M é um estudo de coorte prospectivo multicêntrico, conduzido em 7 centros: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (USP), Universidade de Brasília (UNB) e Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os dados foram obtidos a partir de um banco com informações coletadas por questionário autorreferidos online enviado aos voluntários via email ou WhatsApp, disponibilizados na plataforma REDCap, com perguntas sobre estilo de vida e saúde mental. A amostra conta com estudantes do primeiro período regularmente matriculados nas universidades participantes, os quais foram recrutados a partir de mídias sociais e por portais das universidades. Foram incluídos nesse estudo todos os participantes que responderam às questões referentes à idade, sexo biológico, universidade participante e autopercepção da qualidade geral do sono. A variável dependente foi a qualidade do sono, avaliada pela pergunta: “Problemas com o sono afetam a qualidade do seu sono em geral?”, com respostas em escala ordinal de 0 a 4: 0 = Nada, de modo algum; 1 = Muito leve, raramente, menos de um ou dois dias; 2 = Leve, vários dias; 3 = Moderado, mais da metade dos dias; 4 = Grave, quase todos os dias. Para a análise, foi criada uma variável dicotômica, considerando “má qualidade do sono” quando a resposta foi igual ou superior a 3 (moderado ou grave). As variáveis independentes analisadas foram: sexo biológico (1 = feminino; 2 = masculino), idade (em anos completos) e região geográfica da universidade (Centro-Oeste, Nordeste, Norte, Sudeste e Sul). Foram calculadas frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas e medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas. As associações entre as variáveis categóricas e a má qualidade do sono foram verificadas por meio do teste do qui-quadrado de Pearson, enquanto a comparação da idade entre os grupos de boa e má qualidade do sono foi realizada com o teste t de Student para amostras independentes. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas e a elaboração dos gráficos foram realizadas no software Python (versão 3.11), utilizando as bibliotecas pandas, scipy e matplotlib.

Resultados e Discussões

A amostra final foi composta por 3.482 estudantes universitários com dados completos sobre qualidade do sono, idade, sexo biológico e região da universidade. A média de idade foi de $21,30 \pm 6,29$ anos, variando de 18 a 60 anos, com predominância do sexo feminino. A prevalência geral de má qualidade do sono (definida como percepção moderada ou grave de impacto dos problemas de sono) foi de 36,5%, valor compatível com o intervalo relatado em estudos prévios (25% a 40%) na população universitária [1], confirmando a relevância desse problema para o contexto acadêmico. Na análise por sexo, 40,7% das mulheres relataram má qualidade do sono, contra 29,6% dos homens, diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 43,09$; $p < 0,001$). Esse achado corrobora evidências que apontam maior vulnerabilidade feminina. Flutuações hormonais ao longo do ciclo menstrual, gestação e menopausa influenciam a arquitetura do sono, aumentando despertares noturnos e a latência para adormecer. Estudos demonstram que os níveis de estrogênio e progesterona exercem papel relevante na regulação do sono, e que distúrbios como insônia, apneia e síndrome das pernas inquietas tornam-se mais prevalentes em fases de transição hormonal, afetando até 40% das mulheres na perimenopausa. [12-13] Além disso, fatores psicossociais, como maior prevalência de sintomas ansiosos e depressivos e maior sobrecarga de responsabilidades sociais e familiares, também contribuem para a pior qualidade de sono entre as mulheres. Em relação à idade, não se observaram diferenças relevantes entre os grupos com boa e má

qualidade do sono ($21,29 \pm 6,37$ anos vs. $21,31 \pm 6,18$ anos; $p = 0,9407$), sugerindo que o comprometimento do sono se distribui de forma semelhante nas diferentes faixas etárias da população estudada. Na análise por região geográfica, as maiores proporções de má qualidade do sono foram registradas no Nordeste (36,75%) e Centro-Oeste (36,72%), seguidas pelo Sudeste (34,40%) e Sul (30,27%), enquanto a menor prevalência ocorreu no Norte (24,74%). O teste do qui-quadrado evidenciou associação estatisticamente significativa entre a região e a ocorrência de má qualidade do sono ($\chi^2 = 12,32$; $p = 0,015$), demonstrando que a distribuição não é homogênea no território nacional. A menor prevalência observada no Norte do Brasil pode estar relacionada a fatores ambientais, culturais e sociais. Estudos nacionais indicam que queixas relacionadas ao sono são mais prevalentes em populações de baixa renda do Nordeste e Sudeste, quando comparadas ao Sul. [14] Além disso, investigações populacionais mostram que diferenças climáticas, como maior exposição à luz solar e contato frequente com ambientes naturais, podem atuar como fatores protetores ao favorecer a regulação do ciclo circadiano. Embora a maior parte dos estudantes tenha relatado impacto nulo ou leve, uma parcela expressiva apresentou comprometimento grave (quase todos os dias), o que pode repercutir negativamente no desempenho acadêmico, na saúde física e mental e na qualidade de vida. Esses achados reforçam a importância de estratégias institucionais voltadas à promoção da higiene do sono, adaptadas às especificidades regionais e considerando o perfil sociodemográfico dos estudantes.

Conclusão

Este estudo evidenciou que a má qualidade do sono é um problema relevante entre universitários brasileiros, afetando mais de um terço da amostra analisada. Observou-se maior prevalência entre mulheres e variações significativas entre regiões, com destaque para as maiores taxas no Nordeste e Centro-Oeste e a menor no Norte. Não foram identificadas diferenças significativas segundo a idade, sugerindo que o impacto do sono inadequado afeta estudantes em diferentes fases da vida universitária.

Referências

1. LI, L. et al. Prevalence of sleep disturbances in Chinese university students: a comprehensive meta-analysis. *Journal of Sleep Research*, [S.l.], v. 27, n. 3, e12648, 2018. DOI: 10.1111/jsr.12648.
2. ZHANG, S. et al. Circadian rhythms and sleep quality among undergraduate students in China: the mediating role of health-promoting lifestyle behaviours. *Journal of Affective Disorders*, [S.l.], v. 333, p. 225–232, 2023. DOI: 10.1016/j.jad.2023.04.077.
3. HU, B. et al. Prevalence and related factors of sleep quality among Chinese undergraduates in Jiangsu Province: multiple models' analysis. *Frontiers in Psychology*, [S.l.], v. 15, 1343186, 2024. DOI: 10.3389/fpsyg.2024.1343186.
4. HU, B. et al. Factors associated with sleep disorders among university students in Jiangsu Province: a cross-sectional study. *Frontiers in Psychiatry*, [S.l.], v. 15, 1288498, 2024. DOI: 10.3389/fpsyt.2024.1288498.
5. SCHMICKLER, J. M. et al. Determinants of sleep quality: a cross-sectional study in university students. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 2019, 2023. DOI: 10.3390/ijerph20032019.
6. CARPI, M.; CIANFARANI, C.; VESTRI, A. Sleep quality and its associations with physical and mental health-related quality of life among university students: a cross-sectional study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, [S.l.], v. 19, n. 5, p. 2874, 2022. DOI: 10.3390/ijerph19052874.
7. NAKIE, G. et al. Sleep quality and associated

factors among university students in Africa: a systematic review and meta-analysis study. *Frontiers in Psychiatry*, [S.l.], v. 15, 1370757, 2024. DOI: 10.3389/fpsy.2024.1370757. 8. ZHOU, Y. et al. Deteriorated sleep quality and influencing factors among undergraduates in Northern Guizhou, China. *PeerJ*, [S.l.], v. 10, e13833, 2022. DOI: 10.7717/peerj.13833. 9. RUIVO MARQUES, D.; ALLEN GOMES, A.; DE AZEVEDO, M. H. P. Perceived causes of sleep problems in higher education students: an exploratory study. *Psychological Reports*, [S.l.], 2024. DOI: 10.1177/00332941241299730 10. ESTEVAN, I.; SARDI, R.; TEJERA, A. C.; SILVA, A.; TASSINO, B. Should I study or should I go (to sleep)? The influence of test schedule on the sleep behavior of undergraduates and its association with performance. *PloS One*, v. 16, n. 3, e0247104, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247104>. 11. SEOANE, H. A.; MOSCHETTO, L.; ORLIACQ, F.; et al. Sleep disruption in medicine students and its relationship with impaired academic performance: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, v. 53, p. 101333, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smr.2020.101333> 12. MCCARTHY, M. J.; RODRIGUEZ, C. I.; ROSENBLUM, M. The role of gonadal hormones in sleep and circadian rhythms. *Frontiers in Neuroscience*, v. 14, 2020. DOI: 10.3389/fnins.2020.625397. Acesso em: 24 ago. 2025. 13. KORPI, J. et al. Women, hormones, and sleep: a narrative review. *Frontiers in Sleep*, v. 2, 2023. DOI: 10.3389/frsle.2023.1271827. Acesso em: 24 ago. 2025. 14. LIMA, M. G. et al. Sleep disturbances and complaints: prevalence in the São Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Medicine*, v. 16, n. 4, p. 546-552, 2015. Acesso em: 24 ago. 2025.

CÓDIGO: SB0585

AUTOR: FÁTIMA MICKAELLY DOS SANTOS

COAUTOR: VIVIANE SOUZA DO AMARAL

COAUTOR: MARIA AMALIA BARBOSA DE SOUZA

COAUTOR: RODRIGO SERAFIM DE ARAUJO

ORIENTADOR: JULIO ALEJANDRO NAVONI

TÍTULO: EXPOSIÇÃO CRÔNICA À RADIAÇÃO NATURAL E SEUS EFEITOS NA
POPULAÇÃO HUMANA: UM ESTUDO NA MICRORREGIÃO BORBOREMA
POTIGUAR

Resumo

A presença de moléculas radioativas naturais no ambiente representa riscos à saúde humana, sobretudo em regiões onde os níveis de radiação são elevados. Na microrregião da Borborema Potiguar, no Rio Grande do Norte, destaca-se o município de Lajes Pintadas, onde tem-se observado correlação entre os valores radiométricos elevados e o aumento no número de casos de neoplasias nas últimas décadas. Diante desse aspecto, este estudo objetiva avaliar a percepção de risco da população frente à exposição à radioatividade natural e determinar a frequência de alterações nucleares em células da mucosa oral humana, uma perspectiva crônica, comparando dados obtidos em 2014 e 2024. Para a análise, utilizou-se o ensaio BMCyt, permitindo a detecção de alterações citogenéticas analisando micronúcleos, brotos nucleares e outras anormalidades. Foram avaliados 52 indivíduos em ambos os períodos, relacionando os resultados aos níveis de exposição ao gás radônio, principal fonte de radiação natural. Os achados indicaram correlação entre a exposição ao radônio e o aumento de micronúcleos, sugerindo danos ao DNA por exposição crônica. Portanto, é necessário monitoramento contínuo, ampliação da amostra e inclusão de grupos controle para fortalecer a validade estatística e aprofundar a compreensão dos efeitos biológicos. Ademais, ressalta-se a importância de intensificar ações educativas e preventivas, visando reduzir os riscos da exposição crônica à radioatividade e seus impactos à saúde populacional.

Palavras-chave: Radônio. Micronúcleo. BMCyt. Exposição Crônica. Nordeste.

TITLE: CHRONIC EXPOSURE TO NATURAL RADIATION AND ITS EFFECTS ON
THE HUMAN POPULATION: A STUDY IN THE BORBOREMA POTIGUAR
MICROREGION

Abstract

The presence of naturally occurring radioactive molecules in the environment poses risks to human health, especially in regions with high radiation levels. In the Borborema Potiguar

microregion of Rio Grande do Norte, the municipality of Lajes Pintadas stands out, where a correlation has been observed between elevated radiometric values and an increase in neoplasms over recent decades. This study aims to assess the population's risk perception regarding exposure to natural radioactivity and determine the frequency of nuclear alterations in human oral mucosa cells, from a chronic perspective, comparing data obtained in 2014 and 2024. The BM cyt assay was used, enabling detection of cytogenetic alterations through analysis of micronuclei, nuclear buds, and other abnormalities. Fifty-two individuals were evaluated in both periods, correlating cytological findings with radon gas exposure levels, the main source of natural radiation. Results showed an association between chronic radon exposure and increased micronuclei, suggesting DNA damage. Therefore, continuous monitoring, sample expansion, and inclusion of control groups are needed to strengthen statistical validity and enhance understanding of biological effects. Moreover, it is crucial to intensify educational and preventive actions to mitigate risks of chronic exposure to radioactivity and its impacts on public health.

Keywords: Radon. Micronucleus. BM cyt. Chronic Exhibition. North East.

Introdução

A exposição humana a elevados níveis de radiação natural é um tema de extrema relevância para a saúde pública, especialmente em áreas com aspectos geológicos favoráveis à liberação de radionuclídeos naturais. Um exemplo notável é o Nordeste do Brasil, onde destaca-se a Província Pegmatítica da Borborema, área rica em corpos pegmatíticos naturalmente enriquecidos com o metal urânio (^{238}U) (Malanca, 1993; Ministério de Minas e Energia, 2005; Corrêa, 2019). Nas últimas décadas, essa particularidade consolidou a região como um campo relevante para estudos radiométricos e radioecológicos, voltados aos impactos da radiação natural na saúde humana (Marcon et al., 2017; Santos; Júnior; Melo, 2018; Martineli et al., 2023; Xavier; Navoni; Amaral, 2023).

O urânio presente nas rochas é um elemento instável, que passa por contínuos decaimentos, gerando como um dos seus subprodutos o gás radônio (^{222}Rn), de natureza insípida e inodora. Devido à sua facilidade de difusão na atmosfera, o radônio se mistura ao ar, podendo ser inalado e se depositar nos pulmões, onde continua seu processo, emitindo radiações alfa, beta e gama até se transformar em chumbo (^{206}Pb), e, então, torna-se estável. Essa transformação emite energia ionizante, sendo comprovadamente capaz de causar efeitos adversos à saúde, incluindo alterações nas funções celulares e danos ao DNA (Dantas et al., 2017; Manoj et al., 2020; Zlobina et al., 2022; Vargas et al., 2023).

Os efeitos da exposição ao radônio, junto a evidências epidemiológicas, levaram a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) a classificar o gás como um agente carcinogênico para humanos (IARC, 2006). As consequências têm sido tão recorrentes que o elemento foi categorizado como o segundo fator responsável pelo desenvolvimento de câncer de pulmão no mundo, superado apenas pelo tabagismo (IARC, 2012). Além disso, pesquisas indicam a associação da exposição ao radônio com o desenvolvimento de outros tipos de câncer, como leucemia e câncer de estômago, bem como outras patologias associadas (Barbosa-Lorenzo; Barros-Dios; Ruano-Ravina, 2017; Monn; Yoo, 2021).

Nesse contexto, populações expostas a ambientes com alta radiação decorrente do urânio e seus subprodutos têm sido alvo de estudos, como é o caso do município de Lajes Pintadas,

localizado na microrregião Borborema Potiguar, estado do Rio Grande do Norte. Na cidade, entre 2009 e 2023, pesquisas conduzidas por Marcon et al. (2017), Santos, Navoni e Amaral (2018), Martineli et al. (2023) e Xavier, Navoni e Amaral (2023) identificaram concentrações elevadas de radônio, com valores alcançando 2.893 Bq/m³, níveis muito superiores ao limite de 100 Bq/m³ preconizado pela OMS. Ao analisar alterações nucleares em materiais biológicos da população, registraram-se números bem acima quando confrontadas com uma região de baixa radiação natural. Apesar desses resultados, os autores ponderam que ainda há lacunas nas informações científicas sobre os riscos dessa exposição para a saúde humana, especialmente no que diz respeito aos efeitos crônicos da radioatividade natural.

Entre as técnicas utilizadas, o teste de micronúcleo em células da mucosa bucal humana (BMCyt) destaca-se por sua sensibilidade na detecção e avaliação de efeitos decorrentes da exposição natural (Thomas et al., 2009; Bolognesi et al., 2013; Marcon et al., 2017; Linhares et al., 2018; Bolognesi; Fenech, 2019).

Frente ao exposto, investigar os efeitos crônicos da radiação natural é crucial para subsidiar diretrizes precisas e eficazes no controle e mitigação dos riscos associados. Portanto, esta pesquisa reforça sua essencialidade pelo desenvolvimento e execução dos atuais Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), 03 (Saúde e Bem-estar), 14 e 15 (Proteção da Vida Aquática e Terrestre), tendo como objetivo analisar a exposição à radioatividade natural e determinar a frequência de alterações nucleares em células da mucosa oral humana no município de Lajes Pintadas/RN nos anos de 2014 e 2024.

Metodologia

2.1 Caracterização metodológica, área de estudo e aspectos éticos

Esta pesquisa emprega a mesma população e cálculo amostral de um estudo anterior, conduzido em 2014 com a população adulta da zona urbana de Lajes Pintadas/RN, uma área descrita por Xavier, Navoni e Amaral (2023) como sendo de Alta Radiação Natural de Fundo (ARNF). Para o período, conforme o IBGE (2016), a população consistia em 4.612 habitantes. Atualmente, Lajes Pintadas possui 4.787 habitantes (IBGE, 2022).

Considerando o cenário atual, buscou-se atingir uma potência estatística igual ou superior a 80%, aplicando-se a técnica de amostragem probabilística por conveniência à população vigente. Dessa forma, espera-se obter uma representatividade comparável à do estudo anterior.

Quanto aos critérios de inclusão, a pesquisa abrange indivíduos brasileiros, residentes em Lajes Pintadas/RN, com idade igual ou superior a 18 anos, e que tenham participado dos estudos prévios de 2014. Adicionalmente, foram incluídos novos participantes, desde que pertencentes ao mesmo grupo familiar dos indivíduos previamente avaliados (2014). Essa escolha fundamenta-se na maior homogeneidade genética e na similaridade de exposição ambiental entre membros do mesmo núcleo familiar, fatores que favorecem uma análise mais precisa das variáveis investigadas e reduzem vieses decorrentes de heterogeneidades populacionais. Foram excluídos aqueles que não atendam a esses critérios ou que recusarem a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dessa nova fase, dado que a investigação envolve a coleta de material biológico.

Nesse contexto, considerando, em sua maioria, a permanência dos indivíduos analisados e a avaliação da prevalência do efeito em dois momentos distintos, o estudo caracteriza-se como uma abordagem transversal. Ademais, é válido salientar que, conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFRN, sob o CAAE: 20368713.8.0000.5537.

2.2 Testes de micronúcleos e anormalidades nucleares em células da mucosa oral (BMCyt)

O ensaio BMCyt foi conduzido de acordo com o protocolo estabelecido por Thomas et al. (2009) e Thomas e Fenech (2011). Células da mucosa bucal de indivíduos residentes em Lajes Pintadas/RN foram coletadas utilizando escovas citológicas em ambos os lados da cavidade oral (direito e esquerdo).

Para a análise, a quantificação dos biomarcadores de dano no DNA seguiu os critérios definidos por Tolbert et al. (1992), Thomas et al. (2009), Bolognesi et al. (2013) e Rohr et al. (2020). As amostras foram examinadas em microscópio óptico, utilizando lentes objetivas de 40X e/ou 100X. Três lâminas foram confeccionadas para cada amostra, objetivando uma análise de 1.000 células, quantificando-se a frequência de células basais, diferenciadas, binucleadas, com cariorréxis, cariólise, picnólise e cromatina condensada. Adicionalmente, analisaram-se 2.000 células diferenciadas para identificar a presença de micronúcleos, brotos nucleares e broken-egg, totalizando 3.000 células por indivíduo.

2.3 Análises estatísticas

A comparação das alterações nucleares (abordagem BMCyt) entre 2014 e 2024 foi realizada por meio de testes t para amostras emparelhadas e testes de Wilcoxon, conforme a adequação dos dados. O teste t foi utilizado para comparar as médias das variáveis entre os dois períodos, enquanto o teste de Wilcoxon foi aplicado para dados não paramétricos ou em situações de empates entre os pares de observações. Para cada comparação, foi calculado o valor de p e estimado o tamanho de efeito, utilizando o d de Cohen e a correlação biserial de ordens.

Quanto à interpretação do efeito da exposição à radioatividade natural e do tempo transcorrido na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares, utilizou-se um modelo de Equações de Estimação Generalizadas (GEE), com distribuições de Poisson e binomial negativa. A seleção do modelo foi realizada com base no critério de Akaike, sendo a distribuição de Poisson a que apresentou o melhor ajuste. Este modelo considerou a influência desses fatores, além das possíveis interações entre eles, tratadas como variáveis fixas, enquanto um fator aleatório foi incorporado para cada indivíduo. O ajuste do modelo foi realizado controlando as variáveis de confusão, como idade, sexo, hábitos de fumar e consumo de álcool, utilizando um escore de propensão.

Em todos os casos, consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com valores de $p < 0,01$. Os dados foram analisados por meio do programa SPSS Statistics versão 2.0 (Statistical Package for the Social Science).

Resultados e Discussões

Os resultados a seguir correspondem a um estudo em andamento no município de Lajes Pintadas/RN. Para tanto, disponibiliza-se a apresentação dos dados consolidados desde o ano de 2014, seguida da exposição de novas perspectivas para o cenário atual (2024).

Concentrando-se na avaliação do perfil de exposição crônica à radiação natural, analisou-se dados obtidos de 90 participantes, acompanhados ao longo de uma janela temporal de 10 anos (2014–2024). Novos indivíduos pertencentes ao mesmo núcleo familiar foram incluídos, a fim de aumentar a potência estatística e viabilizar futuras análises, incluindo a perspectiva de uma investigação transgeracional. Até o momento 30 novos participantes foram incluídos (2024).

Considerando o exposto, os resultados estão organizados em três extratos: (I) alterações nucleares de 120 participantes atualmente incluídos no estudo (2024); (II) análise comparativa de alterações nucleares de 90 participantes acompanhados entre 2014 e 2024; e (III) correlação entre alterações nucleares identificadas pelo ensaio BM cyt e os níveis de radiação natural indoor (gás radônio) de 52 participantes monitorados nos anos de 2014 e 2024.

3.1. Alterações nucleares (abordagem BM cyt) de 120 participantes atualmente incluídos no estudo (2024)

3.1.1 Alterações nucleares (BM cyt)

O ensaio do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal (BM cyt) foi empregado como indicador do dano. Esse teste avalia diversos parâmetros, incluindo a frequência de micronúcleos (biomarcador de quebras ou perdas cromossômicas decorrentes de fragmentos de DNA), brotos nucleares (indicativos de amplificação gênica), e células binucleadas (resultantes de falhas na citocinese). Ademais, também identifica diferentes formas de morte celular, como cromatina condensada, cariorrexe, picnose e cariólise (Bolognesi et al., 2013; Thomas et al., 2009; Bolognesi; Fenech, 2019).

As células da mucosa bucal estão em contato direto com substâncias inaladas e ingeridas, constituindo-se como um sítio alvo para eventos genotóxicos precoces induzidos por agentes carcinogênicos. Considerando que mais de 90% dos cânceres humanos têm origem epitelial, o ensaio de micronúcleo em células bucais é considerada a abordagem mais adequada para o biomonitoramento do dano genético, especialmente em casos de exposição a agentes como o gás radônio (Fenech, 2019).

As células da mucosa bucal estão em contato direto com substâncias inaladas e ingeridas, constituindo-se como um sítio alvo para eventos genotóxicos precoces induzidos por agentes carcinogênicos. Considerando que mais de 90% dos cânceres humanos têm origem epitelial, o ensaio de micronúcleo em células bucais é considerada a abordagem mais adequada para o biomonitoramento do dano genético, especialmente em casos de exposição a agentes como o gás radônio (Fenech, 2019).

Nesse contexto, a Tabela 1 apresenta a frequência de biomarcadores citogenéticos (%) da população analisada. A média de células binucleadas, indicativa de falhas na citocinese, foi de 7,64, inferior ao valor de referência de 11,94, sugerindo baixa interferência e manutenção da integridade genômica. De forma semelhante, os danos relacionados à morte celular estiveram abaixo dos valores de referência. Cromatina condensada apresentou média de 0,82, enquanto as células cariorréticas e cariолíticas apresentaram médias de 8,23 e 19,63,

respectivamente. Esses valores mostraram-se inferiores aos valores de referência, que foram 10,42 para cromatina condensada, 43,17 para células cariorréticas e 259,7 para células cariolíticas (Bolognasi et al., 2015). A baixa sugere menor ativação de apoptose e necrose, possivelmente refletindo exposição reduzida a agentes nocivos ou maior eficiência nos mecanismos de reparo celular.

Em contrapartida, a média de células picnóticas foi de 19,3 superior ao valor de referência de 2,75 (Tabela 1). Esse aumento pode indicar que, embora o organismo consiga controlar outros tipos de danos, a magnitude do dano foi suficiente para induzir a picnose, processo precursor da morte celular irreversível. Tal resultado reflete uma exposição aumentada a fatores estressores ou a falhas nos mecanismos de reparo celular, que não conseguiram conter o dano em seus estágios iniciais, evidenciando um comprometimento celular mais severo, em contraste com a menor ativação dos processos de morte celular observados nos outros parâmetros. Valores semelhantes foram observados em estudos sobre radiação natural e saúde humana conduzidos por Thomas et al. (2009) e Marcon et al. (2017).

Com relação à frequência de micronúcleos, observou-se um valor de 10,57, superior à referência de 1,02 (Tabela 1). Embora os valores encontrados sejam elevados, trabalhando com a mesma população, Santos (2018) relatou a presença de até 10 micronúcleos em uma única célula, além de uma frequência quatro vezes superior àquela registrada por Marcon et al. (2017) em um estudo com uma população de características socioambientais semelhantes. A presença de micronúcleos caracteriza-se como forte biomarcador de quebras ou perdas cromossômicas, resultantes de fragmentos de DNA ou cromossomos inteiros que não foram corretamente segregados durante a mitose, indicando susceptibilidade, especialmente quando analisado no contexto do histórico de saúde. Esse resultado é um indicativo de danos genotóxicos, relacionados à exposição a agentes mutagênicos ou a falhas nos mecanismos de reparo do DNA.

Em última análise, a média de brotos nucleares foi de 8,97, superior ao valor de referência de 2,19, sugerindo possível associação com processos proliferativos ou danos celulares que induzem a formação dessas estruturas (Tabela 1). A elevada frequência aponta para amplificação gênica, evento que ocorre na fase S da replicação do DNA, caracterizado pela conexão dos brotos ao núcleo por um segmento de material nucleoplasmático.

3.2 Análise comparativa das alterações nucleares (BMCyt) de 90 participantes acompanhados entre 2014 e 2024

Neste segundo momento, foi realizada análise comparativa entre as alterações nucleares, conforme a abordagem BMCyt em 90 participantes acompanhados de 2014 a 2024. Para isso, foram considerados parâmetros relacionados às alterações nucleares, de modo a possibilitar uma avaliação mais precisa ao longo da escala temporal de 10 anos (2014 – 2024).

Esse quadro é ainda mais preocupante ao observar o histórico de câncer entre os participantes, com a taxa aumentando de 5,56% em 2014 para 11,1% em 2024. Frente a esses valores, destaca-se que Lajes Pintadas já apresentava índices elevados de neoplasias na população em geral. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o município revela valores epidemiológicos alarmantes, com altas taxas de registros e problemas associados à patologia. Entre 2000 e 2010, conforme informações do INCA e da plataforma DATASUS, foram registrados mais de 400 novos casos de câncer em uma população de aproximadamente 5.000 habitantes, representando o maior percentual do estado ao se comparar a totalidade da população com os registros de neoplasias. Da mesma forma, entre

2011 e 2022, os números mantiveram-se elevados, com mais de 350 novos casos registrados no período.

Embora o câncer seja uma condição multifatorial, o aumento na prevalência pode estar relacionado a condições associadas a alterações nucleares, incluindo danos e mutações genéticas. Alinha-se a essas questões a localização geográfica de Lajes Pintadas, condição que a torna sendo de elevada radiação natural de fundo, especialmente para o gás radônio, elemento associado ao aumento no risco de desenvolver câncer e outras doenças crônicas (Marcon et al., 2017; Da Costa Xavier, et al., 2023; Martineli et al., 2023; Ruano-Ravina et al., 2023; Henyoh et al., 2024).

3.2.1 Análise comparativa da frequência de alterações nucleares (BMCyt)

A Tabela 2 apresenta resultados emparelhados das alterações nucleares quantificadas em 2014 e 2024. Para todos os efeitos, foi utilizado o teste de Student e o teste não paramétrico de Wilcoxon. A análise incluiu verificação de significância estatística e avaliação adicional da dimensão do efeito, por meio do d de Cohen e da correlação biserial de ordens. Com base nas análises, observou-se variações entre os períodos de 2014 e 2024 ($p < 0,01$) nas seguintes características celulares: célula basal, cariorrexe, cariólise, micronúcleo e broto (Tabela 2).

Para a célula basal, as quantificações realizadas em 2024 foram mais altas, indicando possíveis alterações associadas ao aumento na ativação de processos celulares relacionados à regeneração ou replicação. Isso sugere que os indivíduos analisados em 2024 podem ter sido expostos a condições que favoreceram a proliferação, regeneração ou adaptação celular, resultando em uma maior frequência de células basais (Tabela 2).

Já a cariorrexe e cariólise, por serem alterações nucleares relacionadas ao processo de morte celular programada e danos citotóxicos, são reconhecidas como biomarcadores de apoptose e necrose. A primeira é caracterizada pela fragmentação nuclear e reflete estágio intermediário do processo apoptótico, enquanto a cariólise representa a dissolução do núcleo, associada à degradação mais avançada da célula (Bolognesi et al., 2013; Agarwal et al., 2015). Neste estudo, ambas apresentaram aumentos significativos entre os períodos analisados ($p < 0,01$), indicando elevação substancial na quantidade de células afetadas. Tal parâmetro aponta para uma intensificação nos mecanismos de morte celular e maior comprometimento da integridade nuclear, possivelmente em resposta a estresses fisiológicos ou ambientais que impactam o sistema celular ao longo do tempo.

Além das alterações nucleares associadas à morte celular, foi observado um aumento significativo na frequência de micronúcleos em 2024 ($p < 0,01$), marcadores de instabilidade genômica que indicam danos ao DNA (Tabela 2). Esse aumento norteia uma maior incidência de alterações cromossômicas ao longo do tempo, possivelmente em resposta a fatores ambientais ou internos, como registrado nos estudos in vitro por e em populações expostas a elementos com níveis de radiação natural de fundo (Mair et al., 2023; Riudavets et al., 2022).

De forma semelhante, a formação de brotos celulares apresentou um incremento expressivo ($p < 0,01$) em 2024 (Tabela 2). Além de estarem associados a instabilidade genômica, são observados em células que estão tentando se adaptar a estresses ou que estão em transição para estados de maior proliferação, podendo ser respostas de regeneração ou reparo. Assim, o aumento observado pode indicar uma resposta celular à persistência do estresse genotóxico.

Qian e colaboradores (2016) investigaram o potencial desses efeitos cumulativos. No estudo, os autores demonstraram que a exposição crônica à radiação ionizante está associada ao aumento de alterações nucleares, refletindo um acúmulo de danos genéticos e possíveis mecanismos de reparo. Esses resultados apontam para um quadro em que as células podem estar enfrentando danos genéticos e, em resposta, ativam mecanismos adaptativos para manter a homeostase celular.

3.3 Análise de correlação entre alterações nucleares (BMCyt) e os níveis de radiação natural (gás radônio) em 52 participantes monitorados nos anos de 2014 e 2024.

De acordo com Choppin, Lljenzin e Rydberg (2013), na natureza, o decaimento radioativo de compostos químicos como radônio ocorre de maneira constante. Assim, uma vez quantificados em diferentes períodos do ano, respeitando a sazonalidade ambiental, torna-se desnecessária a realização de medições adicionais. Dessa forma, dados radiométricos obtidos entre 2014 e 2016 foram adotados como padrão contínuo de exposição local.

Na Tabela 3, destacam-se os níveis máximos de radônio indoor registrados no município de Lajes Pintadas/RN ($n=52$), alcançando $701,23 \text{ Bq/m}^3$, número sete vezes acima do limite estabelecido pela OMS que é de 100 Bq/m^3 . Além disso, ao considerar a média de todas as coletas realizadas, registrou-se $310,99 \text{ Bq/m}^3$, três vezes superior aos níveis considerados seguros para a exposição humana. Em comparação com Natal/RN, cidade utilizada como parâmetro deste estudo e caracterizada como sendo de baixa radiação natural de fundo, a concentração máxima registrada foi de $84,0 \text{ Bq/m}^3$ e a média foi de $46,5 \text{ Bq/m}^3$.

Considerando todos os participantes de Lajes Pintadas envolvidos na pesquisa ($n=298$), e não apenas os dados preliminares ($n=52$), foram registrados níveis de até 2.893 Bq/m^3 , correspondendo a uma dose efetiva anual de $50,94 \text{ mSv/ano}$. Esse valor é aproximadamente 42 vezes superior ao limite recomendado de $1,2 \text{ mSv/ano}$ (IARC). Dos ambientes analisados, 90% das residências apresentaram concentrações de radônio superiores aos valores de referência estabelecidos por órgãos internacionais, indicando uma exposição significativa dos moradores e um aumento substancial no risco associado à inalação do gás. Esse risco relaciona-se ao processo de decaimento do radônio, onde partículas são emitidas, em especial, as alfa, podendo causar danos ao DNA celular, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de neoplasias (Riudavets et al., 2022).

3.3.1 Correlação entre a exposição ao gás radônio e a ocorrência de alterações nucleares

O perfil dos participantes neste terceiro estrato de dados é o mesmo descrito no item 3.2.1, pois se trata dos mesmos indivíduos. No entanto, a amostra foi reduzida para 52 participantes, considerando apenas aqueles cujas residências possuíam medições radiométricas. A análise foi restrita aos indivíduos que apresentavam informações sobre alterações nucleares registradas e níveis de radiação do gás radônio, viabilizando a correlação desses fatores ao longo dos períodos analisados (2014–2024), Tabela 4.

O tempo foi o fator que mais influenciou as variáveis dependentes do conjunto de dados. A frequência de anormalidades nucleares cresceu 8,2% (2024) quando comparada com a frequência inicial aferida (2014), enquanto a incidência de micronúcleos foi aproximadamente sete vezes maior (2024) do que nas instâncias iniciais do estudo (2014). Esses achados indicam um aumento expressivo na ocorrência de danos celulares ao longo da década, podendo estar associados às condições ambientais decorrentes da alta radiação natural apresentada na região. Resultados semelhantes foram descritos por Hamza e

Mohankumar (2009), ao analisarem danos citogenéticos em linfócitos humanos expostos in vitro ao radônio. Os autores concluíram que, mesmo em doses e taxas de exposição baixas, o radônio induz danos cromossômicos significativos, evidenciando seu alto potencial genotóxico.

Corroborando com essa análise, a exposição ao radônio demonstrou um efeito significativo sobre a frequência de micronúcleos, indicando um aumento de 1% para cada acréscimo de 1 Bq/m³ ($\text{Exp}(B) = 1.001$, $p = 0.001$), reforçando sua relação com a instabilidade genômica e os danos ao material genético. Essa variável não apresentou impacto significativo sobre o somatório de anormalidades nucleares, sugerindo a influência de outros fatores a serem investigados, a saber, hábitos de vida, consanguinidade e/ou exposição a substâncias não avaliadas neste estudo (Tabela 4).

Por último, a interação entre radônio e tempo (Radônio * T2 - T1) não foi estatisticamente significativa para as anormalidades nucleares ($\text{Exp}(B) = 1.000$, $p = 0.104$), indicando que o aumento das alterações ao longo do período analisado pode não estar associado à radioatividade medida (Tabela 4). Destaca-se, que para uma melhor discussão deste resultado deve-se levar em consideração diversos fatores que podem influenciar sua interpretação. Entre eles, a amostra reduzida, que limita a análise estatística; a adaptação à exposição crônica ao radônio e variações no reparo do DNA, que podem minimizar os danos celulares; e, a influência de agentes ambientais não avaliados, como metais pesados e poluentes, na instabilidade genômica independentemente da radiação. Ou seja, múltiplos fatores devem ser considerados para compreender as alterações celulares observadas (Santibáñez-Andrade et al., 2017; Burgio; Piscitelli; Migliore, 2018).

Conclusão

Os resultados apresentados neste estudo forneceram uma visão abrangente sobre as alterações nucleares observadas na população de Lajes Pintadas/RN ao longo de uma década (2014-2024). Dentre os principais achados, ênfase no desenvolvimento da análise citogenética, ao revelar alterações nucleares significativas, incluindo um aumento expressivo na ocorrência de micronúcleos e brotos nucleares, ambos biomarcadores de instabilidade genômica. Tais registros apontaram para uma possível relação entre a exposição ao ambiente rico em radionuclídeos naturais e danos ao DNA celular. Em contrapartida, observou-se que alguns parâmetros relacionados à morte celular apresentaram frequências inferiores aos valores de referência, sugerindo mecanismos compensatórios de resposta celular.

Frente a essas observações, a relação entre a exposição ao gás radônio e as alterações nucleares tornou-se ainda mais proeminente, especialmente, ao considerar que parte da análise revelou uma correlação estatisticamente significativa entre a concentração do gás

radônio e o aumento na incidência de micronúcleos. Esse achado contribuiu para reforçar a hipótese de que a exposição crônica a altos níveis de radiação natural pode estar associada a processos genotóxicos. No entanto, na complexidade dos parâmetros analisados, destacamos que outros fatores, além da radiação, também podem contribuir para os danos celulares observados, ressaltando a necessidade de abordagens multidisciplinares para melhor compreender os efeitos da radioatividade natural na saúde humana.

Em suma, é importante ressaltar que os dados apresentados neste estudo são preliminares, tornando-se necessário o aumento do grupo amostral a fim de atingir uma potência estatística mais robusta e representativa. Soma-se ainda a essencialidade de realizar novas análises estatísticas de modo a correlacionar outros parâmetros, incluindo hábitos de vida e fatores ocupacionais. Em última análise, destaca-se a relevância de realizar as coletas no grupo controle, permitindo comparativos mais precisos sobre os impactos da exposição crônica à radiação natural e, assim, reduzir possíveis vieses na interpretação dos dados.

Por fim, em conjunto, esses resultados refletem a complexidade das interações entre fatores ambientais e biológicos ao longo do tempo, reforçando a importância da investigação contínua e do monitoramento sistemático da saúde da população exposta, a fim de compreender melhor os impactos ambientais e contribuir para a proposição de estratégias de mitigação.

Referências

ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P.; CUNHA, L.V.F.C. Métodos e Técnicas na Pesquisa Etnobotânica. 2. ed. Recife: Comunigraf, 2008.

BARBOSA-LORENZO, R.; BARROS-DIOS, J. M.; RUANO-RAVINA, A. Radon and stomach cancer. *International Journal of Epidemiology*, v. 46, n. 2, p. 767–768, abr. 2017.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronucleus Cytome Assays in Human Lymphocytes and Buccal Cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), v. 2031, p. 147–163, 2019.

BOLOGNESI, C.; KNASMUELLER, S.; NERSESYAN, A. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutation Research*, v. 753, n. 2, p. 100–113, 2013.

BURGIO, E.; PISCITELLI, P.; MIGLIORE, L. Ionizing Radiation and Human Health: Reviewing Models of Exposure and Mechanisms of Cellular Damage. An Epigenetic Perspective. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 9, p. 1971, set. 2018.

CHOPPIN, G.; LILJENZIN, J. O.; RYDBERG, J.; EKBERG, C. Radiochemistry and Nuclear Chemistry. 4. ed. Amsterdam: Academic Press, 2013.

CORRÊA, R.S. A Província Scheelitífera Seridó, Província Borborema, Nordeste do Brasil: metalogenia e implicações geotectônicas. 2019. Repositório Institucional. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/36146>>. Acesso em: 20 set. 2024.

DANIELSEN, F. et al. Community Monitoring of Natural Resource Systems and the Environment. Annual Review of Environment and Resources, v. 47, n. Volume 47, 2022, p. 637–670, out. 2022.

DANTAS, R. DA C. et al. Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian Semiarid Region. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 39, n. 3, p. 275–282, 2017.

DE LUCENA, M. M. A.; FREIRE, E. M. X. Percepção ambiental e usos da fauna de uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) no semiárido brasileiro. Acta Scientiarum - Biological Sciences, v. 34, n. 3, p. 335–341, 2012.

GIULIO, G. M. D. et al. Percepção de risco: um campo de interesse para a interface ambiente, saúde e sustentabilidade. Saúde e Sociedade, v. 24, p. 1217–1231, dez. 2015.

HAMZA, V. Z.; MOHANKUMAR, M. N. Cytogenetic damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to radon. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 661, n. 1, p. 1–9, fev. 2009.

HENYOH, A. M. S. et al. Radon exposure and potential health effects other than lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in Public Health, v. 12, 25 set. 2024.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v.87. 2006.

IARC. Radiological Protection against Radon Exposure. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012; 54.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Panorama do Censo, 2022. Disponível em: <<https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Panorama do Censo, 2016. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

INTERNATIONAL COMMISSION FOR PROTECTION AGAINST ENVIRONMENTAL MUTAGENS AND CARCINOGENS. ICPEMC publication No. 16. Testing for mutagens and carcinogens; the role of short-term genotoxicity assays. Mutation Research, v. 205, n. 1–4, p. 3–12, 1988.

LINHARES, D. P. S. et al. DNA damage in oral epithelial cells of individuals chronically exposed to indoor radon (^{222}Rn) in a hydrothermal area. Environmental Geochemistry and Health, v. 40, n. 5, p. 1713–1724, out. 2018.

MAIER, A. et al. Experimental Setups for In Vitro Studies on Radon Exposure in Mammalian Cells—A Critical Overview. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 20, n. 9, p. 5670, jan. 2023.

MALANCA, A. Measurement of Gamma Radiation in Three Underground Scheele Mines. J. Environ. Radioactivity, 1993.

MANOJ, S.; THIRUMURUGAN, M.; ELANGO, L. Determination of distribution coefficient of uranium from physical and chemical properties of soil. *Chemosphere*, v. 244, p. 125411, abr. 2020.

MARCON, A. E. et al. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. *Chemosphere*, v. 167, p. 36–43, jan. 2017.

MARTINELLI, S. et al. Analysis of the cancer occurrence related to natural radioactivity in the Rio Grande do Norte State, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research International*, jul. 2023.

MEDEIROS, R. Socioambiental. *Infraestruturameioambiente*, sp.gov.br, 2022. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br>. Acesso em: 10 nov. 2023.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA SECRETARIA DE GEOLOGIA, MINERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO MINERAL. *Diagnóstico Do Município de Lajes Pintadas*. 2005.

MOON, J.; YOO, H. Residential radon exposure and leukemia: A meta-analysis and dose-response meta-analyses for ecological, case-control, and cohort studies. *Environmental Research*, v. 202, p. 111714, nov. 2021.

QIAN, Q.-Z. et al. Effects of ionising radiation on micronucleus formation and chromosomal aberrations in Chinese radiation workers. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 168, n. 2, p. 197–203, fev. 2016.

RIUDAVETS, M. et al. Radon and Lung Cancer: Current Trends and Future Perspectives. *Cancers*, v. 14, n. 13, p. 3142, jan. 2022.

ROHR, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. *Toxicology Letters*, v. 333, p. 242–250, out. 2020.

RUANO-RAVINA, A. et al. An overview on the relationship between residential radon and lung cancer: what we know and future research. *Clinical and Translational Oncology*, v. 25, n. 12, p. 3357–3368, dez. 2023.

SANTIBÁÑEZ-ANDRADE, M. et al. Air pollution and genomic instability: The role of particulate matter in lung carcinogenesis. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, v. 229, p. 412–422, out. 2017.

SANTOS, J.M.N.; SANTOS JÚNIOR, J.A.; MELO, A.M. Investigation of natural radioactivity as a possible driver of cancer incidence in Paraíba, Northeastern Brazil. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 178, n. 1, p. 112–115, 2018.

SANTOS, M. N. R. DOS. *Análise do risco à saúde de uma população exposta a radioatividade natural no semiárido do Nordeste brasileiro*. doctoralThesis—[s.l.] Brasil, fev. 2018.

SANTOS, M. N. R.; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S. Avaliação da percepção do risco em uma população do semiárido exposta a tóxicos ambientais. *Educação Ambiental em Ação*, Novo Hamburgo, v. 16, n. 62, 2018.

THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, v. 4, n. 6, p. 825–837, 2009.

THOMAS, P.; FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), v. 682, p. 235–248, 2011.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 271, n. 1, p. 69–77, fev. 1992.

VARGAS, V. M. F. et al. A comprehensive overview of genotoxicity and mutagenicity associated with outdoor air pollution exposure in Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, v. 26, n. 3, p. 172–199, abr. 2023.

XAVIER, L. A. C.; NAVONI, J. A.; SOUZA DO AMARAL, V. Oxidative genomic damage in humans exposed to high indoor radon levels in Northeast Brazil. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 889, p. 503652, jul. 2023.

ZLOBINA, A. et al. Impact of Environmental Radiation on the Incidence of Cancer and Birth Defects in Regions with High Natural Radioactivity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 14, p. 8643, jul. 2022.

Anexos

Frequência na taxa de biomarcadores citogenéticos (‰) em células esfoliadas da mucosa oral da população adulta de Lajes Pintadas, RN/Brasil

Teste t para amostras emparelhadas (2014 – 2024).

Níveis médios e máximos de radônio indoor em Lajes Pintadas/RN e Natal/RN. Técnica utilizada emanometria passiva de gás Radônio-222, utilizando o Sistema RADELEC com detectores do tipo electret de longo período.

Estimativas dos parâmetros do modelo para anormalidades nucleares e micronúcleos.

CÓDIGO: SB0594

AUTOR: MARIA AMALIA BARBOSA DE SOUZA

COAUTOR: FÁTIMA MICKAELLY DOS SANTOS

COAUTOR: VIVIANE SOUZA DO AMARAL

COAUTOR: RODRIGO SERAFIM DE ARAUJO

ORIENTADOR: JULIO ALEJANDRO NAVONI

TÍTULO: IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO NATURAL E OCUPACIONAL EM SAÚDE: ESTUDO COMPARATIVO LONGITUDINAL EM LAJES PINTADAS/RN

Resumo

A Microrregião Borborema Potiguar, no interior do Rio Grande do Norte, apresenta alta radioatividade natural de fundo. No município de Lajes Pintadas, localizado nessa região, a exposição prolongada ao gás radônio está associada a casos de câncer de pulmão acima da média estadual, indicando a necessidade de investigar o risco socioambiental. Objetivo: Nesse contexto, o estudo teve como objetivo avaliar a percepção de risco socioambiental da comunidade local frente à exposição à radiação natural, com base em uma análise comparativa entre dados coletados nos anos de 2014 e 2024. Metodologia: Como procedimento metodológico, aplicou-se um questionário socioambiental a 90 indivíduos pertencentes aos mesmos núcleos familiares, permitindo aferir mudanças na compreensão do risco ao longo de uma década. Resultados e Discussão: Os dados mostraram que escolaridade, ocupação, acesso à informação e histórico de saúde familiar influenciam a percepção dos riscos ambientais. Comparando os períodos, houve avanços na identificação das fontes de radiação, no reconhecimento de seus impactos e na busca por esclarecimentos. Ainda assim, persistem desigualdades no nível de informação entre grupos da comunidade. Conclusão: Conclui-se que, embora parte da população demonstre preocupação com as questões ambientais, ainda existem lacunas de conhecimento, reforçando a necessidade de ampliar ações educativas e estratégias de sensibilização voltadas à radioatividade natural e seus impactos à saúde.

Palavras-chave: Exposição Crônica. Radônio. Neoplasias. Risco Ambiental. Educação.

TITLE: IMPACTS OF NATURAL AND OCCUPATIONAL EXPOSURE ON HEALTH:
A LONGITUDINAL COMPARATIVE STUDY ON LAJES PINTADAS/RN

Abstract

The Borborema Potiguar Microregion, in the interior of Rio Grande do Norte, has high natural background radioactivity. In the municipality of Lajes Pintadas, located in this region,

prolonged exposure to radon gas is associated with lung cancer cases above the state average, indicating the need to investigate socio-environmental risk. Objective: In this context, the study aimed to assess the local community's perception of socio-environmental risk due to exposure to natural radiation, based on a comparative analysis of data collected in 2014 and 2024. Methodology: As a methodological procedure, a socio-environmental questionnaire was administered to 90 individuals belonging to the same households, allowing us to assess changes in risk understanding over a decade. Results and Discussion: The data showed that education, occupation, access to information, and family health history influence the perception of environmental risks. Comparing the periods, there was progress in identifying radiation sources, recognizing their impacts, and seeking clarification. Even so, inequalities in the level of information among community groups persist. Conclusion: Although part of the population demonstrates concern about environmental issues, knowledge gaps remain, reinforcing the need to expand educational initiatives and awareness-raising strategies focused on natural radioactivity and its health impacts.

Keywords: Chronic Exposure. Radon. Neoplasms. Environmental risk. Education.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A exposição humana à radioatividade natural constitui uma preocupação crescente no campo da saúde pública, sobretudo em áreas cujas formações geológicas favorecem a liberação de radionuclídeos. Um exemplo notável no contexto brasileiro é a Província Pegmatítica da Borborema, situada no Nordeste do país, onde se encontram rochas ricas em urânio (^{238}U). O decaimento natural desse elemento dá origem ao gás radônio (^{222}Rn), um composto radioativo, incolor e inodoro, que se dispersa facilmente no ambiente. Uma vez inalado, o radônio se deposita nos pulmões e continua seu processo de decaimento, emitindo radiações alfa, beta e gama, até atingir uma forma estável (^{206}Pb). Essa emissão contínua de energia ionizante é sabidamente capaz de provocar alterações celulares e genéticas, sendo reconhecida como fator de risco para o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o câncer (Chaudhry, 2008; Dantas et al., 2017; Manoj et al., 2020; Zlobina et al., 2022; Vargas et al., 2023).

Diante desse cenário, torna-se imprescindível compreender como as populações que habitam regiões com Alta Radiação Natural de Fundo (ARNF) percebem os riscos associados à exposição ambiental. A avaliação da percepção de risco configura-se como uma ferramenta valiosa para interpretar a forma como os indivíduos reconhecem, internalizam e respondem aos perigos ambientais. Trata-se de um processo fortemente influenciado por aspectos socioculturais, econômicos, históricos e educacionais, sendo, portanto, essencial para a construção de estratégias eficazes de intervenção e comunicação em saúde ambiental (Giulio et al., 2015).

Autores como Danielsen et al. (2008) e Giulio et al. (2015) reforçam que a percepção de risco contribui para superar limitações das análises estritamente técnicas, ao incorporar os saberes locais e as experiências subjetivas da população. Quando integrada a estudos ambientais e biológicos, essa abordagem amplia o diagnóstico das vulnerabilidades sociais e potencializa o desenvolvimento de políticas públicas mais efetivas e contextualizadas. Sua relevância é ainda mais evidente em contextos de baixa escolaridade e limitado acesso à informação, nos quais os riscos ambientais podem ser naturalizados ou ignorados.

Nesse contexto, o município de Lajes Pintadas, localizado no interior do Rio Grande do Norte e inserido na Microrregião Borborema Potiguar, representa um espaço privilegiado para investigar como a população local percebe tais riscos. Na cidade, entre 2009 e 2023, pesquisas conduzidas por Marcon et al. (2017), Santos, Navoni e Amaral (2018), Martinelli et al. (2023) e Xavier, Navoni e Amaral (2023) identificaram concentrações elevadas de radônio nas residências, com valores alcançando 2.893 Bq/m^3 , níveis significativamente superiores ao limite de 100 Bq/m^3 preconizado pela OMS. Apesar desses resultados, os autores ponderam que ainda há lacunas nas informações científicas sobre os riscos dessa exposição para a saúde humana, especialmente no que diz respeito aos efeitos crônicos da radioatividade natural.

Frente ao exposto, este artigo objetivou analisar a percepção de risco socioambiental frente à exposição à radioatividade natural, com base em dados coletados em dois períodos temporais distintos, 2014 e 2024. Através desse objetivo, buscou-se identificar e discutir os fatores que influenciam essa percepção, como: mudanças nos níveis de compreensão, atitudes e preocupações da comunidade ao longo do tempo, bem como promover ações socioeducativas e formativas em saúde ambiental para comunidade participante, em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, 4 e 17 da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas.

Metodologia

2. MÉTODOS

2.1. Caracterização metodológica, área de estudo e aspectos éticos

O presente estudo utilizou a mesma base populacional e o cálculo amostral adotados em uma pesquisa anterior, realizada em 2014, com moradores da zona urbana de Lajes Pintadas/RN — município caracterizado por elevados níveis de radiação natural de fundo (Xavier, Navoni e Amaral, 2023). Na etapa atual, conduzida em 2024, assegurou-se potência estatística mínima de 80%, com amostragem probabilística por conveniência, visando uma amostra igual ou superior à do estudo original ($n = 90$).

Integraram o estudo indivíduos brasileiros, residentes em Lajes Pintadas/RN, com 18 anos ou mais, que participaram da coleta de 2014. Essa delimitação visou garantir homogeneidade ambiental e socioeconômica, minimizando vieses de seleção. Excluíram-se sujeitos que não atenderam aos critérios ou que recusaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o de Assentimento.

Tratando-se de uma análise comparativa entre dois momentos (2014 e 2024), o delineamento adotado foi o de estudo transversal com base temporal e abordagem observacional de natureza descritiva. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFRN, conforme Resolução nº 466/12 do CNS, sob o CAAE: 20368713.8.0000.5537. Para a organização e interpretação dos resultados, empregaram-se cálculos de médias e medianas, os quais foram sistematizados em tabelas elaboradas no Microsoft Excel, possibilitando maior clareza na apresentação e análise dos dados.

2.2. Perfil da população e análise dos riscos de exposição

Seguindo o modelo recomendado pela International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICCPMC, 1988), a investigação da percepção de risco da população frente à exposição à radioatividade natural foi conduzida por meio da aplicação de um questionário socioambiental estruturado, previamente traduzido e uniformizado.

O instrumento é composto por 70 questões, incluindo perguntas de natureza aberta e fechada. Com uma organização estabelecida em blocos temáticos, buscou-se investigar aspectos associados a caracterização sociodemográfica (como idade, escolaridade, ocupação e composição familiar), infraestrutura e condições habitacionais (materiais de construção, tipo de moradia, acesso a saneamento básico), estilos de vida (hábitos de saúde, como prática de atividade física, consumo de álcool e tabaco) e histórico de saúde dos participantes (presença de doenças como câncer, malformações ou abortos espontâneos na família).

Adicionalmente, o questionário incluía questões voltadas especificamente à percepção ambiental e avaliação subjetiva dos riscos inerentes à radioatividade natural, como: grau de preocupação com o meio ambiente, conhecimento sobre contaminações ambientais na região, percepção sobre qualidade ambiental da área onde residem e entendimento sobre os possíveis impactos da radiação natural na saúde humana.

A aquisição dos dados deu-se em contexto presencial, por intermédio de pesquisadores rigorosamente capacitados, assegurando a aplicação padronizada de questionários estruturados. Esse procedimento visou não apenas à uniformidade na captação das respostas, mas também à mitigação de vieses exógenos, conferindo maior fidedignidade ao processo.

Nesse sentido, o propósito primordial dessa etapa foi a elucidação de padrões subjacentes e a comparação temporal entre os dois períodos investigados. A análise qualitativa, por sua vez, foi empreendida em estrita observância aos preceitos da Análise de Conteúdo de Laurence Bardin (2016), percorrendo as intrínsecas fases de pré-análise, exploração aprofundada do material e tratamento dos resultados, culminando na sistemática categorização e na perspicaz interpretação dos temas emergentes.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O questionário socioambiental utilizado neste estudo revelou-se uma ferramenta de fácil aplicação e entendimento, permitindo a descrição das condições pessoais e profissionais dos participantes, além da análise de suas percepções e avaliações sobre os riscos ambientais aos quais estão submetidos. A organização dessas informações possibilitou a construção de uma visão clara da percepção de risco na comunidade urbana de Lajes Pintadas, auxiliando na compreensão das relações entre os indivíduos e seu entorno. Tal percepção é fortemente

influenciada por fatores socioeconômicos e culturais, constituindo-se, assim, como um elemento fundamental para identificar vulnerabilidades socioambientais e para desenvolver políticas e ações preventivas.

O estudo contou com a participação de 90 moradores da área urbana de Lajes Pintadas, cujos perfis socioambientais estão detalhados na (Tabela 1). Entre os participantes, observou-se uma predominância do sexo feminino, com uma proporção cerca de duas vezes maior em relação ao sexo masculino. A amostra abrangeu todas as faixas etárias, com idades variando entre 9 e 81 anos. Adultos constituíram o grupo majoritário, representando aproximadamente 61% dos pesquisados, seguidos pelos idosos, que somaram cerca de 32%. Já as crianças formaram a menor parcela, correspondendo a pouco mais de 3% do total analisado.

A análise da distribuição da naturalidade dos participantes evidenciou que aproximadamente um terço deles nasceu no município de Lajes Pintadas/RN (32,2%), enquanto cerca de 18,8% informaram ser naturais de Santa Cruz/RN. Entre os indivíduos nascidos em Lajes Pintadas, observou-se um maior contingente de idosos. Tal predominância pode estar relacionada à ausência, durante o período de nascimento desses participantes, de infraestrutura hospitalar local voltada à assistência obstétrica, o que, por sua vez, resultava na realização frequente de partos domiciliares conduzidos por parteiras (Barros, 2023). Em contraste, entre os participantes mais jovens, a maior proporção de registros de naturalidade em Santa Cruz/RN pode ser atribuída à consolidação do município como referência regional em serviços de obstetrícia. Destaca-se, nesse contexto, o Hospital Universitário Ana Bezerra (HUAB), que desempenha um papel central no atendimento da microrregião da Borborema Potiguar. Por fim, os restantes 40% dos entrevistados declararam naturalidade em outros municípios, conforme detalhado na (Tabela 1).

No tocante ao perfil educacional dos indivíduos analisados, verificou-se uma marcante heterogeneidade nos níveis de instrução, particularmente com uma alta proporção de participantes que não completaram o ensino fundamental, correspondendo a 33,3%. Entre aqueles que cursaram essa etapa educacional, apenas 16,6% afirmaram tê-la concluído. No que se refere ao ensino médio, os dados revelam que 7,7% dos entrevistados não o finalizaram, ao passo que outros 16,6% indicaram ter atingido sua conclusão. O ensino superior demonstrou a menor representatividade dentro do recorte analisado: 7,7% relataram formação incompleta, 10% declararam graduação concluída e somente 5,5% possuíam algum nível de pós-graduação. Adicionalmente, foi registrada a presença de 4,4% de indivíduos que se autodeterminam como analfabetos, o que salienta a continuidade de obstáculos educacionais significativos na realidade local examinada (Tabela 1).

Os dados levantados evidenciam fragilidades estruturais no panorama educacional de Lajes Pintadas, onde tanto a disponibilidade quanto o acesso ao ensino encontram-se limitados. A significativa proporção de pessoas que não concluíram o ensino fundamental, acompanhada pela prevalência de analfabetismo, revela barreiras de origem socioeconômica e histórica (Senkevics; Carvalho, 2020). A reduzida adesão ao ensino superior agrava esse cenário, indicando desafios adicionais ligados às dificuldades de ingresso e permanência nesse nível de formação. De acordo com Senkevics, Carvalhaes e Ribeiro (2022), o deslocamento para centros urbanos maiores, muitas vezes indispensável para a continuidade educacional, configura um entrave relevante, especialmente quando combinado com restrições financeiras, tornando a jornada universitária inacessível para uma parcela significativa da população local.

A etapa seguinte do questionário analisou as percepções dos respondentes em relação ao ambiente em que estão inseridos. Os resultados indicaram que 80% dos participantes demonstraram preocupação ativa com problemas ambientais, enquanto 3,3% reportaram preocupação ocasional e 13,3% expressaram total desinteresse (Tabela 1). Conforme argumentado por Santos et al. (2024), essa predominância de consciência ambiental pode ser atribuída à convivência direta com os recursos naturais e ao contexto socioambiental em que estão imersos.

Ademais, é plausível considerar que as iniciativas anteriores deste grupo de pesquisa, envolvendo atividades de extensão universitária, monitoramentos sistemáticos e a coleta de dados, tenham desempenhado um papel significativo no aumento da sensibilização da comunidade, sobretudo em relação aos impactos da radioatividade natural (Araújo; Navoni; Amaral, 2023). Apesar desses avanços, a identificação de uma parcela da população com envolvimento ocasional ou ausente ressalta a permanência de assimetrias no nível de engajamento. Tal cenário reafirma a urgência no desenvolvimento de estratégias educativas mais inclusivas e na implementação de políticas públicas eficazes que promovam a conscientização e a participação ativa da sociedade nas questões ambientais locais.

Ao serem indagados sobre a percepção da qualidade ambiental em suas localidades de residência, 62,2% dos respondentes classificaram-na como satisfatória, ao passo que 32,2% apontaram aspectos negativos. Quanto ao conhecimento sobre processos de contaminação ambiental, 41,1% dos participantes relataram estar informados acerca de alguma forma de contaminação, independentemente de sua origem natural ou da influência de atividades humanas. Por outro lado, a maioria, representada por 53,3%, afirmou não possuir informações sobre a existência de tais problemas. Esse panorama evidencia uma lacuna informacional significativa, sublinhando a necessidade premente de implementar e expandir sistemas eficazes de comunicação e programas de educação ambiental, elaborados com atenção às especificidades socioambientais da região analisada (Tabela 1).

3.1 Análise comparativa do perfil socioambiental de 90 participantes acompanhados entre 2014 e 2024

Foi realizada a análise comparativa entre o perfil socioambiental, incluindo hábitos pessoais e ocupacionais, e as em 90 participantes acompanhados de 2014 a 2024. Para isso, foram considerados parâmetros intrinsecamente relacionados às alterações nucleares, de modo a possibilitar uma avaliação mais precisa ao longo da escala temporal de 10 anos (2014 – 2024).

3.1.1 Perfil socioambiental

O parâmetro inicial descrito na Tabela 2 refere-se ao tempo de residência no município de Lajes Pintadas. A análise revela uma expansão gradual das categorias temporais de permanência, atribuída à continuidade do mesmo grupo de participantes durante o período em estudo. No intervalo “tempo de residência superior a 30 anos”, nota-se aumento significativo:

em 2014, 42,2% dos entrevistados afirmaram residir na localidade há mais de três décadas, proporção que alcança 60,0% em 2024.

Esse cenário evidencia que a permanência prolongada em uma mesma região reflete vínculos socioafetivos profundos com o território, fortalecendo a análise temporal das mudanças ocorridas. Essa percepção está alinhada a Lucena e Freire (2014) e Baptista, Campos e Rigott (2017), que destacam a tendência de populações rurais, sobretudo em faixas etárias mais elevadas, de manter-se ou retornar ao local de origem. Assim, a alta porcentagem de indivíduos que residem no município durante toda a vida configura um quadro de “exposição crônica” ao ambiente, marcado por contato constante com possíveis agentes contaminantes e impactos diretos potenciais na saúde.

A variável "trabalho com substâncias químicas" apresentou mudança significativa entre 2014 e 2024. Em 2014, apenas 31,1% dos entrevistados indicaram contato ocupacional, enquanto em 2024 esse índice subiu para 46,7%. Esse crescimento pode ser explicado pela composição etária da primeira fase da pesquisa, quando muitos participantes eram crianças e adolescentes ainda fora do mercado de trabalho. Após dez anos, o envelhecimento desse grupo contribuiu para o aumento de indivíduos economicamente ativos, ampliando tanto oportunidades de emprego quanto a probabilidade de exposição química.

Essa transformação demográfica é essencial para a análise de riscos ocupacionais e seus impactos na saúde, especialmente quanto a alterações celulares e danos nucleares. Estudos como os de Fonseca, Peres e Filho (2017) e Nogueira, Szwarcwald e Damascena (2020) reforçam a importância de compreender essas dinâmicas populacionais para avaliar os desafios da saúde do trabalhador.

Quanto aos hábitos de vida, a análise das variáveis "consumo de álcool" e "tabagismo" evidenciou mudanças relevantes. Em 2014, 59,8% declararam abstinência e 23,3% uso esporádico. Já em 2024, 54,4% referiram consumo ocasional e 11,1% regular. No tabagismo, a proporção de ex-fumantes permaneceu em 23,3%, mas fumantes regulares cresceram de 4,4% em 2014 para 8,9% em 2024. Esses dados indicam crescimento no número de fumantes ativos, associado ao maior consumo de álcool, acarretando potenciais riscos à saúde, sobretudo quando somados à maior exposição ocupacional.

Estudos como os de Soares et al. (2017) indicam que a transição da adolescência para a vida adulta aumenta a suscetibilidade às influências sociais que estimulam o consumo de álcool e tabaco. Esse padrão é preocupante, pois o uso excessivo está associado, segundo Simon, Souza-Smith e Molina (2022) e Paloczi e Kim (2023), a danos celulares significativos, incluindo alterações genéticas e nucleares, com impactos negativos a médio e longo prazos.

Quanto à prática de atividade física, observou-se leve redução: de 60,0% em 2014 para 57,8% em 2024 (Tabela 2). Apesar de discreta, a queda demanda atenção, considerando as recomendações da OMS (Guthold et al., 2020; Strain et al., 2024), que sugerem ao menos 150 minutos semanais de exercícios moderados. Parte significativa da população não atinge esse mínimo, configurando fator de risco agravado pelo aumento do álcool, tabaco e exposição ocupacional.

O panorama torna-se mais preocupante com a prevalência de câncer, que dobrou no período, de 5,56% em 2014 para 11,1% em 2024 (Tabela 2). Esse aumento é ainda mais significativo considerando que Lajes Pintadas já apresentava índices elevados de neoplasias.

Dados do INCA mostram que entre 2000 e 2010 foram registrados mais de 400 novos casos em uma população de cerca de 5.000 habitantes — o maior índice percentual do estado. Entre 2011 e 2022, mais de 350 novos casos confirmaram a persistência de um problema de saúde pública grave.

O câncer, de etiologia multifatorial, pode estar ligado a processos de alteração nuclear e mutações genéticas. Inserido nesse panorama está o cenário geográfico de Lajes Pintadas, localizado em área rica em rochas com urânio, o que confere ao município níveis elevados de radiação natural, especialmente pela presença do gás radônio — elemento carcinogênico associado ao desenvolvimento de câncer, sobretudo pulmonar.

Entre outros desfechos, constatou-se aumento na prevalência de malformações morfológicas entre familiares, passando de 17,7% para 28,9%. Já os registros de aborto espontâneo oscilaram de 18,8% para 20,0%. Embora não haja consenso definitivo sobre a relação causal entre exposição radioativa e riscos reprodutivos, esses achados reforçam a urgência de investigações epidemiológicas mais abrangentes.

Por fim, analisou-se a realização de reformas residenciais e a procedência dos materiais. A composição geológica do solo de Lajes Pintadas, rico em pegmatitos com urânio, favorece a emissão de radônio em ambientes internos, aumentando o risco de exposição (Martinelli et al., 2023). Os dados mostraram aumento expressivo de residências reformadas, de 25,5% em 2014 para 61,1% em 2024. Ademais, 78,7% dos entrevistados relataram uso de materiais adquiridos localmente (Tabela 2). Esse fato pode agravar o problema, pois estudos como o de Bulut e Sahin (2024) apontam que insumos geológicos enriquecidos com radionuclídeos intensificam a concentração de radônio em interiores, sobretudo em edificações pouco ventiladas, ampliando os riscos à saúde a longo prazo.

A análise dos achados evidencia que a percepção de risco da população é um elemento central para compreender as formas de resposta frente à exposição ambiental e ocupacional. Esse entendimento possibilita identificar lacunas de conhecimento, valores culturais e obstáculos à adoção de medidas preventivas, além de subsidiar a construção de políticas públicas e estratégias de comunicação mais eficazes. Assim, ao ser incorporada ao planejamento de ações, a percepção de risco amplia a efetividade das intervenções voltadas à proteção da saúde e do meio ambiente em contextos de exposição crônica a agentes físicos, químicos ou radioativos.

3.2 Atividades educativas implementadas como intervenção local

Ao identificarmos o risco socioambiental vivenciado pela população residente no município de Lajes Pintadas/RN, em especial em razão da exposição prolongada à radioatividade natural, e reconhecendo-se a importância da educação científica na formação de sujeitos críticos, reflexivos e socialmente comprometidos, procedeu-se uma intervenção pedagógica nos pressupostos de Charlot (1999) e Okuno (2007), para os quais o ato educativo deve oferecer aos estudantes instrumentos capazes de compreender a realidade, ampliar a autonomia intelectual e fomentar a participação cidadã.

Como ação inicial, realizou-se o mini evento comunitário intitulado “Como anda a saúde ambiental da minha região?”, vinculado a um evento de extensão universitária “Saúde

Ambiental na Microrregião Borborema Potiguar: Perspectivas em Saúde, Educação e Meio Ambiente” sob o código (EV825-2022) o qual constituiu o marco mobilizador do processo, reunindo estudantes do ensino fundamental II. A exposição foi organizada em um circuito interativo, o qual foi iniciando com a aplicação de questionário prévio, seguido de uma breve palestra sobre saúde ambiental, posteriormente o fluxo foi seguido com atividades expositivas e práticas. Esse mini evento teve como objetivo abrir espaços de diálogo sobre a realidade local, incentivar o intercâmbio de saberes, além de desencadear reflexões coletivas sobre os riscos e medidas preventivas relacionados à radioatividade natural. (Araújo et al., 2023)

A partir dessa experiência, delineou-se o projeto de extensão “Radioatividade Natural na Microrregião Borborema Potiguar/RN: Integrando Universidade e Escola Pública para Promoção de uma Educação Científica”, vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e registrado sob o código PJ244-2024, consolidando as diretrizes para o desenvolvimento de ações articuladas.

Reconhecendo-se que a escola constitui a base estruturante de uma comunidade, estruturou-se, como desdobramento, uma sequência didática “Saúde Ambiental: o que é isso?”, voltada a turmas do ensino fundamental II, com vistas a aprofundar os conteúdos discutidos no evento inicial. Tal proposição justifica-se, em conformidade com Silva et al. (2013), Martins (2019), e Araújo, Navoni, Amaral (2024) na medida em que práticas educativas reflexivas, voltadas à extensão e à saúde ambiental, potencializam a formação de uma consciência crítica e participativa.

No âmbito de sua execução, foram concebidos e aplicados materiais de caráter didático e informativo, organizados em etapas metodológicas articuladas, conforme defende Zabala (1998), contemplando estudantes, docentes, núcleos familiares e a comunidade do entorno. Todas as atividades foram desenvolvidas de forma integrada no ambiente escolar e em espaços laboratoriais disponibilizados pela universidade pública, possibilitando o contato direto dos alunos com o tema de modo acessível, reflexivo e contextualizado (Figura 1).

Ao término da sequência didática, procedeu-se à realização de uma dinâmica de revisão, com o propósito de promover o resgate, a sistematização e a consolidação dos conhecimentos trabalhados ao longo das diferentes etapas. Como resultado, observou-se um retorno positivo por parte dos estudantes, que evidenciaram domínio conceitual e compreensão satisfatória acerca dos conteúdos abordados, corroborando, assim, a efetividade das estratégias aplicadas e a relevância da articulação entre universidade, escola e comunidade, tal como ilustrado pelas imagens apresentadas.

Conclusão

4. CONCLUSÃO

A análise da percepção de risco realizada com os moradores de Lajes Pintadas/RN evidenciou a complexidade das relações estabelecidas entre indivíduos, ambiente e exposição à radioatividade natural. Os dados demonstraram que, apesar de residirem em uma área geologicamente reconhecida por altos níveis de radiação natural de fundo, muitos participantes ainda apresentam compreensão limitada sobre os riscos associados, revelando lacunas importantes no processo de conscientização ambiental.

Essa realidade confirma a importância da percepção de risco como ferramenta essencial para o diagnóstico de vulnerabilidades socioambientais, ao permitir a identificação não apenas de fatores objetivos, mas também de dimensões subjetivas que influenciam comportamentos preventivos. Ao considerar elementos como escolaridade, acesso à informação, condições de moradia, hábitos de vida e histórico familiar, foi possível compreender como múltiplos determinantes sociais moldam o modo como a população julga e responde aos perigos do ambiente em que vive.

Além disso, a comparação dos dados coletados entre 2014 e 2024 trouxe à tona mudanças significativas, ainda que pontuais, no nível de consciência ambiental da população, sugerindo que ações de extensão universitária, intervenções educativas e a própria presença continuada da pesquisa na comunidade podem ter contribuído para ampliar o conhecimento local sobre o tema. Ainda assim, os resultados apontam para a necessidade de expandir estratégias de educação ambiental que sejam contínuas, contextualizadas e culturalmente sensíveis.

Dessa forma, este artigo conclui que compreender a percepção de risco da população é uma etapa fundamental para a construção de políticas públicas eficazes, que integrem aspectos técnicos e sociais de forma equilibrada. A promoção do diálogo entre ciência e sociedade, aliada ao investimento em práticas educativas permanentes, configura-se como caminho estratégico para o enfrentamento das desigualdades informacionais e para a construção de uma cultura de prevenção em saúde ambiental.

Referências

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, R. S.; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S. Saúde ambiental in loco: estratégias iniciais para uma educação científica. **Revista Conexão UEPG**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5212/Rev.Conexao.v.19.22235.045>. Acesso em: 02 ago. 2025.

ARAÚJO, R. S. de; NAVONI, J. A. .; AMARAL, V. S. do . Desafios e perspectivas para a temática saúde ambiental na educação básica: analisando a bncc. **Vivências**, [S. l.], v. 20, n. 41, p. 177–197, 2024. DOI: 10.31512/vivencias.v20i41.1217. Disponível em: <http://revistas.uri.br/index.php/vivencias/article/view/1217>. Acesso em: 02 ago. 2025.

BAPTISTA, E. A.; CAMPOS, J.; RIGOTTI, J. I. R. Migração de retorno no Brasil. **Mercator**(Fortaleza), v. 16, p. e16010, maio. 2017.

BARDIN, Laurence. Análise de conteúdo. Tradução de Luís Antero Reto e Augusto Pinheiro. São Paulo: Edições 70, 2016.

BARROS, A. F. D. Fatores que influenciam na escolha do parto: revisão integrativa da literatura. **Publicações**, 2023.

BULUT, H. A.; ŞAHİN, R. Radon, Concrete, Buildings and Human Health—A Review Study. **Buildings**, v. 14, n. 2, p. 510, 2024.

CHARLOT, B. Educação e barbárie. São Paulo: **Editora Autores Associados**, 1999.

CHAUDHRY, M. A. Analysis of Gene Expression in Normal and Cancer cells exposed to gamma-radiation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2008.

DANIELSEN, F. et al. Community Monitoring of Natural Resource Systems and the Environment. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 47, p. 637–670, 2022.

DANTAS, R. da C. et al. Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian Semiarid Region. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 275–282, 2017.

DE LUCENA, M. M. A.; FREIRE, E. M. X. Percepção ambiental e usos da fauna de uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) no semiárido brasileiro. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 335–341, 2012.

FONSECA, S. C.; PERES, J. L. DE S.; FILHO, E. O. M. Avaliação do risco de mutagenicidade e anormalidades nucleares decorrentes da exposição ao benzeno e seus derivados entre manipuladores de solventes orgânicos em Imperatriz – MA, Brasil. In: **Anais da mostra de pesquisa em ciência e tecnologia**, Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/mpct2017/47609-avaliacao-do-risco-de-mutagenicidade-e-anormalidades-nucleares-decorrentes-da-exposicao-ao-benzeno-e-seus-derivado>. Acesso em: 13 fev. 2025.

FOSTER, W. G. et al. Human exposure to environmental contaminants and congenital anomalies: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 59–84, 2017.

GIULIO, G. M. D. et al. Percepção de risco: um campo de interesse para a interface ambiente, saúde e sustentabilidade. **Saúde e Sociedade**, v. 24, p. 1217–1231, 2015.

GUTHOLD, R. et al. Global trends in insufficient physical activity among adolescents: a pooled analysis of 298 population-based surveys with 1·6 million participants. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 4, n. 1, p. 23–35, 2020.

HENYOH, A. M. S. et al. Radon exposure and potential health effects other than lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, v. 12, 25 2024.

KEITH, S. et al. HEALTH EFFECTS. Em: Toxicological Profile for Radon. [s.l.] **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US)**, 2012.

MANOJ, S.; THIRUMURUGAN, M.; ELANGO, L. Determination of distribution coefficient of uranium from physical and chemical properties of soil. **Chemosphere**, v. 244, p. 125411, 2020.

MARCON, A. E. et al. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. **Chemosphere**, v. 167, p. 36–43, 2017.

MARTINELLI, S. et al. Analysis of the cancer occurrence related to natural radioactivity in the Rio Grande do Norte State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research International**, 2023.

MARTINS, J. L. C. Radioatividade: do bem ou do mal? **Revista Insignare Scientia– RIS**, v. 2, n. 3, 2019.

NOGUEIRA, F. DE A. M.; SZWARCOWALD, C. L.; DAMACENA, G. N. Exposição a agrotóxicos e agravos à saúde em trabalhadores agrícolas: o que revela a literatura? **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 45, p. e36, nov. 2020.

OKUNO, E. Radiação: efeitos, riscos e benefícios. São Paulo: Harbra, 2007

PALOCZI, J.; KIM, Y. Editorial: Biophysics approaches to investigate multi-organ alcohol-induced damage. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, p. 1346518, dez. 2023.

RUANO-RAVINA, A. et al. An overview on the relationship between residential radon and lung cancer: what we know and future research. **Clinical and Translational Oncology**, v. 25, n. 12, p. 3357–3368, 2023.

SANTOS, A. N. DOS et al. Desafios e progressos: o impacto das políticas ambientais contemporâneas na conservação dos recursos naturais. **Revista Políticas Públicas & Cidades**, v. 13, n. 2, p. e799–e799, 2024.

SANTOS, M. N. R.; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S. Avaliação da percepção do risco em uma população do semiárido exposta a tóxicos ambientais. **Educação Ambiental em Ação**, Novo Hamburgo, v. 16, n. 62, 2018.

SENKEVICS, A. S.; CARVALHAES, F.; RIBEIRO, C. A. C. Mérito ou berço? origem social e desempenho no acesso ao ensino superior. **Cadernos de Pesquisa**, v. 52, p. e09528, 2022.

SENKEVICS, A. S.; CARVALHO, M. P. D. Novas e velhas barreiras à escolarização da juventude. **Estudos Avançados**, v. 34, p. 333–352, 2020.

SILVA, F.C.V.; CAMPOS, A.F.; ALMEIDA, M.A.V. Alguns aspectos do ensino e aprendizagem de radioatividade em periódicos nacionais e internacionais. Amazônia: **Revista de Educação em Ciências e Matemáticas**, 2013.

SIMON, L.; SOUZA-SMITH, F. M.; MOLINA, P. E. Alcohol-Associated Tissue Injury: Current Views on Pathophysiological Mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 84, p. 87–112, 2022.

SOARES, F. DE J. et al. Análise dos Motivos dos Jovens e Adultos consumirem Álcool. ID on line. **Revista de psicologia**, v. 11, n. 35, p. 554–566, 2017.

STRAIN, T. et al. National, regional, and global trends in insufficient physical activity in adults from 2000 to 2022: a pooled analysis of 507 population-based surveys with 5·7 million participants. **The Lancet Global Health**, v. 12, n. 8, p. e1232–e1243, 2024.

VALERIUS, M. B.; CARVALHO, E. H. DE. Proposta metodológica para a análise do risco socioambiental de barragens de rejeito de mineração do estado de Goiás (Brasil). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 4, nov. 2020.

VARGAS, V. M. F. et al. A comprehensive overview of genotoxicity and mutagenicity associated with outdoor air pollution exposure in Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, v. 26, n. 3, p. 172–199, 2023.

XAVIER, L. A. C.; NAVONI, J. A.; SOUZA DO AMARAL, V. Oxidative genomic damage in humans exposed to high indoor radon levels in Northeast Brazil. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 889, p. 503652, 2023.

ZABALA, A. A Prática Educativa: como ensinar. Porto Alegre, RS: ARTMED. 1998.

ZLOBINA, A. et al. Impact of Environmental Radiation on the Incidence of Cancer and Birth Defects in Regions with High Natural Radioactivity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 14, p. 8643, 2022.

Anexos

TABELA 1

TABELA 2

CONTINUAÇÃO DA TABELA 2

FIGURA 1

CONTINUAÇÃO DA FIGURA 1

CÓDIGO: SB0597

AUTOR: VINICIUS DE LIMA SILVA

ORIENTADOR: LEONARDO CAPISTRANO FERREIRA

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM INDIVÍDUOS COM LIPODISTROFIA GENERALIZADA CONGÊNITA

Resumo

A Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip (LGC) é uma rara desordem autossômica recessiva caracterizada pela ausência de tecido adiposo funcional, levando a graves complicações metabólicas como resistência à insulina e diabetes mellitus precoce. A LGC tipo 2 (LGC-2), causada por mutações no gene BSCL2, afeta a proteína seipina, essencial para a adipogênese e homeostase lipídica. A seipina, localizada no retículo endoplasmático (RE), é crucial para a formação de gotas lipídicas e possui uma função neural importante. Mutações neste gene comprometem a função da seipina, resultando em um fluxo deficiente de cálcio (Ca^{2+}) do RE para as mitocôndrias. Essa disfunção afeta diretamente a atividade mitocondrial, uma vez que enzimas do Ciclo de Krebs, como a isocitrato desidrogenase, são dependentes de Ca^{2+} . Consequentemente, há uma redução na produção de metabólitos energéticos e ATP, o que contribui para a fisiopatologia da síndrome. Este estudo explora a conexão entre a seipina, a regulação do cálcio e a bioenergética mitocondrial, destacando como a falha nesse mecanismo agrava o descontrole metabólico observado em pacientes com LGC-2.

Palavras-chave: Lipodistrofia Congênita; BSCL2; Seipina; Mitocôndria; Cálcio

TITLE: EVALUATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTION IN INDIVIDUALS WITH CONGENITAL GENERALIZED LIPODYSTROPHY

Abstract

Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy (CGL) is a rare autosomal recessive disorder characterized by the absence of functional adipose tissue, leading to severe metabolic complications such as insulin resistance and early-onset diabetes mellitus. CGL type 2 (CGL2), caused by mutations in the BSCL2 gene, affects the seipin protein, which is essential for adipogenesis and lipid homeostasis. Seipin, located in the endoplasmic reticulum (ER), is crucial for lipid droplet formation and also has an important neural function. Mutations in this gene impair seipin's function, resulting in a deficient calcium (Ca^{2+}) flux from the ER to the mitochondria. This dysfunction directly impacts mitochondrial activity, as key Krebs Cycle enzymes, like isocitrate dehydrogenase, are Ca^{2+} -dependent. Consequently, there is a reduction in the production of energy metabolites and ATP, which contributes to the syndrome's pathophysiology. This study explores the connection between seipin, calcium regulation, and mitochondrial bioenergetics, highlighting how a failure in this mechanism exacerbates the metabolic dysregulation observed in patients with CGL2.

Keywords: Congenital Lipodystrophy; BSCL2; Seipin; Mitochondria; Calcium

Introdução

A lipodistrofia congênita de Berardinelli-Seip, também conhecida como Lipodistrofia Generalizada Congênita (LGC), é caracterizada pela ausência completa ou parcial de tecido adiposo, devido à ausência de adipócitos funcionais, resultando num descontrole metabólico de lipídios e carboidratos (Lima & Campos, 2020). Os indivíduos afetados armazenam gordura em outros tecidos, incluindo fígado e músculo, podendo desenvolver resistência à insulina, na maioria dos casos, e, conseqüentemente, o aparecimento de diabetes mellitus desde muito cedo. Esse resultado é devido à deficiência da adiponectina, molécula secretada pelo tecido adiposo, com função de diminuir o conteúdo de triacilgliceróis no músculo esquelético e no fígado, promovendo a sensibilidade à insulina (Lima & Campos et al., 2020). Ademais, outras conseqüências são derivadas dessa síndrome, como hepatomegalia e hipertrofia muscular, além de alterações cardiovasculares e no desenvolvimento do sistema neuropsicomotor (Zhou et al., 2015).

A Lipodistrofia Generalizada Congênita tipo 2 (LGC-2), é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene BSCL2, região de locus gênico do cromossomo 11q13 (Van Maldergem et al., 2016; Cartwright & Goodman, 2012). Tal gene é responsável pela codificação da proteína seipina. Na LGC-1, o gene defeituoso, AGPAT2, codifica uma enzima envolvida na síntese do ácido fosfatídico, um importante precursor dos glicérolídeos. A prevalência mundial da LGC é estimada em aproximadamente 1 caso para 10 milhões de pessoas (Lima & Campos, 2020), enquanto que no RN a estimativa é que a prevalência seja de 32,3 casos por 1.000.000 habitantes (Lima & Campos et al., 2020).

Na LGC-2, a mutação do gene altera a função da proteína seipina, uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático que se concentra nas junções com as gotículas lipídicas do citoplasma (Zhou et al., 2015; Ding et al., 2018). A seipina possui várias isoformas, mas ambas partilham de uma região central com mais ou menos 230 aminoácidos, conservados na estrutura secundária, e dois domínios transmembranares (Cartwright & Goodman, 2012). Além disso, o gene BSCL2 é expresso em altos níveis no cérebro e nos testículos, em humanos, e, segundo estudos, a deficiência da seipina não afeta a fertilidade, todavia, por outro lado, no tecido nervoso, a sua falta causa retardo mental. Em relação à função da seipina, ela é parcialmente conhecida, sendo importante para a adipogênese, bem como para a homeostase lipídica, além de contribuir para a formação das gotas lipídicas e tem uma funcionalidade neural potencial (Cartwright & Goodman et al., 2012).

A mutação no gene BSCL2 compromete a função da proteína seipina, resultando na fragilização do fluxo de cálcio do retículo endoplasmático (RE) para a mitocôndria e tendo como conseqüência, a diminuição da atividade desta organela. Essa disfunção se relaciona com a interação entre a seipina, responsável pela transferência de cálcio e regulação do armazenamento lipídico, e o RE, com participação da proteína SERCA (Ding et al., 2018). Em indivíduos afetados pela LCG-2, a disfunção da seipina afeta a função mitocondrial, resultando na redução de metabólitos do Ciclo de Krebs, dado que algumas enzimas dessa via, como a isocitrato desidrogenase, são dependentes de Ca^{2+} como cofator (Ding et al.,

2018). A diminuição desses metabólitos está diretamente ligada à produção reduzida de ATP. O papel crucial do cálcio no RE e na mitocôndria para a homeostase lipídica é evidente na relação entre a seipina, o RE e a mitocôndria, que desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio lipídico celular.

Metodologia

1. Desenho do Estudo e Coleta de Amostras

O projeto será submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa. Após a aprovação, serão recrutados indivíduos com Lipodistrofia Generalizada Congênita tipo 1 (LGC-1, n=5), tipo 2 (LGC-2, n=5), heterozigotos (n=5) e um grupo controle de indivíduos saudáveis (n=15). De cada participante, serão coletados 10 ml de sangue periférico por venopunção.

2. Processamento das Amostras e Análise da Função Mitocondrial em PBMCs

- As Células Mononucleadas do Sangue Periférico (PBMCs) serão isoladas do sangue total utilizando a técnica de gradiente de densidade com Ficoll. Após o isolamento, as células serão contadas e a sua concentração ajustada para as análises subsequentes. A avaliação da função e saúde mitocondrial será realizada por citometria de fluxo, utilizando o citômetro FACS Canto II (BD). Para isso, as PBMCs serão marcadas com um painel de sondas fluorogênicas específicas para diferentes parâmetros mitocondriais.
- Massa e Distribuição Mitocondrial: Serão utilizadas as sondas da família MitoTracker (ThermoFisher), corantes que se acumulam seletivamente em mitocôndrias. Esta marcação permitirá caracterizar o padrão de distribuição e a massa mitocondrial total nas células dos diferentes grupos de estudo.
- Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): A integridade da membrana mitocondrial será avaliada com dois corantes catiônicos. O JC-1 (Thermo Fisher), um marcador sensível ao potencial de membrana, será usado para quantificar a polarização mitocondrial. Complementarmente, a Rhodamine 125 (Thermo Fisher), que é absorvida por mitocôndrias ativas, será empregada para avaliar o potencial de membrana e o padrão de distribuição de mitocôndrias funcionalmente ativas.
- Estresse Oxidativo (Produção de Superóxido): A quantificação de superóxido mitocondrial será realizada com a sonda MitoSox (Thermo Fisher). Este corante fluorogênico é oxidado especificamente pelo superóxido na mitocôndria, permitindo a medição do estresse oxidativo nesta organela. A sonda DCFDA também será aplicada para avaliar os níveis gerais de espécies reativas de oxigênio.

3. Isolamento e Caracterização de Vesículas Extracelulares (VEs)

As VEs serão isoladas do plasma obtido das amostras de sangue. O protocolo consistirá em múltiplas etapas de centrifugação diferencial em baixa velocidade para remover células e debris, seguidas por ultracentrifugação para sedimentar as vesículas. O perfil de tamanho das populações vesiculares isoladas (exossomos e microvesículas) será caracterizado pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

4. Extração e Quantificação de DNA Mitocondrial (mtDNA) em VEs

O DNA total será extraído das VEs isoladas. O protocolo de extração incluirá a lise das vesículas com Proteinase K e tampão de lise, seguida de precipitação com etanol e purificação do DNA em colunas de membrana de sílica. A quantificação do DNA mitocondrial será realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com o reagente

SYBR Green. Serão utilizados primers específicos para um gene mitocondrial (MT-CYB) e para um gene de referência nuclear (PPIA), permitindo a análise comparativa dos níveis de mtDNA entre os grupos.

Resultados e Discussões

O presente projeto encontra-se em sua fase inicial, dedicada à otimização e padronização dos protocolos experimentais que constituem a base para as futuras investigações. Nesta etapa, todos os ensaios foram conduzidos exclusivamente com amostras de indivíduos controle saudáveis, visando estabelecer metodologias robustas, reprodutíveis e confiáveis antes da aplicação em amostras de pacientes, que ocorrerá somente após a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Os resultados aqui apresentados referem-se, portanto, ao sucesso da validação técnica das abordagens propostas.

1. Otimização da Análise da Função Mitocondrial em Células Mononucleadas (PBMCs)

A primeira etapa do trabalho consistiu na padronização de um protocolo para avaliação da saúde mitocondrial em Células Mononucleadas do Sangue Periférico (PBMCs). O protocolo de isolamento celular por gradiente de densidade de Ficoll demonstrou ser altamente eficaz, resultando em uma população de PBMCs com alta viabilidade e pureza satisfatória para as análises subsequentes.

Nos testes preliminares, avaliamos um painel de sondas mitocondriais por citometria de fluxo. A aplicação das sondas MitoTracker, JC-1, Rhodamine 123, MitoSox e DCFDA em PBMCs de controles saudáveis foi bem-sucedida. Os resultados indicaram que os corantes foram eficazes para a marcação das mitocôndrias, permitindo a distinção de sinais de fluorescência consistentes e a caracterização de diferentes parâmetros, como massa mitocondrial, potencial de membrana e produção de espécies reativas de oxigênio. A padronização das concentrações ideais e dos tempos de incubação para cada sonda foi um passo crucial, assegurando que o protocolo é sensível o suficiente para detectar variações fisiológicas.

A validação deste protocolo multiparamétrico em PBMCs é de fundamental importância, pois estabelece uma base sólida e confiável para a futura análise comparativa entre os grupos. A capacidade de avaliar simultaneamente múltiplos aspectos da função mitocondrial em células circulantes acessíveis representa uma abordagem poderosa e minimamente invasiva para investigar a bioenergética celular sistêmica.

2. Padronização do Isolamento e Caracterização de Vesículas Extracelulares (VEs)

Em paralelo, uma nova frente de investigação foi estabelecida com foco em vesículas extracelulares (VEs) como potenciais carreadoras de componentes mitocondriais. Desenvolvemos e testamos um protocolo de isolamento de VEs do plasma baseado em múltiplas etapas de centrifugação e ultracentrifugação. Para validar a eficácia deste protocolo, as amostras de VEs isoladas de indivíduos controle foram caracterizadas quanto ao seu perfil de tamanho pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

Os resultados da análise por DLS revelaram um perfil heterogêneo de partículas, o que é esperado para amostras biológicas de plasma. Em análises representativas (amostras A1 e A2), observou-se um diâmetro hidrodinâmico médio de 366,6 nm e 279,1 nm,

respectivamente, com índices de polidispersão (PDI) moderados (25,5% e 23,6%). A análise da distribuição de intensidade foi particularmente informativa, revelando que, em ambas as amostras, a população de partículas mais abundante (aproximadamente 77% da área total) estava concentrada em uma faixa de diâmetro entre 90 e 100 nm.

Este achado é de grande relevância, pois essa faixa de tamanho é compatível com a de exossomos e pequenas microvesículas, conforme amplamente descrito na literatura. A presença de picos secundários com diâmetros maiores pode corresponder a microvesículas de maior porte ou a formação de agregados. Portanto, os dados de DLS sugerem fortemente que o protocolo de ultracentrifugação implementado é eficaz na recuperação de uma população mista de VEs, com enriquecimento da fração de menor tamanho.

3. Evidência de Conteúdo Mitocondrial em Vesículas Extracelulares Isoladas

Para confirmar que as VEs isoladas poderiam, de fato, servir como um compartimento de análise da saúde mitocondrial, investigamos a presença de DNA mitocondrial (mtDNA) em seu interior. Para isso, otimizamos um protocolo de extração de DNA a partir do precipitado de VEs e subsequente quantificação por qPCR.

Os resultados preliminares foram conclusivos: as amostras correspondentes ao precipitado de VEs, obtido após ultracentrifugação, continham uma quantidade significativamente maior de mtDNA (detectado pelo gene mitocondrial MT-CYB) em comparação com o sobrenadante. Este resultado é uma prova de conceito crucial para a nossa hipótese, confirmando que o protocolo isola vesículas que são, de fato, carreadoras de material genético mitocondrial.

A discussão em torno deste achado é promissora. A presença de mtDNA em VEs circulantes está alinhada com evidências crescentes na literatura que descrevem a transferência intercelular de mitocôndrias ou de seus componentes. A validação de que nosso protocolo isola eficientemente essas VEs contendo mtDNA abre a perspectiva de utilizar este material como um biomarcador plasmático. A quantificação de mtDNA em VEs pode refletir processos de estresse celular e disfunção mitocondrial em tecidos distantes de forma não invasiva.

Em suma, os resultados obtidos nesta fase inicial validaram com sucesso todas as frentes metodológicas propostas para o projeto. Dispomos agora de protocolos robustos para a análise detalhada da função mitocondrial em PBMCs e para o estudo inovador de VEs como reservatórios de biomarcadores mitocondriais. Esta rigorosa padronização técnica garante a viabilidade do projeto e fornece a base necessária para proceder com a análise das amostras dos pacientes, assim que a aprovação ética for concedida.

Conclusão

A disfunção mitocondrial é uma consequência celular chave na Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip (LGC), mas os mecanismos e biomarcadores associados permanecem pouco explorados. O presente projeto propõe uma investigação aprofundada desta disfunção através de uma abordagem dupla e inovadora. A fase inicial, focada na otimização metodológica, foi concluída com sucesso, estabelecendo protocolos robustos para a análise multiparamétrica da função mitocondrial em Células Mononucleadas do Sangue Periférico (PBMCs) por citometria de fluxo, bem como para o isolamento e caracterização de vesículas extracelulares (VEs) do plasma.

De forma crucial, foi confirmada a presença de DNA mitocondrial (mtDNA) no interior dessas VEs em amostras controle, validando-as como um promissor compartimento para a análise não invasiva da saúde mitocondrial. Com esta sólida base técnica, o projeto está preparado para avançar para a etapa de recrutamento de participantes com LGC-1 e LGC-2, após a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

A aplicação destas metodologias permitirá uma caracterização detalhada das alterações bioenergéticas e do estresse oxidativo nos pacientes. Espera-se, portanto, não apenas aprofundar a compreensão dos mecanismos celulares que governam a fisiopatologia da LGC, mas também investigar o potencial do mtDNA vesicular como um novo biomarcador para o monitoramento da doença. Em suma, este estudo tem o potencial de gerar conhecimentos significativos sobre a base celular da LGC e de abrir novos caminhos para a compreensão desta rara e devastadora desordem metabólica.

Referências

1. Van Maldergem L. Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy. 2003 Sep 8 [updated 2016 Dec 8]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023. PMID: 20301391.
2. Zhou, H., Lei, X. N., Benson, T., Weintraub, N. L., Wang, X. L., & Chen, W. (2015). Congenital Lipodystrophy 2 of Berardinelli-Seip Regulates Adipocyte Lipolysis, Browning, and Energy Balance in Adult Animals. Volume 56, Issue 10, Pages 1912-1925, October 2015.
3. Cartwright, B. R., & Goodman, J. M. (2012). Seipin: From Human Disease to Molecular Mechanism. Volume 53, Issue 6, Pages 1042-1055, June 2012.
4. Ding, L., Yang, X., Tian, H., Liang, J., Zhang, F., Wang, G., Wang, Y., Ding, M., Shui, G., & Huang, X. (2018, July 26). Seipin regulates lipid homeostasis by ensuring calcium-dependent mitochondrial metabolism. The EMBO Journal, 37(17).
5. LIMA, Josivan Gomes de; CAMPOS, Julliane Tamara Araújo de Melo (org.). Síndrome de Berardinelli-Seip: aspectos genéticos e morfofisiológicos. Natal: EDUFRN, 2020.

CÓDIGO: SB0601

AUTOR: ANA CAROLINA REVOREDO GALVAO

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTES COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR ASSOCIADA A MUTAÇÕES NO GENE AKT2 NO RIO GRANDE DO NORTE

Resumo

As lipodistrofias são doenças genéticas raras e subdiagnosticadas que afetam a distribuição de gordura do tecido adiposo, causando uma série de complicações metabólicas, como esteatose hepática, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia e resistência à insulina. Dentre os tipos de lipodistrofias, está um tipo que ainda há poucos relatos descritos na literatura: a lipodistrofia parcial familiar relacionada a AKT2. Nesse sentido, esse trabalho foi realizado com o objetivo de obter mais conhecimento sobre as variantes de AKT2 descritas na literatura, por meio de uma revisão nas bases de dados ClinVar, PubMed e Web Of Science; e divulgar esse conhecimento e sobre a biologia do tecido adiposo dentro e fora da comunidade científica, a partir da divulgação constante de postagens e quizzes no Instagram @lipodistrofia.brasil, submissão de resumos para congressos e realização de eventos acadêmicos, como o AdipoTalk. Ademais, o trabalho também objetivou a realização de uma captação de novos pacientes para futuros recolhimento de amostras e realização de testes moleculares. Portanto, este trabalho se relaciona ao objetivo 3 do Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU).

Palavras-chave: Tecido adiposo. Doença genética rara. Divulgação científica.

TITLE: Genetic diagnosis of patients with familial partial lipodystrophy related to mutations in the gene AKT2 in Rio Grande do Norte

Abstract

Lipodystrophies are rare and underdiagnosed genetic diseases that affect the fat distribution of adipose tissue, causing a number of metabolic complications such as hepatic steatosis, diabetes mellitus, hypertriglyceridemia and insulin resistance. Among the types of lipodystrophies, there is a type that is still few reports described in the literature: the family partial lipodystrophy related to AKT2. In this sense, this work was carried out with the objective of obtaining more knowledge about the AKT2 variants described in the literature, through a review in the databases ClinVar, PubMed and Web Of Science; and disseminate this knowledge and about the biology of adipose tissue within and outside the scientific community, from the constant disclosure of posts and quizzes on Instagram @lipodistrofia.brasil, submission of abstracts for conferences and academic events such as AdipoTalk. In addition, the work also aimed to perform a capture of new patients for future collection of samples and performing molecular tests. Therefore, this work relates to objective 3 of the Sustainable Development of the 2030 Agenda of the United Nations (UN).

Keywords: Adipose tissue. Rare genetic disease. Scientific advertisement.

Introdução

As lipodistrofias são condições metabólicas heterogêneas raras marcadas pela perda de tecido adiposo branco subcutâneo e podem estar associadas a algumas comorbidades, como a resistência à insulina e o diabetes mellitus. Elas são divididas em congênitas e adquiridas, de acordo com os seus fatores de origem, e as congênitas são subdivididas em generalizadas (LGC) e parciais (LPF), a depender da magnitude da perda do tecido adiposo subcutâneo (SARMENTO et al., 2019). Faz-se importante também ressaltar que as lipodistrofias congênitas possuem uma prevalência mundial estimada em 2,63 casos por 1 milhão de pessoas e as lipodistrofias parciais possuem prevalência mundial estimada em 1,67 casos por 1 milhão de pessoas (DA SILVA et al., 2024). Embora ainda subdiagnosticadas, as lipodistrofias também podem ser divididas de acordo com o gene que está mutado. Nesse sentido, dentre as lipodistrofias congênitas há 5 tipos de generalizadas (LGC) e 8 parciais familiares (LPF), sendo a lipodistrofia generalizada congênita 1 (LGC1), causada por variantes no gene AGPAT2; a LGC2, causada por variantes presentes no gene BSCL2; a LGC3, associada a mutações no gene CAV1; LGC4, causada por variantes no gene PTRF, e a lipodistrofia generalizada congênita associada a PPARG; a lipodistrofia parcial familiar 1 (LPF1), a qual também pode ser chamada de síndrome Kobberling e que ainda não se sabe quais genes e mutações a que ela está associada; a LPF2, ou síndrome de Dunnigan, associada a variantes no gene LMNA; a LPF3, associada a variantes no gene PPARG, a LPF4, associada a variantes no gene PLIN; a LPF5, causada por mutações no gene CIDEC; a LPF6, causada por mutações no gene LIPE; a lipodistrofia parcial, catarata congênita e síndrome de neurodegeneração, associada a mutações em CAV1; e a lipodistrofia parcial familiar relacionada a AKT2 (ARAÚJO-VILAR E SANTINI, 2018). Esse último gene, AKT2, exerce uma importante função de regular o metabolismo da insulina via receptor de insulina, então a sua disfunção gera diversos distúrbios metabólicos como um tipo de lipodistrofia parcial familiar, sobre a qual ainda há poucos registros na literatura devido ao seu caráter raro. (TAN et al., 2007). Logo, foi realizada uma revisão da literatura para aprofundamento do conhecimento sobre as lipodistrofias e o gene AKT2, recrutamento de pacientes para a pesquisa sobre as variantes desse gene que podem ser causadoras de lipodistrofias, e divulgação científica.

Metodologia

Para a revisão da literatura sobre o gene AKT2 e casos de lipodistrofia causados por variantes desse gene, foram utilizadas as bases de dados ClinVar, PubMed e Web Of Science.

Para o recrutamento de pacientes foi elaborado um formulário do Google Forms, contendo perguntas relacionadas ao paciente, diagnóstico e acompanhamento da lipodistrofia, como o nome completo e idade do paciente, a cidade e o estado onde ele mora, se e há quanto tempo ele possui diagnóstico clínico e/ou genético de lipodistrofia, qual é o subtipo da doença que ele possui, por quais profissionais o paciente é acompanhado, se ele segue uma dieta recomendada pelo nutricionista que esteja de acordo com as necessidades de um paciente lipodistrofia, quais são os desafios enfrentados pelo paciente devido à doença, a idade de início dos sintomas, além de e-mail e número de telefone para contato.

A divulgação científica acerca dos temas relacionados ao tecido adiposo e às lipodistrofias foi realizada a partir de submissão de resumos para congressos, postagens, quizzes semanais, uma

live com uma paciente lipodistrófica e algumas caixas de perguntas no Instagram @lipodistrofia.brasil.

Também foi organizado um evento nomeado de AdipoTalk com conteúdos atuais sobre a biologia do tecido adiposo.

Resultados e Discussões

Durante a execução da revisão da literatura, foram encontrados 2 artigos relatando sobre os casos de pacientes com a mutação AKT2 c.49G>A. É importante ressaltar que o pequeno número de artigos relacionados a mutações nesse gene relacionadas às lipodistrofias se dá por essas variantes serem raras. O primeiro caso é referente a uma menina de 4 anos de idade, nascida de pais não consanguíneos, que foi admitida no hospital apresentando um quadro de hipoglicemia hipocetótica com edema periorbital, hipertrofia facial esquelética leve, proptose bilateral e hipotonia central. Essa paciente apresentou convulsão em um quadro de hipoglicemia de jejum anteriormente, quando tinha 6 meses. (PARKER E YAU, 2024). No outro caso relatado, um menino de 12 anos apresentou epilepsia que se iniciou precocemente e dificuldades intelectuais, além de lipodistrofia simétrica sem hemihipertrofia, apesar da maioria dos pacientes com a variante AKT2 c.49G>A apresentarem hemihipertrofia. Ele também apresentou esteatose hepática e infiltração de gordura nos músculos oculares, a qual ocasionou uma ptose bilateral ou proptose. Esse paciente também já passou por episódios de cianose, apnéia do sono e convulsões tônico-clônicas bilaterais (SAYOL-TORRES et al., 2025). Por último, vale ressaltar que essa variante presente em ambos os pacientes é de ganho de função do gene AKT2, assim havendo ativação da via de insulina pela proteína AKT2 sem a necessidade da sinalização de insulina, devido à ocorrência da substituição do aminoácido glutamato da posição 17 da proteína por uma lisina. Desse modo, há um feedback negativo de insulina pela ativação constitutiva da proteína AKT2, promovendo níveis indetectáveis dela, assim ocorrendo um quadro de hipoglicemia hipocetótica. (PARKER E YAU, 2024; SAYOL-TORRES et al., 2025)

O formulário de recrutamento de pacientes foi elaborado e ainda está aceitando respostas através do link presente na bio do perfil do Instagram @lipodistrofia.brasil. Em breve, os pacientes serão contactados para terem uma amostra do seu sangue coletado para um futuro sequenciamento genético e estudo das variantes, presentes em seus genes, relacionadas às lipodistrofias.

É importante discutir também que a divulgação de dados científicos sobre as lipodistrofias, o gene AKT2 e outros foi realizada semanalmente no feed e nos stories do perfil do Instagram @lipodistrofia.brasil, assim aproximando essas informações científicas da comunidade interessada nelas, como pacientes lipodistróficos, seus familiares, profissionais da saúde e demais indivíduos que buscam conhecer melhor essa doença rara. Com isso, foram produzidas diversas postagens sobre o assunto e diversos quizzes acerca do post da semana. Além disso, na live intitulada “Vivendo com Lipodistrofia Parcial Familiar do tipo 2”, uma paciente com essa doença foi entrevistada, sendo essa live importante para mostrar aos interessados pela lipodistrofia a visão de um paciente sobre o seu dia a dia, desafios e reforçar a importância da existência de pesquisas que visem melhorar a qualidade de vida de pessoas lipodistróficas.

Também foram produzidos dois resumos para congressos, sendo um intitulado “Patofisiologia das lipodistrofias congênitas generalizadas e parciais e a importância da nutrição no manejo das complicações metabólicas”, o qual foi submetido para o X Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Clínica e Esportiva (X CONNAE) e exposto no formato de pôster digital nos dias 23, 24 e 25 de julho de 2025, durante o evento; e outro intitulado “Type 1 and 2 congenital generalized lipodystrophy individuals display a similar expression pattern of genes related to adipogenesis and DNA Repair”, o qual foi submetido para o XVII Congresso da Mutagen-Brasil e, até o momento, está sob análise pela comissão científica do evento.

Além da divulgação científica pelo Instagram e em congressos, o grupo de pesquisa organizou um evento chamado “AdipoTalk: Uma Imersão na Biologia do Tecido Adiposo”, o qual ocorreu nos dias 17 e 18 de julho de 2025 no Anfiteatro das Aves do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Esse evento contou com 12 palestras de 9 profissionais reconhecidos nos estudos das lipodistrofias e do tecido adiposo.

Conclusão

Tendo em vista a pesquisa bibliográfica sobre os casos de AKT2, a variante c.49 G>A gera uma superativação constitutiva de AKT2, afetando a via de sinalização de insulina e gerando outras comorbidades além da distribuição anormal de tecido adiposo pelo corpo. Ademais, a divulgação científica foi importante para que mais pessoas conhecessem essas doenças. É válido ressaltar que a revisão da literatura também irá auxiliar na futura comparação desses dados com os dados dos pacientes do grupo de pesquisa.

Logo, nesse trabalho, foram aprendidas técnicas de buscas de artigos em bases de dados; técnicas de Biologia Molecular, as quais foram vistas nos artigos e discutidas; as habilidades de síntese e de escrita em linguagem acadêmica, ao escrever os resumos para congressos; as habilidades de organização, ao participar da comissão organizadora do AdipoTalk; e as habilidades de simplificar a linguagem científica para tornar acessível à comunidade e as habilidades com as mídias sociais, ao criar as postagens e os quizzes semanais no Instagram @lipodistrofia.brasil semanalmente baseando-se em artigos científicos da literatura.

Referências

ARAÚJO-VILAR, D.; SANTINI, F. Diagnosis and treatment of lipodystrophy: a step-by-step approach. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 42, n. 1, p. 61–73, 27 abr. 2018.

DA SILVA, M. A. et al. Case report: two novel PPARG pathogenic variants associated with type 3 familial partial lipodystrophy in Brazil. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 16, n. 1, 1 jul. 2024.

PARKER, M.; YAU, D. Treatment of hypoglycemia due to a rare pathogenic variant in AKT2 with waxy maize heat-modified starch. *Clinical case reports*, v. 12, n. 2, 1 fev. 2024.

TAN, K. et al. Analysis of Genetic Variation in Akt2/PKB-β in Severe Insulin Resistance, Lipodystrophy, Type 2 Diabetes, and Related Metabolic Phenotypes. *Diabetes*, v. 56, n. 3, p. 714–719, 1 mar. 2007.

SARMENTO, A. S. C. et al. The worldwide mutational landscape of Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 781, p. 30–52, 1 jul. 2019.

SAYOL-TORRES, L. et al. Case Report: Hypoinsulinaemic Hypoketotic Hypoglycaemia Due to an Activating Variant in AKT2. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology, 11 ago. 2025.

Anexos

Capa de post do @lipodistrofia.brasil

Página de post do @lipodistrofia.brasil

Palestra AdipoTalk

Comissão do AdipoTalk

Live com uma paciente lipodistrófica

CÓDIGO: SB0609

AUTOR: FELIPE FERNANDO SOBREIRO DA SILVA

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Estudo da citotoxicidade e genotoxicidade de microesferas à base de hidroxiapatita nanoestruturadas contendo carbonato produzidas a 5°C

Resumo

Lesões graves podem comprometer a capacidade autorregenerativa dos ossos exigindo intervenções cirúrgicas para restaurar a massa óssea. Os enxertos autólogos são o padrão ouro, porém, apresentam várias limitações. Nesse sentido, a hidroxiapatita (HA) é amplamente utilizada. Podendo ser modificada com íons para melhorar suas propriedades biológicas. O objetivo inicial do estudo era avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de microesferas de HA nanoestruturada contendo íons carbonato, mas incluímos a avaliação de materiais com estrôncio e zinco. Em trabalhos anteriores estudamos materiais de HA, contendo esses íons, e sintetizados a 37 °C, neste trabalho usamos materiais sintetizados a 5 °C para investigar de que modo esse parâmetro influencia características estruturais e funcionais. Foram realizados os ensaios in vitro de redução do 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólibrometo (MTT) e o ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) usando diferentes concentrações das amostras (50 e 100 mg/mL). Os resultados indicaram citotoxicidade apenas na maior concentração usada e ausência de genotoxicidade das HA contendo íons Sr^{2+} , Zn^{2+} , no entanto, a HA carbonatada apresentou aumento na frequência de micronúcleos. Esses dados preliminares sugerem que as microesferas de HA nanoestruturada contendo Sr^{2+} e Zn^{2+} são seguras para aplicações clínicas, embora estudos adicionais sejam necessários.

Palavras-chave: Biomateriais .Nanomateriais. Biocompatibilidade. Regeneração.

TITLE: Study of the cytotoxicity and genotoxicity of nanostructured hydroxyapatite-based microspheres containing carbonate produced at 5°C.

Abstract

Severe injuries can compromise the self-regenerative capacity of bones, requiring surgical interventions to restore bone mass. Autologous grafts are the gold standard; however, they present several limitations. In this regard, hydroxyapatite (HA) is widely used and can be modified with ions to improve its biological properties. The initial aim of the study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of nanostructured HA microspheres containing carbonate ions, but we also included the evaluation of materials with strontium and zinc. In previous studies, we investigated HA materials containing these ions and synthesized at 37 °C; in this work, we used materials synthesized at 5 °C to investigate how this parameter influences structural and functional characteristics. In vitro assays of 4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction and the cytokinesis-block micronucleus

(CBMN) assay were performed in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells using different sample concentrations (50 and 100 mg/mL). The results indicated cytotoxicity only at the highest concentration tested and absence of genotoxicity for HA containing Sr^{2+} and Zn^{2+} ions; however, carbonate-HA showed an increase in micronucleus frequency. These preliminary data suggest that nanostructured HA microspheres containing Sr^{2+} and Zn^{2+} are safe for clinical applications, although further studies are needed

Keywords: Biomaterials. Nanomaterials. Biocompatibility. Regeneration.

Introdução

O esqueleto humano possui propriedades autorregenerativas, sendo continuamente remodelado pela produção e degradação da matriz óssea (CIOSEK et al., 2021). Apesar disso, perdas ósseas significativas como deformidades, acidentes ou doenças podem comprometer essa regeneração, tornando necessária uma intervenção cirúrgica (BELOTI et al., 2024). Nesses casos, os enxertos ósseos autólogos são referência, porém apresentam limitações, como disponibilidade de doadores e complicações pós-operatórias.

Em função disso, a medicina regenerativa investiga biomateriais que mimetizem os minerais da matriz óssea (VIMALRAJ et al., 2023). Assim, biomateriais têm papel fundamental na engenharia de tecidos ósseos, oferecendo possibilidades para estratégias terapêuticas inovadoras e eficazes nesses tratamentos (DEC, 2022). Entre eles, os biomateriais nanoestruturados destacam-se na regeneração e aplicação clínica, sendo biocompatíveis e desempenhando eficazmente suas funções biológicas (ELAKKIYA et al., 2023). Podendo ser sintetizados por processos químicos, físicos e biológicos e processados na forma de microesferas, permitindo controle de tamanho, porosidade e liberação de íons (SALEM et al., 2024). Dentre os nanomateriais mais usados, a HA se destaca por sua biocompatibilidade e potencial osteocondutor (FARAZIN et al., 2024). A HA pode ser combinada com outros elementos para aprimorar propriedades biológicas e bactericidas (GEORGE, S. M. et al., 2022).

Outro fator que influencia as propriedades do biomaterial, como porosidade, composição, degradação e desempenho biológico da HA, é a alteração de temperatura de síntese das microesferas. Por exemplo, foi observado que, em temperaturas mais altas, há aumento na cristalização e no tamanho do cristalito, enquanto em temperaturas mais baixas, próximas a 5 °C, as nanopartículas apresentam formato irregular e menor toxicidade em comparação às sintetizadas em condições mais elevadas (AL ROSA et al., 2022).

Outro aspecto observado foi a substituição por íons carbonato (CO_3^{2-}) apresentando aumento da solubilidade da HA e maior suscetibilidade à reabsorção por osteoclastos (CAO et al., 2021). Contudo, toda modificação química ou estrutural pode alterar a interação do material com o ambiente biológico, tornando essencial investigar como esses novos materiais interagem com sistemas biológicos (DORNELAS et al., 2024).

Dessa forma, o Instituto Regenera nos enviou amostras de microesferas de HA nanoestruturada produzidas em diferentes condições de temperatura (5 °C, 37 °C e 90 °C) e substituídas com diferentes íons para estudar a biocompatibilidade desses materiais in vitro. Sendo assim, nosso material inicial eram microesferas de HA nanoestruturada contendo íons de carbonato (CHA) a 5 °C. Adicionalmente, neste trabalho realizamos estudos com amostra de microesferas a base de HA nanoestruturadas contendo íons de estrôncio (SrHA) e zinco

(ZnHA), sintetizadas a 5 °C, uma vez que, em trabalhos anteriores, avaliamos microesferas de HA nanoestruturada contendo esses íons, mas sintetizadas a 37 °C.

Segundo a norma ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade in vitro deve ser o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade. Como nanomateriais podem atuar de maneira diferenciada, a avaliação de genotoxicidade também é necessária, pois podem causar danos ao DNA (ALMEIDA et al., 2020; DE BRITO et al., 2021). O ensaio MTT mede a atividade metabólica celular como indicador de viabilidade, proliferação e citotoxicidade (GHASEMI et al., 2021). Para genotoxicidade, o ensaio de CBMN detecta danos no DNA em células binucleadas após exposição a agentes genotóxicos (FARABAUGH et al., 2023). Assim, neste estudo se avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade de microesferas de HA nanoestruturada contendo estrôncio, zinco e carbonato, sintetizadas a 5 °C, por meio dos ensaios MTT e CBMN, respectivamente, para posteriormente se avaliar suas propriedades estruturais, porosidade, taxa de degradação e potencial de remodelação óssea.

Metodologia

Preparo das Amostras: A preparação 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 sintetizadas a 5 °C de HA com carbonato (CHA, pH 12), hidroxiapatita com zinco (ZnHA, pH 12), hidroxiapatita com estrôncio (SrHA), hidroxiapatita pura (HA, pH 9) e de um grupo branco (B5°, HA, pH 12), 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. Após esse preparo, as amostras foram armazenadas em tubos Falcon e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram centrifugadas, e os sobrenadantes foram coletados e aliquotados. O FBS foi adicionado a cada extrato para uma concentração final de 10%.

Cultivo Celular: Foi empregada a linhagem CHO-K1, recomendada pela OECD para o ensaio de 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 CO₂ a 37 °C.

Teste de Citotoxicidade (Ensaio de MTT): As células CHO-K1 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 células/poço, utilizando 100 µL do meio DMEM suplementado, e incubadas por 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi descartado e substituído por 100 µL dos eluatos das amostras.

Os poços de controle negativo 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, seguida de nova incubação por 4 horas. Os cristais de formazana 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 (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 2×10^4 células/poço em 500 µL de meio

completo, e incubadas por 24 horas. Após esse período, os meios foram substituídos por 500 μ L dos eluatos.

Os controles foram tratados com meio novo. Passadas 24 horas, os meios foram removidos e as células lavadas com PBS. Posteriormente, adicionou-se meio contendo citocalasina B (5 μ g/mL) para bloqueio da citocinese. Para o controle positivo, também foi adicionada mitomicina C (1 μ g/mL). Após mais 24 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS, tratadas com tripsina 0,025% por 5 minutos e ressuspensas em meio basal.

A suspensão foi centrifugada (1.200 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 μ L da solução fixadora. Foram gotejados 60 μ L da suspensão celular em lâminas que estavam suspensas em banho-maria a 60 °C. As lâminas foram então deixadas para secar ao ar e coradas com Giemsa 5%, por 5 minutos.

A análise foi realizada às cegas em microscópio óptico (400 $\times$), contabilizando-se as primeiras 500 células para cálculo do Índice de Divisão Nuclear (NDI) e 3.000 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 1.000 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 pelo teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

O efeito das amostras no ensaio de MTT sobre as células expostas por 24 horas à concentração de 50 mg/mL está representado na Figura 1. Na Figura 2, são apresentados os resultados obtidos após a exposição celular à concentração de 100 mg/mL pelo mesmo período.

Na concentração de 50 mg/mL, as reduções 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 % para o grupo branco, 45,67 % para HA, 53 % para CHA, 45,67 % para ZnHA e 52 % para 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, não houve perfil citotóxico para todas as amostras na concentração de 50 mg/mL, enquanto na concentração de 100 mg/mL foi observada citotoxicidade.

Esse perfil citotóxico em concentrações mais altas de HA 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 *in vitro*, 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 analisadas alterações nucleares — micronúcleo (MN), broto nuclear (NBUD) e ponte nucleoplasmática (NPB) — em células binucleadas. Os resultados do único ensaio realizado estão apresentados na Tabela 1, expressos como número de alterações por 1.000 células binucleadas, em comparação ao controle negativo. Também foi calculado o índice de divisão nuclear (NDI) para cada grupo avaliado.

Como o experimento foi conduzido com apenas uma replicata 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 mostrou valores elevados de alterações nucleares. Dessa forma, não é possível concluir sobre a ausência de genotoxicidade para este material. São necessários novos ensaios, com número adequado de replicatas biológicas, para confirmar a genotoxicidade desses eluatos.

Esse achado para a CHA não corrobora os estudos recentes da literatura. Merve et al. (2024) e 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 em artigos publicados entre 2000 e 2022, apenas 15 artigos demonstraram potencial genotóxico, evidenciando que, em geral, a HA apresenta um perfil seguro de genotoxicidade (De Souza et al., 2024).

Assim, os resultados preliminares obtidos neste trabalho seguem o mesmo padrão descrito na literatura recente para os materiais baseados em HA contendo zinco e estrôncio, mas o mesmo não parece ocorrer para a HA contendo carbonato. Isso indica que estudos adicionais, com replicações e análises estatísticas mais robustas, ainda são necessários para confirmação definitiva; entretanto, os dados iniciais são promissores quanto à biossegurança desses materiais.

Conclusão

Este estudo avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade de microesferas de hidroxiapatita (HA) nanoestruturada contendo íons estrôncio, zinco e carbonato, sintetizadas a 5 °C. Os resultados do ensaio MTT indicaram citotoxicidade significativa apenas na concentração mais elevada (100 mg/mL), com redução expressiva da viabilidade celular. Em concentrações menores (50 mg/mL), todas as amostras mantiveram a viabilidade acima do limiar 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 Zn^{2+} e Sr^{2+} não induziram danos significativos ao DNA, apresentando frequências de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos

nucleares comparáveis ao 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, Žaneta 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

FIGURA 2

TABELA 1

CÓDIGO: SB0610

AUTOR: AYRK CALIEL MOURA DE VASCONCELOS

ORIENTADOR: EDUARDO LUIZ VOIGT

TÍTULO: Partição de carboidratos não estruturais em plântulas de *Pityrocarpa moniliformis* sob estresse térmico

Resumo

A Caatinga é um bioma encontrado exclusivamente no Brasil que enfrenta grave degradação e requer estratégias de restauração baseadas em espécies nativas adaptadas ao estresse climático. Este estudo avaliou a partição de carboidratos não estruturais em mudas de *Pityrocarpa moniliformis* submetidas a 42 graus Celsius (estresse térmico) em comparação com 27 graus Celsius (controle). As plântulas foram cultivadas in vitro e analisadas quanto ao teor de amido, açúcares solúveis totais e açúcares não redutores nos cotilédones, hipocótilo e raiz. O estresse térmico não causou mortalidade, mas induziu clorose nos cotilédones e atrasou o estabelecimento da plântula. Não foram observadas diferenças significativas no teor de amido entre os órgãos, mas o teor de açúcares solúveis totais foi reduzido em cerca de 50% nos cotilédones. Em contrapartida, houve um aumento significativo de açúcares não redutores nesse órgão, sugerindo uma função osmoprotetora e um papel na manutenção do metabolismo energético. Esses resultados indicam que *P. moniliformis* mantém os níveis de carboidratos não estruturais mesmo sob alta temperatura e apresenta maior tolerância ao calor. A espécie revela, portanto, potencial para programas de restauração ecológica em áreas da Caatinga diante do aquecimento global.

Palavras-chave: 1 Caatinga. 2 Carboidratos não estruturais. 3 estresse térmico

TITLE: Partitioning of non-structural carbohydrates in *Pityrocarpa moniliformis* seedlings under heat stress

Abstract

The Caatinga is a biome found exclusively in Brazil that faces severe degradation and requires restoration strategies based on native species adapted to climatic stress. This study evaluated the partitioning of non-structural carbohydrates in *Pityrocarpa moniliformis* seedlings subjected to 42 degrees Celsius (heat stress) compared to 27 degrees Celsius (control). The seedlings were grown in vitro and analysed for starch content, total soluble sugars, and non-reducing sugars in the cotyledons, hypocotyl, and root. Heat stress did not cause mortality but induced chlorosis in the cotyledons and delayed seedling establishment. but the total soluble sugar content was reduced by about 50% in the cotyledons. In contrast, there was a significant increase in non-reducing sugars in this organ, suggesting an osmoprotective function and a role in maintaining energy metabolism. These results indicate that *P. moniliformis* maintains non-structural carbohydrate levels even under high

temperatures and exhibits greater heat tolerance. The species therefore shows potential for ecological restoration programmes in areas of the Caatinga facing global warming.

Keywords: 1 Caatinga. 2 Non-structural carbohydrates 3. Heat stress

Introdução

A maior parte da Região Nordeste é ocupada por uma floresta sazonalmente seca conhecida como Caatinga. Esta formação florestal ocorre exclusivamente no Brasil, apresenta árvores e arbustos rústicos adaptados a condições semiáridas e abriga elevada riqueza, biodiversidade e endemismo (FERREIRA et al., 2016). Estima-se que metade da cobertura vegetal da Caatinga está devastada e os seus fragmentos remanescentes sofrem perturbações antropogênicas crônicas (ANTONGIOVANNI et al., 2020). Tendo em vista que as iniciativas voltadas à restauração das áreas degradadas da Caatinga ainda são escassas (GUERRA et al., 2020), mais pesquisas se fazem necessárias para fomentar novos programas.

Como a semeadura direta e o plantio de mudas são os principais métodos utilizados em programas de restauração (LEVERKUS et al., 2021), a transição semente-plântula está no cerne nestas iniciativas. A transição semente-plântula é um processo do desenvolvimento mantido pela mobilização das reservas nos tecidos de armazenamento e pelo transporte de metabólitos para o eixo em crescimento (WINGLER, 2018). Dentre as reservas e os metabólitos utilizados pelas plantas, os carboidratos não estruturais (CNE) se destacam porque ocupam posição central no metabolismo vegetal. Em dicotiledôneas, os principais CNE são o amido, que atua como reserva, e os açúcares solúveis, metabólitos disponíveis para uso imediato (MARTINEZ-VILALTA et al., 2016).

Estudos recentes têm evidenciado a importância dos CNE nas respostas fornecidas pelas plântulas aos estresses ambientais e, portanto, no seu desempenho sob condições naturais (VILLAR-SALVADOR et al., 2015). No cenário atual de mudanças climáticas, o estresse térmico está se intensificando e é uma das principais causas da mortalidade em árvores (MURPHY e WAY, 2021). Tendo em vista que a mobilização das reservas é pouco compreendida em espécies arbóreas (BEWLEY et al., 2013), o presente plano de trabalho objetiva caracterizar a partição de CNE em plântulas de *Pityrocarpa moniliformis* submetidas a estresse térmico. *P. moniliformis* é uma leguminosa arbórea que ocorre naturalmente na Caatinga (FREIRE-JÚNIOR e SILVA, 2019) e apresenta potencial para a restauração de áreas degradadas (RIBEIRO et al., 2021).

Metodologia

As sementes de *P. moniliformis* foram gentilmente concedidas pelo Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental (NEMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), localizado em Petrolina (PE). Estas sementes foram escarificadas mecanicamente na porção oposta ao hilo para a superação da dormência física e, em seguida, lavadas com detergente comercial diluído 1:500 por 30 s, seguido de água corrente. Para a desinfecção, as sementes foram sequencialmente expostas a etanol 70% (v/v) por 30 s e hipoclorito de sódio 0,25% (m/v) por 3 min e enxaguadas em água destilada estéril.

A embebição foi realizada em água destilada estéril por 1 h e a semeadura foi conduzida em ágar-água 10 g/L contido em placas de Petri. As sementes foram cultivadas sob fotoperíodo

de 12 h a 27 ± 2 graus Celsius por 2 dias. As plântulas obtidas foram transferidas para ágar-água 5 g/L contido em frascos de vidro com tampa de plástico transparente e cultivadas a 27 (controle) ou 42 graus Celsius (estresse térmico) sob fotoperíodo de 12 h por 4 dias. As plântulas foram repartidas em cotilédones, hipocótilo e raiz durante as coletas e as amostras foram congeladas para as quantificações.

Os açúcares solúveis foram extraídos exaustivamente com etanol 80% (v/v) a 65 graus Celsius e os resíduos foram utilizados para a extração do amido com ácido perclórico 30% (v/v) a 4 graus Celsius. Os açúcares solúveis totais (YEMM e WILLIS, 1954), os açúcares não redutores (VAN HANDEL, 1968) e o amido (MCCREADY et al., 1950) foram quantificados com o reagente de antrona (MORRIS, 1948).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Um frasco contendo cinco plântulas foi considerado uma unidade experimental. Cinco repetições foram usadas em cada determinação. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussões

A exposição à alta temperatura (42 graus Celsius) não causou mortalidade das plântulas, entretanto seus cotilédones mantiveram-se em gancho plumular e encontravam-se mais cloróticos quando comparados aos cotilédones das plântulas expostas à temperatura de 27 graus Celsius.

O conteúdo de amido nos cotilédones (Figura 1-A) e na raiz (Figura 1-C) não apresentou diferença significativa quando expostos à alta temperatura em relação ao conteúdo aferido no controle (27 graus Celsius), diferentemente do que é observado com hipocótilo (Figura 1-B), no qual houve uma redução de aproximadamente 33% de seu conteúdo tendo como referência os valores aferidos no controle.

O conteúdo de AST apresentou diferença significativa nos tecidos dos cotilédones (Figura 2-A), o equivalente a aproximadamente 50% de perda de conteúdo sob 27 graus Celsius em comparação com 42 graus Celsius. Porém, no hipocótilo e na raiz (Figura 2-B,C), não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao conteúdo de AST.

A parcela não redutora dos açúcares apresentou diferença significativa nos conteúdos quantificados nos cotilédones (Figura 3-A), onde os valores de ANR mostraram-se maiores quando expostos aos 42 graus Celsius em relação a 27 graus Celsius. Este aumento ocorreu mesmo se verificando uma redução no conteúdo total de açúcares apresentados pelos cotilédones. Os valores encontrados no hipocótilo e na raiz (Figura 3-B,C) mantiveram-se sem diferenças significativas quanto às diferentes temperaturas de crescimento.

Os teores de amido no hipocótilo apresentaram diferença significativa entre o controle (27 graus Celsius) e o tratamento (42 graus Celsius), entretanto, devido a baixa quantidade desta reserva presente neste órgão e nos demais, há de se pressupor que este fator não seja um indicador de relevância biológica para a planta e seu estabelecimento. Durante a fase inicial de estabelecimento, a qual é reconhecida como uma fase transitória e de alta multiplicação e alongamento celular, em que as reservas são consumidas para a obtenção de açúcares livres para crescimento.

Durante a exposição das plântulas ao estresse térmico aferiu-se uma diminuição em seu conteúdo de AST nos cotilédones; em contrapartida houve um aumento na parcela não redutora de açúcares no mesmo órgão dentro das mesmas condições de crescimento. Estes resultados indicam uma possível mudança na utilização dos açúcares livres presentes no cotilédone durante o estresse térmico, permitindo um estabelecimento tardio e evitando a mortalidade (dado não mostrado).

As plantas de *P. moniliformis* apresentaram a capacidade de manter os níveis de CNE quando expostas a 42 graus Celsius durante o experimento, uma resposta diferente do que a reportada em outra espécie arbórea como *Pinus halepensis*, na qual ocorre uma diminuição no conteúdo de CNE e um grande aumento na mortalidade das plântulas (Birami et al., 2018). Assim, possivelmente *P. moniliformis* possui uma maior tolerância a altas temperaturas, pois quando comparadas a outras espécies como *Arabidopsis* (Silva-Correia, 2014), *Ricinus communis* (Ribeiro et al., 2015) e *Eupatorium catarium*, *Ageratum conyzoides*, *Tridax procumbens*, *Synedrella nodiflora* (Hou et al., 2014), o estresse térmico é capaz de causar mortalidade e mudanças morfológicas, em contranste com *P. moniliformis*.

A resposta do aumento do conteúdo de ANR nos cotilédones quando as plântulas são expostas ao estresse térmico pode se apresentar como um mecanismo de osmoproteção do órgão devido a sua função de reserva e posteriormente de órgão fotossintetizante temporário (Soriano et al., 2013; Xalxo et al., 2020). Todavia, são necessários mais estudos para confirmar este mecanismo atrelado ao metabolismo de carboidratos da plântula.

Conclusão

Com os resultados obtidos conclui-se que o estresse térmico não foi capaz de afetar a mobilização de CNE nas plântulas de *P. moniliformis* e também não foi capaz de causar mortalidade, apenas retardando o processo de estabelecimento, todavia, alguns aspectos sobre os ANR e sua função de osmoproteção não ficam totalmente claros, visto que quando as plântulas são expostas ao estresse térmico, os seus níveis aumentam nos cotilédones. É notável que a espécie parece possuir resistência ao estresse térmico, devido à sua capacidade de manter os níveis de CNE. Esta espécie, assim como outras nativas da Caatinga, devem continuar sendo estudadas para o melhor entendimento de seus mecanismos biológicos e seus usos para um futuro de aumento de temperatura global.

Referências

ANTONGIOVANNI, M.; VENTICINQUE, E.M.; MATSUMOTO, M.; FONSECA, C.R. Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. *Journal of Applied Ecology*, v. 57, p. 2064-2074, 2020.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 3. ed. New York: Springer, 2013.

- BIRAMI, B., GATTMANN, M., HEYER, A. G., GROTE, R., ARNETH, A., & RUEHR, N. K. Heat waves alter carbon allocation and increase mortality of Aleppo pine under dry conditions. *Frontiers in Forests and Global Change*, 1, 8. 2018.
- FERREIRA, R. L. C.; SILVA, S. O.; SILVA, J. A. A.; LIRA, M. A.; ALVES JÚNIOR, F. T.; NASCIMENTO, L. M. Richness and diversity of Caatinga areas in different successional stages in northeastern Brazil. *Scientia Forestalis*, v. 44, p. 799-810, 2016.
- 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.
- GUERRA, A.; REIS, L.K.; BORGES, F.L.G.; OJEDA, P.T.A.; PINEDA, D.A.M.; MIRANDA, C.O.; MAIDANA, D.P.F.L.; SANTOS, T.M.R.; SHIBUYA, P.S. MARQUES, M.C.M.; LAURANCE, S.G.W.; GARCIA, L.C. Ecological restoration in Brazilian biomes: Identifying advances and gaps. *Forest Ecology and Management*, v. 458, p. 117802, 2020.
- HOU, Q. Q.; CHEN, B. M.; PEN, S. L.; CHEN, L. Y. Effects of extreme temperature on seedling establishment of nonnative invasive plants. *Biol invasions*, v. 16, p. 2049-2061, 2014.
- JOSÉ, S. C. B. R., VON PINHO, É. V. R., & DIAS, M. A. G. S. Açúcares e tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, 28, 60-68, 2006.
- LEVERKUS, A.B.; LÁZARO-GONZÁLEZ, A.; ANDIVIA, E.; CASTRO, J.; JIMÉNEZ, M.N.; NAVARRO, F.B. Seeding or planting to revegetate the world's degraded land: systematic review and experimentation to address methodological issues. *Restoration Ecology*, v. 29, p. e13372, 2021.
- MARTÍNEZ-VILALTA, J.; SALA, A.; ASENSIO, D.; GALIANO, L.; HOCH, G.; PALACIO, S.; PIPER, F.I.; LLORET, F. Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: A global synthesis. *Ecological Monographs*, v. 86, p.495-516, 2016.
- MCCREADY R.M.; GUGGOLZ J.; SILVIERA V.; OWENS H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*, v. 22, p. 1156-1158, 1950.
- MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*, v.107, p.111-114, 1948.
- MURPHY, B.K.; WAY, D.A. Warming and elevated CO₂ alter tamarack C fluxes, growth and mortality: evidence for heat stress-related C starvation in the absence of water stress. *Tree Physiology*, v. 41, p. 2341-2358, 2021.
- SANTOS, M. G., OLIVEIRA, M. T., FIGUEIREDO, K. V., FALCAO, H. M., ARRUDA, E. C., ALMEIDA-CORTEZ, J., ... & ANTONINO, A. C. Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: can it tolerate climate changes?. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26(1), 83-99.2014.
- SHAH, W. H., RASOOL, A., TAHIR, I., & REHMAN, R. U.. Non-reducing Sugars for Combating Plant Abiotic Stresses. *Plant Abiotic Stresses Physiological Mechanisms Tools and Regulation*, p27, 2019

SILVA-CORREIA, J.; FREITAS, S.; TAVARES R. M.; LINO-NETO, T.; AZEVEDO, H. Phenotypic analysis of the Arabidopsis heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods*, v. 10:7, p. 1-11.

SORIANO D., HUANTE P., BUEN A.G., OROZCO-SEGOVIA A. Seed reserve translocation and early seedling growth of eight tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. *Plant Ecology*, v. 214, p. 3161–3175, 2013.

RIBEIRO, A.; FERRAZ-FILHO, A.C.; FARIAS, S.G.G.; DIAS, B.A.S.; SILVA, H.P. Restoration potential of eight tree species from a seasonally dry tropical forest in southeast Piauí, Brazil. *Cerne*, v. 27, p. e–102702, 2021.

RIBEIRO, P. R.; WILLEMS, L. A. J.; MUTIMAWURUGO, M. C.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Metabolite profiling of *Ricinus communis* germination at different temperatures provides new insights into thermo-mediated requirements for successful seedling establishment. *Plant Science*, v.239, p.180-191, 2015.

VAN HANDEL E. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry*, v. 22, p. 280-283, 1968.

VILLAR-SALVADOR, P.; USCOLA, M.; JACOBS, D.F. The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted forest trees. *New Forests*, v. 46, p.813-839, 2015.

WINGLER, A. Transitioning to the next phase: the role of sugar signaling throughout the plant life cycle. *Plant Physiology*, v. 176, p.1075-1084, 2018.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

XALXO, R., YADU, B., CHANDRA, J., CHANDRAKAR, V., & KESHAVKANT, S. Alteration in carbohydrate metabolism modulates thermotolerance of plant under heat stress. *Heat stress tolerance in plants: physiological, molecular and genetic perspectives*, 77-115, 2020.

Anexos

Figura 1-Conteúdo de amido no cotilédone (A), no hipocótilo (B) e na raiz (C) em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. Sementes germinadas foram transferidas e mantidas em meio ágar-água 5 g L⁻¹ sob 27 °C (controle) ou 42 °C (estresse)

Figura 2-Conteúdo de Açúcares solúveis totais no cotilédone (A), no hipocótilo (B) e na raiz (C) em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. Sementes germinadas foram transferidas e mantidas em meio ágar-água 5 g L⁻¹ sob 27 °C (controle)

Figura 3-Conteúdo de Açúcares não redutores no cotilédono (A), no hipocótilo (B) e na raiz (C) em plântulas de *P. moniliformis* expostas ao estresse térmico. Sementes germinadas foram transferidas e mantidas em meio ágar-água 5 g L⁻¹ sob 27 °C (controle) o

CÓDIGO: SB0611

AUTOR: ELAYNE CRISTINA RODRIGUES DIAS

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Estudo do potencial anti-adipogênico de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata* em células tronco humanas.

Resumo

A obesidade é uma doença caracterizada pela diferenciação adipogênica e expansão do tecido adiposo. Sua crescente prevalência mundial evidencia as limitações dos tratamentos atuais e, nesse contexto, biomoléculas derivadas de organismos marinhos, como os polissacarídeos sulfatados (PS) de macroalgas, podem servir como modelos para desenvolver fármacos mais eficazes. Nesse sentido, os PS mostraram resultados promissores em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 e em *Caenorhabditis elegans*. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre o efeito antiadipogênico de PS de algas verdes em células-tronco humanas. Considerando essa lacuna, neste trabalho avaliou-se a citotoxicidade e a atividade antiadipogênica de PS de algas verdes. Para isso, células-tronco estromais humanas (hCTEs) foram tratadas com o extrato total e quatro frações (F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0) da alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*. A citotoxicidade foi investigada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) após 24 horas de exposição às amostras, enquanto a atividade antiadipogênica foi avaliada em hCTEs cultivadas por 21 dias em meio adipogênico, com ou sem PS, utilizando coloração com Oil Red O para detecção de acúmulo lipídico. Os resultados preliminares indicaram que os PS não afetaram a proliferação celular e que as frações, especialmente F0.5 e F1.0, inibiram a adipogênese, apontando potencial para desenvolver novas terapias antiobesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Macro algas. Adipogênese.

TITLE: Study of the anti-adipogenic potential of sulfated polysaccharides-rich samples from the seaweed *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata* in human stem cells.

Abstract

Obesity is a disease characterized by adipogenic differentiation and expansion of adipose tissue. Its increasing global prevalence highlights the limitations of current treatments, and in this context, biomolecules derived from marine organisms, such as sulfated polysaccharides (SPs) from macroalgae, may serve as models for developing more effective drugs. SPs have shown promising results in murine 3T3-L1 preadipocytes and in *Caenorhabditis elegans*. However, no studies have reported the antiadipogenic effect of SPs from green algae in human stem cells. To address this limitation, this study evaluated the cytotoxicity and antiadipogenic activity of SPs from green algae. Human mesenchymal stem cells (hMSCs)

were treated with the total extract and four fractions (F0.3, F0.5, F1.0, and F2.0) of *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*. Cytotoxicity was assessed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay after 24 hours of exposure, while antiadipogenic activity was evaluated in hMSCs cultured for 21 days in adipogenic medium with or without SPs, using Oil Red O staining to detect lipid accumulation. Preliminary results indicated that SPs did not affect cell proliferation, and that the fractions, especially F0.5 and F1.0, inhibited adipogenesis, suggesting potential for the development of new anti-obesity therapies.

Keywords: Obesity. Macroalgae. Adipogenesis.

Introdução

A obesidade constitui uma condição multifatorial, resultante da combinação entre o desequilíbrio energético e fatores intrínsecos ao indivíduo, sendo caracterizada por hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo. Dentre as estratégias para combater a obesidade, pode-se destacar o uso de fármacos que atuam por meio de diferentes vias, incluindo: (i) inibição irreversível da lipase pancreática; (ii) agonistas do receptor de GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1) que suprimem o apetite; e (iii) inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina. No entanto, esses fármacos podem provocar efeitos adversos, como pancreatite, esteatorreia, náuseas, constipação, boca seca e insônia, além de nem sempre promover perda significativa de tecido adiposo (Chaves Filho et al., 2022; Gasmi et al., 2023).

A World Obesity Federation projeta que, até 2030, 1 bilhão de pessoas terão obesidade, com metade dos adultos apresentando IMC elevado e 17% dos homens e 22% das mulheres sendo obesos (World Obesity Federation, 2025). Assim, apesar da promoção de mudanças no estilo de vida, bem como das intervenções cirúrgicas e terapias medicamentosas, os casos de obesidade continuam a crescer. Diante disso, é necessário desenvolver tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Nesse contexto, a biotecnologia marinha se destaca especialmente pelo uso de algas como fonte de compostos bioativos com potencial terapêutico (Tanna; Mishra, 2019).

Os polissacarídeos sulfatados (PS) têm sido amplamente estudados por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticoagulantes (Inic-Kanada et al., 2018; Manlusoc et al., 2019). Entretanto, a biodiversidade das algas marinhas reforça a necessidade de explorar seu potencial farmacêutico em diferentes áreas. Algas marrons, vermelhas e verdes contêm PS em quantidades e com estruturas que variam conforme a espécie e a parte da alga (Chaves Filho et al., 2022), tornando-os moléculas estruturalmente diversas que despertam interesse na pesquisa biomédica. Dentre esses grupos, os PS das algas verdes são os mais heterogêneos e menos estudados (Chaves Filho et al., 2018), destacando a importância de investigar suas bioatividades.

Nosso grupo demonstrou previamente que PS das macroalgas *Caulerpa prolifera* e *Caulerpa sertularioides* apresentam efeitos antilipogênico e antiadipogênico em nematoide *Caenorhabditis elegans* e em pré-adipócitos murinos 3T3-L1, respectivamente (Chaves Filho et al., 2020; 2022), porém, até o momento, não foram realizados estudos dessas atividades usando como modelo as células-tronco estromais humanas (hCTEs). Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma varredura para investigar o efeito antiadipogênico de amostras ricas em PS extraídas da macroalga verde *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*, utilizando hCTEs

como modelo alternativo aos pré-adipócitos murinos 3T3-L1 empregados em estudos anteriores (Chaves Filho et al., 2020; Chaves Filho et al., 2022).

Metodologia

Obtenção das amostras

A alga verde *C. cupressoides* var. *flabellata* foi coletada no litoral do Rio Grande do Norte e os procedimentos de identificação, secagem, despigmentação e obtenção dos PS por precipitação em solvente orgânico foram realizados em etapas anteriores a este estudo, seguindo o método descrito por Costa et al. (2012).

Cultivo celular

As células hCTEs foram obtidas em conformidade com os Comitês de Ética Nacional e Local (nº 508.459) e de acordo com os princípios da Convenção de Helsinque. Os cordões umbilicais foram coletados mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelas mães. Assim, as células foram isoladas da geleia de Wharton e cultivadas segundo uma adaptação do modelo aplicado no estudo de adipogênese com a linhagem 3T3-L1 (Chaves Filho et al., 2022). Após o isolamento, as células foram mantidas em meio basal (α MEM; Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (10 000 U/mL penicilina G e 25 μ g/mL estreptomicina, Gibco) e 1% de L-glutamina (Gibco), em atmosfera controlada (37 °C, 5% CO₂), com trocas de meio a cada 2–3 dias (Chaves Filho et al., 2022).

Avaliação da citotoxicidade in vitro

As células hCTEs foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços, contendo 100 μ L de meio basal e incubadas por 24 h (37 °C, 5% CO₂). Em seguida, o meio foi substituído por 100 μ L de meio basal contendo amostras ricas em PS (extrato total e frações 0.3, 0.5, 1.0 e 2.0), nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ g/mL. Como controle negativo, foram utilizadas células mantidas apenas em meio basal. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e foram adicionados 100 μ L de solução de MTT (1 mg/mL), seguida de incubação por 4 h. Posteriormente, o meio foi aspirado, e os cristais de formazana resultantes foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (BioTek Instruments, EUA). A porcentagem de metabolização do MTT foi calculada comparando-se a média das células tratadas com as amostras em relação ao controle negativo (100%).

Avaliação da atividade anti-adipogênica das amostras ricas em PS em hCTEs

A atividade antiadipogênica das amostras ricas em PS foi avaliada em hCTEs por coloração com Oil Red O a 0,2% (Sigma-Aldrich), seguindo uma adaptação do método descrito por Oliveira et al. (2018). Dessa forma, as células hCTEs foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços, cultivadas até atingirem 80% de confluência em meio basal. Após esse período, as células foram expostas às amostras (extrato total, F0.3, F0.5 e F1.0) diluídas em meio de indução (constituído por meio basal enriquecido com 1 μ M de dexametasona, 5 μ g/mL de insulina de pâncreas bovino e 60 μ M de indometacina) nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ g/mL. Como controle positivo, utilizaram-se células mantidas apenas no meio de indução, e como controle negativo, células cultivadas em meio

basal. As células foram mantidas por 21 dias, com trocas de meio a cada 2–3 dias. Ao final desse período, o meio foi retirado e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e fixadas em etanol 70%, por 1 h. Após fixação, as células foram lavadas com isopropanol 60% e coradas com Oil Red O 0,2%, conforme instruções do fabricante. A análise do acúmulo de lipídeos foi realizada em microscópio óptico invertido. Para a quantificação, o corante foi solubilizado em isopropanol 100% e a absorbância foi medida 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.). O teste de MTT foi realizado em triplicata, em 3 experimentos independentes, e a avaliação da atividade antiadipogênica foi realizada em triplicata em 1 experimento independente.

Resultados e Discussões

*As amostras ricas em PS de *C. cupressoides* var. *flabellata* não demonstraram citotoxicidade em hCTEs*

O efeito das amostras contendo PS de *C. cupressoides* sobre a viabilidade das células hCTE foi avaliado pelo ensaio de MTT (Figura 1). A porcentagem relativa de metabolização do MTT foi calculada por meio da comparação das médias das amostras em relação ao controle negativo (100%). Ao final de 24 h, não foi observado nenhum efeito citotóxico em hCTEs expostas às amostras com o extrato total (ET), frações F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0 nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p > 0.05$). Para a amostra F0.3, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, houve um pequeno aumento da proliferação celular (132 e 125%,), indicando um possível efeito proliferativo dessa amostra em hCTEs nas condições testadas ($p = 0,0062$ e $p = 0,0258$, respectivamente).

Os resultados obtidos no ensaio de MTT demonstraram que o extrato total e as frações de PS não apresentaram citotoxicidade significativa sobre hCTEs, após 24h de exposição, mesmo nas concentrações mais elevadas (50 $\mu\text{g/mL}$). Esse perfil de segurança é consistente com estudos prévios em células humanas, nos quais PS de *C. prolifera* e de *C. sertularioides* não reduziram a viabilidade de hCTEs em concentrações de até 10 $\mu\text{g/mL}$ e entre 1–20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, corroborando a baixa toxicidade dos PS de *C. cupressoides* (Chaves Filho et al., 2018; Chaves Filho et al., 2019).

A amostra F0.3, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou citotoxicidade e promoveu um aumento de 32% e 25%, respectivamente, na proliferação das hCTEs após 24 h, sugerindo um efeito proliferativo. Esse resultado é consistente com achados prévios utilizando PS de algas marinhas, como o fucoidan, que demonstrou ausência de toxicidade em células endoteliais humanas de veia umbilical (HUVECs) e, adicionalmente, favoreceu sua proliferação em ensaio de atividade angiogênica utilizando matrigel (Wen et al., 2023). A observação de um leve efeito proliferativo em hCTEs pode estar associada a diferenças estruturais entre os PS presentes nas frações, como variações no grau de sulfatação, composição monossacarídica ou padrão de ramificação, características conhecidas por

modular a interação dessas biomoléculas com receptores de superfície celular e componentes da matriz extracelular (Jen; Ng, 2024).

Portanto, diante do perfil não citotóxico nas condições testadas e do leve efeito proliferativo da amostra F0.3, foi realizada uma avaliação do potencial antiadipogênico dessas amostras.

O estudo preliminar da atividade antiadipogênica sugere efeito antiadipogênico das amostras F0.5 e F1.0 em hCTEs

O efeito antiadipogênico das amostras ricas em PS (ET, F0.3, F0.5 e F1.0) foi avaliado por meio de um estudo preliminar utilizando hCTEs expostas às amostras diluídas em meio de indução (meio com indutores adipogênicos) nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 µg/mL, durante 21 dias. No final desse tempo, a diferenciação adipogênica foi analisada por coloração com Oil Red O e quantificada em comparação ao controle positivo (células expostas apenas ao meio indutor, sem PS). Os resultados preliminares indicaram que todas as amostras testadas reduziram o acúmulo lipídico intracelular, sugerindo atividade antiadipogênica (Figura 2).

O ET e a amostra F1.0 apresentaram os efeitos similares, promovendo reduções de 39% e 32% na diferenciação adipogênica para o ET, e de 38% e 42% para a F1.0 (10 e 25 µg/mL, respectivamente). A amostra F0.5 apresentou redução em torno de 50% para todas as concentrações testadas, enquanto a F0.3 apresentou reduções de 47% e 38% nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente. A amostra F2.0 ainda não foi avaliada devido à contaminação dos poços durante o ensaio.

Apesar de promissores, esses resultados devem ser considerados preliminares, pois se baseiam em um único experimento, sendo necessárias repetições independentes para confirmar os efeitos observados. Ainda assim, o perfil antiadipogênico dos PS de *C. cupressoides* está de acordo com evidências anteriores de PS de algas marinhas, como os de *C. sertularioides*, que inibiram de forma significativa a diferenciação adipogênica das células 3T3-L1, reduzindo o acúmulo de lipídios e reprimindo a expressão de marcadores da adipogênese, incluindo PPAR γ , C/EBP α e C/EBP β (Chaves Filho et al., 2022).

Adicionalmente, os resultados semelhantes obtidos pelo ET e pela fração F1.0 sugerem que a atividade antiadipogênica pode estar relacionada com componentes presentes em ambas as amostras. No entanto, a investigação com amostras mais purificadas é relevante para identificar futuramente qual a molécula responsável pela atividade observada.

Portanto, os resultados do efeito antiadipogênico das amostras ricas em PS de *C. cupressoides* reforçam o potencial dessas moléculas como candidatas para o desenvolvimento de novas estratégias contra a obesidade, tendo em vista que os tratamentos disponíveis ainda apresentam limitações a nível de eficácia e segurança. A ausência de citotoxicidade nas condições avaliadas, aliada ao aparente efeito inibitório sobre a adipogênese de hCETs, sugere esses PS como possíveis alternativas promissoras para exploração em estudos futuros.

Conclusão

Embora estudos anteriores já tenham demonstrado efeito inibitório de PS sobre o processo de adipogênese, ainda não haviam sido realizadas investigações com PS extraídos da alga verde *C. cupressoides* em hCETs. Este estudo teve como objetivo preencher essa lacuna, avaliando

o efeito de amostras ricas em PS na diferenciação adipogênica de células humanas. Os dados experimentais preliminares indicam que os PS de *C. cupressoides* não apresentam citotoxicidade e têm potencial para reduzir a adipogênese. Contudo, são necessários mais estudos para confirmar esses resultados e sugerir uma aplicabilidade segura no desenvolvimento de novas abordagens voltadas ao manejo da obesidade.

Referências

Chaves Filho, GP; Batista, LANC.; Medeiros, SRB; Rocha, HAO.; Moreira, SMG. **Sulfated glucan from the green seaweed *Caulerpa sertularioides* inhibits adipogenesis through suppression of adipogenic and lipogenic key factors.** *Marine Drugs*, v. 20, p. 470, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md20080470>

Chaves Filho, G.P.; Gurgel de Sousa, A.F.; Viana, R.L.S.; Rocha, H.A.O.; Medeiros, S.R.B.; Moreira, S.M.G. **Osteogenic activity of non-genotoxic sulfated polysaccharides from the green seaweed *Caulerpa sertularioides*.** *Algal Research*, v. 42, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101546>.

Chaves Filho, GP; Gurgel de Sousa, AF; Câmara, RBG; Rocha, HAO; Medeiros, SRB; Moreira, SMG. **Genotoxicity and osteogenic potential of sulfated polysaccharides from *Caulerpa prolifera* seaweed.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p. 565-571, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.132>

Chaves Filho, GP; de Paula Oliveira, R; Medeiros, SRB. et al. **Sulfated polysaccharides from green seaweed *Caulerpa prolifera* suppress fat accumulation.** *Journal of Applied Phycology*, v. 32, p. 4299-4307, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02249-3>

Costa, M. S. S. P. et al. **Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*.** *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 5, p. 1159 1167, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9745-5>

Gasmi A, Mujawdiya PK, Nehaoua A, Shanaida M, Semenova Y, Piscopo S, Menzel A, Voloshyn V, Voloshyn O, Shanaida V, Bjørklund G. **Pharmacological Treatments and Natural Biocompounds in Weight Management.** *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 16, n. 2, p. 212, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph16020212>

Inic-Kanada, A.; Stein, E.; Stojanovic, M. et al. **Effects of iota-carrageenan on ocular *Chlamydia trachomatis* infection in vitro and in vivo.** *Journal of Applied Phycology*, v. 30, n. 6, p. 2601-2610, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1435-0>

JEN, C.-I.; NG, L.-T. **Physicochemical properties of different sulfated polysaccharide components from *Laetiporus sulphureus* and their anti-proliferative effects on MDA-MB-231 breast cancer cells.** *Journal of Fungi (Basel)*, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 457, 28 jun. 2024. DOI: 10.3390/jof10070457. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof10070457>

Manlusoc JKT, Hsieh CL, Hsieh CY, Salac ESN, Lee YT, Tsai PW. **Pharmacologic Application Potentials of Sulfated Polysaccharide from Marine Algae.** *Polymers (Basel)*, Basel, v. 11, n. 7, p. 1163, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym11071163>

Oliveira, RM., Câmara, RBG., Monte, JFS, Viana, RLS, Melo, KRT, Queiroz, MF, Filgueira, LGA, Oyama, LM, & Rocha, HAO. **Commercial Fucoïdians from *Fucus vesiculosus* Can Be Grouped into Antiadipogenic and Adipogenic Agents.** *Marine Drugs*, v. 16, n. 6, p. 193, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md16060193>

Tanna, B., & Mishra, A. **Nutraceutical Potential of Seaweed Polysaccharides: Structure, Bioactivity, Safety, and Toxicity.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 817–831, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12441>

Wen, W.; Yang, L.; Wang, X.; Zhang, H.; Wu, F.; Xu, K.; Chen, S.; Liao, Z. **Fucoïdan promotes angiogenesis and accelerates wound healing through AKT/Nrf2/HIF-1 α signalling pathway.** *International Wound Journal*, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 3606–3618, 18 maio 2023. DOI: 10.1111/iwj.14239. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iwj.14239>

World Obesity Federation. **World Obesity Atlas 2025: Overweight, obesity and non-communicable diseases.** London: World Obesity Federation, 2025. Disponível em: <https://data.worldobesity.org/publications/world-obesity-atlas-2025-v6.pdf>.

Anexos

Figura 1. Avaliação da citotoxicidade das amostras ricas em PS da *C. cupressoides* em hCTEs.

Figura 2. Avaliação da atividade antiadipogênica das amostras ricas em PS da alga *C. cupressoides* em hCTEs.

CÓDIGO: SB0618

AUTOR: MARIA EDUARDA DA SILVA RICARDO

COAUTOR: GIULIAN CÉSAR DA SILVA SÁ

COAUTOR: LUZIANE FERREIRA CAVALCANTI

COAUTOR: DALMO MONTEIRO DANTAS JUNIOR

COAUTOR: PEDRO VITOR VALE BEZERRA

ORIENTADOR: ADRIANA FERREIRA UCHOA

TÍTULO: Mecanismos de ação de extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Erythrina velutina* e *Amburana cearensis* contra *Aedes aegypti*: inibição enzimática e danos à membrana peritrófica.

Resumo

As arboviroses representam um grave problema de saúde pública, exigindo alternativas sustentáveis ao controle vetorial. Este estudo investigou os mecanismos de ação de extratos aquosos de sementes de *Anadenanthera colubrina* (angico), *Erythrina velutina* (mulungu) e *Amburana cearensis* (cumarú) contra larvas de *Aedes aegypti*. Os extratos foram obtidos por extração aquosa a quente (80 °C), com rendimentos de 18,2%, 15,7% e 12,4%, respectivamente. Os mecanismos avaliados foram a inibição da acetilcolinesterase (AChE) pelo método de Ellman e a indução de danos à membrana peritrófica intestinal, visualizados por meio de dissecação e marcação com carvão ativado. O extrato de *E. velutina* demonstrou inibição da AChE (58,4% $\pm$ 1,8%) e promoveu danos à membrana peritrófica em 62% das larvas, evidenciando um modo de ação larvicida dual. Os extratos de *A. colubrina* e *A. cearensis* também apresentaram alta inibição da AChE (70,3% e 65,1%), no entanto, os dados ainda não são conclusivos devido à interferência de pigmentos. Os danos à membrana peritrófica para estas espécies foram menos pronunciados (38% e 35%), essa diferença pode estar associada à mortalidade larval precoce observada para esses extratos. Conclui-se que os extratos, particularmente de *E. velutina*, possuem atividade larvicida multifatorial. Esses resultados validam o potencial da biodiversidade da Caatinga para o desenvolvimento de bioinseticidas multi-alvo, uma estratégia para o controle sustentável do *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Bioinseticida, Caatinga, Controle Vetorial, Acetilcolinesterase.

TITLE: Mechanisms of action of extracts of *Anadenanthera colubrina*, *Erythrina velutina* and *Amburana cearensis* against *Aedes aegypti*: enzymatic reinforcement and damage to the peritrophic membrane.

Abstract

Arboviruses represent a serious public health problem, requiring sustainable alternatives for vector control. This study investigated the mechanisms of action of aqueous extracts of *Anadenanthera colubrina* (angico), *Erythrina velutina* (mulungu), and *Amburana cearensis* (cumarú) seeds against *Aedes aegypti* larvae. The extracts were obtained by hot aqueous extraction (80 °C), with yields of 18.2%, 15.7%, and 12.4%, respectively. The mechanisms evaluated were the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by the Ellman method and the induction of damage to the intestinal peritrophic membrane, visualized by dissection and staining with activated charcoal. The *E. velutina* extract demonstrated AChE inhibition (58.4% ± 1.8%) and caused severe damage to the peritrophic membrane in 62% of larvae, demonstrating a dual larvicidal mode of action. The *A. colubrina* and *A. cearensis* extracts also showed high AChE inhibition (70.3% and 65.1%); however, the data are not yet conclusive due to pigment interference. The peritrophic membrane damage for these species was less pronounced (38% and 35%), a difference that may be associated with the early larval mortality observed for these extracts compared to *E. velutina*. We conclude that the extracts, particularly *E. velutina*, have multifactorial larvicidal activity. These results validate the potential of Caatinga biodiversity for the development of multi-target bioinsecticides, a promising strategy for the sustainable control of *Aedes aegypti*.

Keywords: Bioinsecticide, Caatinga, Vector Control, Acetylcholinesterase.

Introdução

As arboviroses representam um desafio crescente para a saúde pública global, com incidência ascendente e impacto em milhões de indivíduos (ALMEIDA et al., 2023). O Brasil registrou em 2024 o maior pico de casos das últimas décadas: um aumento alarmante de 273% nos casos de dengue (BRASIL, 2024). Projeções indicam surtos de magnitude comparável até 2026, especialmente em regiões metropolitanas com infraestrutura sanitária precária (WHO, 2025; ALMEIDA et al., 2025), sobrecarregando sistemas de saúde e a economia (CÔRTEZ et al., 2023). Essa disseminação acelerada está intrinsecamente ligada à biologia do vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), espécie com notória plasticidade adaptativa, hoje presente em todos os continentes exceto na Antártica (YANG et al., 2024).

Os inseticidas sintéticos (organofosforados, piretróides, carbamatos) permanecem como principal ferramenta de controle vetorial (SILVA, 2023), porém o controle químico de vetores enfrenta desafios críticos: riscos ambientais como persistência ecossistêmica e bioacumulação (KONKON, 2023), e crescente resistência (YINJUN et al., 2020; SABAR et al., 2023; WANG et al., 2023).

Embora vacinas como a Qdenga tenham sido recentemente incorporadas ao SUS (ANVISA, 2023), sua aplicação é limitada e insuficiente para controle isolado (ALMEIDA, 2024). Ademais, vacinas para chikungunya e zika permanecem em fase experimental (WRESSNIGG et al., 2020; TEBAS et al., 2021). Fatores antropogênicos amplificam o risco de surtos de arbovírus em regiões com baixa exposição prévia e emergência de novos arbovírus demandam estratégias inovadoras e sustentáveis de controle dos vetores (ROBERT et al., 2020; ROSSI, 2023).

Nesse cenário, inseticidas botânicos surgem como uma alternativa para complementar os programas de manejo de vetores. Derivados de mecanismos coevolutivos de defesa (WAR et al., 2012), os extratos das plantas agregam moléculas com múltiplos modos de ação – reduzindo o risco de resistência (SENE et al., 2021) – e vantagens como biodegradabilidade, baixa toxicidade a não-alvos e custo acessível (DEMARQUE et al., 2020). A Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro e um dos ecossistemas semiáridos mais biodiversos do planeta, apresenta espécies vegetais com estratégias bioquímicas únicas para sobreviver a estresses bióticos e abióticos extremos (CARVALHO et al., 2023). Essa adaptação evolutiva resulta em um repertório distinto de metabólitos primários e secundários (MARQUES, 2021; SÁ et al., 2022). Esse arsenal de defesa tem na fase larval do vetor um alvo prioritário (SÁ et al., 2023).

Estudos preliminares identificaram atividade larvicida em extratos aquosos de sementes de *Anadenanthera colubrina* (angico), **Erythrina velutina** (mulungu) e *Amburana cearensis* (cumaru) (BEZERRA, 2022), mas seus mecanismos moleculares permanecem não elucidados. Este estudo investigou os mecanismos subjacentes à atividade larvicida previamente documentada de extratos aquosos, dentre os múltiplos modos de ação associados a bioinseticidas vegetais (RIAZ et al., 2023; APARNA et al., 2021; MEIHONG et al., 2021). Com base nos perfis dos metabólitos das plantas este trabalho se concentrou em dois eixos estratégicos: na neurotoxicidade via inibição da AChE, que pode levar a distúrbios no sistema nervoso das larvas, afetando sua capacidade de se alimentar, se movimentar e sobreviver (SEO et al., 2015) e no efeito antinutricional por desregulação da membrana peritrófica, estrutura que desempenha um papel crucial na digestão e metabolismo das larvas (BALTAR et al., 2022). A compreensão desses mecanismos de ação dos extratos permitirá o desenvolvimento de novas abordagens para o controle sustentável do *Aedes aegypti*.

Justificamos que houve uma mudança na proposta original em virtude de novas perguntas e disponibilidade de reagentes para avaliação da hipótese. Portanto foram feitos ajustes que permitiram que o processo de investigação da atividade larvicida dos extratos fosse realizado quanto a modos de ação.

Metodologia

Espécies

vegetais

As sementes de cumaru (*Amburana cearensis*), mulungu (*Erythrina velutina*) e angico-branco (*Anadenanthera colubrina*) foram obtidas por doação do Banco de Sementes da Floresta Nacional (Flona) de Nísia Floresta (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio), localizada no município de Nísia Floresta, Rio Grande do Norte. As sementes recebidas foram armazenadas em embalagens herméticas à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) até o início dos experimentos.

Obtenção e manutenção de *Aedes aegypti*

Os mosquitos e larvas de *Aedes aegypti* foram provenientes da colônia no Laboratório de Entomologia Médica (LABENT-UFRN), do Centro de Biociências da

Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para renovação da colônia foram colocadas ovitrampas em diversos pontos no Campus Universitário da UFRN. Os ovos coletados semanalmente em palhetas foram transportados ao LABENT. As palhetas foram transferidas para recipientes plásticos (18 cm x 13 cm x 11 cm) e submersas em água desclorada. As larvas eclodidas foram alimentadas com uma dieta de levedo de cerveja e farinha de arroz (25% e 75%, m/m) (SCHOOR et al., 2020) até a fase de pupa. Nesta fase os mosquitos foram identificados em microscópio estereoscópico conforme espécie e separados nas gaiolas de reprodução (50 cm x 50 cm x 50 cm) das colônias. As gaiolas foram mantidas sob temperatura constante de 27 °C, umidade de 50%-70% e fotoperíodo natural em incubadora tipo BOD. Os mosquitos, machos e fêmeas, foram alimentados com solução de sacarose (10%). Sangue de carneiro (*Ovis aries*) foi oferecido às fêmeas para o repasto sanguíneo 4 vezes na semana através de um sistema de alimentação artificial (ANJOLETTE, MACORIS, 2016).

Extração

aquosa

As sementes de *A. cearensis*, *E. velutina* e *A. colubrina* tiveram seus tegumentos removidos e foram trituradas em moinho elétrico e tamisadas em peneira com trama de 40 mesh até obtenção de um pó de granulação fina e homogênea. Extrações aquosas a quente das farinhas ocorreram através da homogeneização do pó de cada semente em água destilada, na relação de hidromódulo de 1:10 (p/v). A extração foi mantida em banho-maria a 80 °C por 3h30, empregando agitação mecânica a cada 30 minutos. Posteriormente, os extratos foram submetidos à centrifugação (8000 x g, 4 °C, 1h). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo de poro médio, enquanto o sedimentado foi submetido a uma reextração sob as mesmas condições. Os precipitados finais foram descartados e os sobrenadantes de ambas as extrações foram unidos (relação de hidromódulo 1:20 p/v), armazenados a frio (-20 °C) e liofilizados.

Determinação

da

concentração

O rendimento dos extratos foi determinado pelo peso seco após liofilização de alíquotas de 5,0 mL. O peso total obtido foi dividido por 5 mL para estimar o peso em mg para cada mL. Por fim, o peso seco foi determinado pela multiplicação do peso em mg obtido (equivalente em massa de 1mL) pelo volume total do sobrenadante da extração. O rendimento total (%) foi calculado como a razão entre a massa total do extrato liofilizado e a massa inicial de farinha.

Deteção da inibição de acetilcolinesterase em larvas de *A. aegypti*

Para determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) e avaliação da potencial atividade inibidora dos extratos sobre AChE foi realizado o método colorimétrico de Ellman e colaboradores (1961), com algumas adaptações. Este método é baseado na produção de tiocolina derivado da hidrólise do substrato acetiltiocolina, monitorada pela reação contínua do tiol com o reagente 5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB) para produzir o ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico, que apresenta coloração amarela e pode ser monitorado pela absorbância a 412 nm (Ellman et al., 1961). Para os ensaios de inibição in vitro da AChE das larvas, foi desenvolvido a metodologia de Pontual e colaboradores (2012), em que grupos de 50 larvas L4 foram imobilizadas em placas de gelo à 4 °C por 10 min. Em seguida, as larvas foram homogeneizadas em 1 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M.

Os homogenados foram centrifugados a $9.000 \times g$, a 4°C durante 15 min e o sobrenadante contendo a AchE larval foi reservado e identificado. A detecção da atividade da AChE foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços, onde foi aplicado um volume de homogenato contendo o equivalente a $37 \mu\text{g}$ de proteína, incubado com acetiltiocolina $0,062 \text{ M}$ ($20 \mu\text{l}$) e DTNB $0,25 \text{ mM}$ ($200 \mu\text{l}$) por 3 min a 25°C , na presença ou ausência dos extratos. Uma Unidade Inibitória (UI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância (412 nm) da amostra, em relação à leitura do controle.

Avaliação da desregulação da membrana peritrófica em larvas de *A. aegypti*.

Para avaliar a capacidade dos extratos de danificar a estrutura e desregular a permeabilidade da membrana peritrófica de larvas de *A. aegypti*, esta seção seguiu o método aplicado por De Almeida e colaboradores (2021). Grupos de 20 larvas L4 foram expostas durante 48 h às doses letais LC_{50} de *Anadenanthera colubrina*, *Amburana cearensis* e *Erythrina velutina* determinadas por Bezerra (2022) sendo respectivamente $0,002 \text{ mg/mL}$, $0,23 \text{ mg/mL}$ e $1,87 \text{ mg/mL}$ contendo carvão ativado $0,01\%$ (p/v). As larvas sobreviventes foram lavadas com água destilada e seus intestinos dissecados com auxílio de agulhas e pinças entomológicas. Os intestinos dissecados foram transferidos para uma solução de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (5 mL) e imediatamente fotografados em estereomicroscópio (Stemi 508, AxioCam ERc 5s, Zeiss, Alemanha). A integridade da membrana peritrófica foi avaliada de acordo com a presença de carvão ativado dentro do lúmen intestinal.

Análises

estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em replicatas biológicas ($n=3$) e experimentais ($n=3-5$). As análises estatísticas foram desenvolvidas no programa GraphPad Prism 9.4.0 (Graphpad Software Inc, EUA) e os testes foram escolhidos de acordo com os dados obtidos.

Resultados e Discussões

Foram produzidos extratos aquosos a quente (80°C) de sementes de *Anadenanthera colubrina*, *Erythrina velutina* e *Amburana cearensis*, com rendimentos de $18,2\%$, $15,7\%$ e $12,4\%$, respectivamente (**Tabela 1**). A triagem fitoquímica preliminar confirmou a presença de alcalóides em todas as espécies, flavonoides predominantes em *E. velutina* e taninos em maior concentração em *A. colubrina*. Nos bioensaios de inibição da acetilcolinesterase (AChE), *E. velutina* apresentou $58,4\% \pm 1,8\%$ de inibição confirmada, sem interferência de pigmentos. Para *A. colubrina* e *A. cearensis*, os dados preliminares indicaram $70,3\%$ e $65,1\%$ de inibição, respectivamente, porém com interferência cromática residual mesmo após dupla centrifugação ($9.000 \times g$), necessitando validação adicional. O controle positivo (DDVP) atingiu $95,6\%$ de inibição (**Tabela 2**).

Na avaliação de danos à membrana peritrófica, *E. velutina* destacou-se com 62% das larvas exibindo alteração significativa ($p < 0,05$), enquanto *A. colubrina* (38%) e *A. cearensis* (35%) mostrando efeitos menos significativos sobre a membrana peritrófica (**Tabela 3**). A análise morfológica revelou rompimentos estruturais da membrana peritrófica nas larvas tratadas com *E. velutina*, caracterizados por extensa extravasação de conteúdo intestinal, perda da integridade estrutural da

membrana e presença de grânulos de carvão ativado dispersos no hemocelo. Em contraste, os tratamentos com *A. colubrina* e *A. cearensis* exibiram predominantemente danos parciais, incluindo desorganização da camada quitinosa, microperfurações localizadas e adesão anormal de partículas à superfície da membrana. Ressalta-se que a mortalidade larval precoce nas concentrações testadas dessas duas espécies pode ter mascarado danos mais extensos à membrana peritrófica, uma vez que larvas que morrem precocemente não desenvolvem plenamente as alterações morfológicas características do comprometimento da membrana. Este fato sugere a necessidade de ajustes na concentração para melhor avaliação desse parâmetro, possivelmente utilizando concentrações subletais que permitam maior tempo de exposição para o desenvolvimento completo das alterações morfológicas (**Figura 1**).

A confirmação do mecanismo dual em *E. velutina* – inibição enzimática (58,4%) associada à ruptura da membrana peritrófica (62%) – posiciona esta espécie como modelo estratégico para bioinseticidas multi-alvo (**Tabela 4**). Este perfil alinha-se a estudos sobre a sinergia entre alcalóides pirrolizidínicos e lectinas termoestáveis em *Fabaceae* (Rafif Khairullah Aswinet al., 2022) onde compostos neurotóxicos induzem paralisia, enquanto proteínas ligantes de quitina comprometem a função intestinal. Para *A. colubrina*, a alta inibição preliminar da AChE (70,3%) sugere ação de taninos condensados, conhecidos por sua capacidade de bloquear sítios ativos enzimáticos em vetores (Wei-Ming Chai et al., 2018). A interferência cromática, no entanto, exige técnicas de purificação complementares para validação definitiva. Quanto aos danos limitados à membrana peritrófica em *A. colubrina* e *A. cearensis*, hipotetiza-se que a mortalidade larval acelerada tenha reduzido a exposição ao efeito antinutricional, indicando que futuros ensaios devem utilizar concentrações doses subletais de 30% da LC50 para avaliação desse mecanismo (Gözde Güney et al., 2024).

Os desafios metodológicos, como disponibilidade de larvas (apenas 65% dos bioensaios concluídos) e interferência de pigmentos, não invalidam as tendências observadas. Pelo contrário, reforçam a complexidade da interação entre metabólitos vegetais e fisiologia do vetor. A extração aquosa a 80 °C mostrou-se inovadora ao concentrar compostos termoestáveis, ex.: alcalóides, taninos e eliminar interferentes de métodos salinos, permitindo a detecção de inibição da AChE – um avanço não reportado em estudos prévios com essas espécies (Mariusz Wądrzyk et al., 2024).

Conclusão

Conclui-se que os extratos aquosos da Caatinga, particularmente *E. velutina*, demonstram um perfil mecanístico dual e adaptável às demandas do controle vetorial sustentável. A correlação entre triagem fitoquímica preliminar e bioatividade valida a importância da biodiversidade brasileira no combate às arboviroses, abrindo caminho para bioprospecção orientada por alvos moleculares.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Anvisa aprova nova vacina contra a dengue. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>. Acesso em: 11 Junho 2025.

ALMEIDA, F. P. et al. DENGUE: uma breve revisão bibliográfica sobre vacinas. Revista Foco, v. 17, n. 4, p. e4836, 2024.

ANJOLETTE, A. F. F.; MACORIS, M. D. L. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista, n. 13, v. 156, p. 19-29, 2016.

ASWIN, R.; TRIDIGANITA, I.; ARIF, N.; GAVRILA, A.; DINA, D.; GABRIELLE, A. *Abrus precatorius*: A comprehensive insight into the phytochemical, pharmacological, therapeutic activities and safety. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, v. 12, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.22270/jddt.v12i1.5173>.

BALTAR, J. M. da C. Diversidade da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em áreas com diferentes paisagens do Rio de Janeiro. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

BARBOSA, P. B. B. M. et al. Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. Parasitology Research, v. 113, p. 3565-3580, 2014.

BARROSO, J. F. S. et al. Plant-based attractants for *Aedes aegypti* control: advances and perspectives. Journal of Pest Science, v. 93, p. 63-76, 2020.

BEZERRA, P. V. V. Atividade larvicida e inibição in vitro de proteases intestinais de *Aedes aegypti* por extratos de sementes de plantas da caatinga. 2022. 48 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BRADFORD, M. 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, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe Semanal nº07: Dengue, Chikungunya e Zika. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arboviroses/informe-semanal>. Acesso em: 11 jun. 2025.

DE ALMEIDA, W. A. et al. Effects of *Plectranthus barbatus* leaf extract on survival, digestive proteases, midgut morphophysiology and gut microbiota homeostasis of *Aedes aegypti* larvae. South African Journal of Botany, v. 141, p. 116-125, 2021.

DEMARQUE, D. P. et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 1051, 2020.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

FREEDMAN, D. O. A new dengue vaccine (TAK-003) now WHO recommended in endemic areas; what about travellers? *Journal of Travel Medicine*, v. 30, n. 7, taad132, 2023.

GERSHENZON, J.; ULLAH, C. As plantas protegem-se dos herbívoros otimizando a distribuição das defesas químicas. *PNAS*, v. 119, n. 4, e2120277119, 2022.

GIRARD, M. et al. Arbovírus: uma ameaça global à saúde pública. *Vacina*, v. 38, p. 3989-3994, 2020.

KONKON, A. K. et al. Status de resistência aos inseticidas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no sul do Benin, África Ocidental. *Medicina Tropical e Saúde*, v. 51, n. 1, p. 22, 2023.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

PONTUAL, E. V. et al. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 79, n. 3, p. 135-152, 2012.

POSSEL, R. D. ATIVIDADE INSETICIDA E REPELENTE DE PLANTAS DO CERRADO NO CONTROLE ALTERNATIVO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*. 2019. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2019. Disponível em: <http://repositorio.uft.edu.br/bitstream/11612/1280/1/Richard%20Dias%20Possel%20-%20Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2025.

ROBERT, M. A.; STEWART-IBARRA, A. M.; ESTALLO, E. L. Mudanças climáticas e emergência viral: evidências de arbovírus transmitidos por *Aedes*. *Current Opinion in Virology*, v. 40, p. 41-47, 2020.

ROSSI, B. et al. Human Arboviral infections in Italy: Past, current, and future challenges. *Viruses*, v. 15, n. 2, p. 368, 2023.

SÁ, G. C. da S. et al. Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides an alternative for its management? *Journal of Pest Science*, v. 95, p. 1-20, 2022.

SÁ, G. C. da S. et al. *Tephrosia toxicaria* (Sw.) Pers. extracts: Screening by examining aedicial action under laboratory and field conditions along with its antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial activities. *PLOS ONE*, v. 18, n. 1, e0275835, 2023.

SABAR, N. et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Malaysia (2010 to 2022): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 16, n. 10, p. 434-445, 2023. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.378561>.

SCHOOR, T. V. et al. Impacts of dietary nutritional composition on larval development and adult body composition in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Insects*, v. 11, n. 8, p. 535, 2020.

SENE, N. M. et al. Status e mecanismos de resistência aos inseticidas nas populações de *Aedes aegypti* do Senegal. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 3, e0009193, 2021.

SEO, S. et al. Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus* and formulation development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 45, p. 9977-9986, 2015.

SILVA, L. B. 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. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

TEBAS, P. et al. Segurança e imunogenicidade de uma vacina de DNA anti-vírus Zika. *The New England Journal of Medicine*, v. 385, n. 12, p. e35, 2021.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. da. Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2015.

VIANA, M. M.; GOES, A. M. de; MARTINS, R. P. Defesas químicas de plantas contra herbívoros: uma abordagem ecológica. *Química Nova*, v. 41, n. 6, p. 702-711, 2018.

VIEIRA, R. S. et al. Plantas do Cerrado com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. *Ensaios e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 27, n. 2, p. 222-230, 2023.

WĄDRZYK, M.; PLATA, M.; KORZENIOWSKI, Ł.; JANUS, R.; LEWANDOWSKI, M. Rumo à valorização sustentável do bagaço de groselha preta: investigação da extração com água quente combinada com liquefação hidrotérmica. *Energia Renovável*, v. 122117, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.122117>.

WANG, Y. et al. Resistência a inseticidas: status e mecanismos potenciais em *Aedes aegypti*. *Bioquímica e fisiologia de pesticidas*, v. 195, 105577, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105577>.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito repellents. Geneva: WHO, 2009. (WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4).

WRESSNIGG, N. et al. Single-shot live-attenuated chikungunya vaccine in healthy adults: a phase 1, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 10, p. 1193-1203, 2020.

YANG, X. et al. Global burden for dengue and the evolving pattern in the past 30 years. *Journal of Travel Medicine*, v. 28, n. 8, taab146, 2021.

YINJUN, F. et al. Evidence for sequential mutations and recombination in the evolution of kdr alleles in *Aedes aegypti*. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 14, n. 7, e0008154, 2020.

Anexos

tabela 2: Inibição da atividade acetilcolinesterase (AChE) por extratos aquosos (100 µg/mL) avaliada pelo método de Ellman. Nota: Os valores de *A. colubrina* e *A. cearensis* necessitam confirmação adicional devido à interferência cromática residual.

Tabela 1: Rendimento de extração e concentração de extratos aquosos liofilizados de sementes de espécies da Caatinga. Os valores de rendimento representam a média de três replicatas independentes ($\pm DP < 5\%$).

Tabela 3: Avaliação de danos à membrana peritrófica em larvas de *Aedes aegypti* expostas às concentrações letais (LC50) dos extratos por 48 horas. Controle negativo: água destilada.

tabela 4 : Síntese comparativa dos parâmetros de atividade larvicida dos extratos vegetais. Valores de LC50 determinados em bioensaios de 48 horas.

Figura 1: Danos morfológicos à membrana peritrófica em larvas de *Aedes aegypti* após exposição aos extratos. Os números individuais (controle: 27; Mulungu: 45; Angico: 8; Cumaru: 14) é a numeração sequencial de cada larva dissecada durante os experimentos.

CÓDIGO: SB0624

AUTOR: LÍVIA MARIA CARNEIRO SOARES

COAUTOR: RAQUEL LÚCIA SOUTO DE ARAÚJO

COAUTOR: THAIS PRISCILA LIMA SILVA

COAUTOR: JANINE INEZ ROSSATO

COAUTOR: JOHSEPH PABALLO GOMES DE SOUZA

ORIENTADOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

TÍTULO: Caracterização eletrofisiológica do processo de extinção

Resumo

O aprendizado de extinção permite que respostas comportamentais previamente adquiridas, como o medo, sejam ajustadas frente a mudanças no ambiente. No condicionamento pavloviano, um estímulo inicialmente neutro, ao ser pareado com um estímulo aversivo, passa a provocar resposta de medo. A extinção, dependente de erro de previsão, não elimina a memória original, mas estabelece um novo aprendizado inibitório. A tarefa de esquiva inibitória foi utilizada como modelo para estudar a memória aversiva em roedores, onde o tempo de descida da plataforma para a grade foi avaliado ao longo das sessões, que são realizadas na ausência de choque. Ratos Wistar machos com implantes de microeletrodos no hipocampo para registro da atividade elétrica cerebral foram submetidos à tarefa. Nossos dados indicam que a memória de medo pode ser extinta em uma única sessão e que a descida da plataforma no momento da extinção é acompanhada por um aumento do acoplamento de oscilações teta e de alta frequência. Nossos achados destacam esse acoplamento como possível biomarcador eletrofisiológico da extinção.

Palavras-chave: Extinção. Acoplamento teta-alta frequência. Hipocampo.

TITLE: Electrophysiological characterization of the extinction process

Abstract

Extinction learning allows previously acquired behavioral responses, such as fear, to be adjusted in the face of environmental changes. In Pavlovian conditioning, an initially neutral stimulus, when paired with an aversive stimulus, comes to elicit a fear response. Extinction, which depends on prediction error, does not erase the original memory but instead establishes a new inhibitory learning. The inhibitory avoidance task was used as a model to study aversive memory in rodents, in which the latency to step down from the platform to the grid was evaluated across sessions performed in the absence of shock. Male Wistar rats with hippocampal microelectrode implants for recording brain electrical activity were subjected to the task. Our data indicate that fear memory can be extinguished in a single session and that stepping down from the platform at the moment of extinction is accompanied by an increase in theta-high-frequency coupling. Our findings highlight this coupling as a potential electrophysiological biomarker of extinction.

Keywords: Extinction. Theta–high-frequency coupling. Hippocampus.

Introdução

O medo é uma das respostas de sobrevivência mais importantes para os seres vivos. Por isso, formas de aprendizagem baseadas no medo têm sido amplamente investigadas, trazendo avanços significativos para a neurobiologia do aprendizado e da memória (IZQUIERDO et al., 2016). Em animais, o aprendizado pavloviano e o instrumental são amplamente usados para estudar o medo. No condicionamento pavloviano, um estímulo condicionado (CS), inicialmente neutro (como um som), é apresentado junto a um estímulo incondicionado (US), como um choque elétrico. Após a associação CS–US, o som passa a evocar uma resposta condicionada de medo (PAVLOV, 1927; DVIR et al., 2019). A resposta de medo é alterada pela ausência de reforço, ou seja choque. A resposta de medo diminui, o que caracteriza a extinção. A extinção é crucial para permitir que comportamentos aprendidos se ajustem a novos contextos (IZQUIERDO et al., 2006). Embora pareça apagar o aprendizado anterior, a extinção trata-se de um novo aprendizado que inibe a resposta prévia (RESCORLA, 2001; BOUTON, 2017).

Evidências mostram que o aprendizado original (pavloviano) gera a resposta, enquanto que o da extinção inibe a resposta. Para que a extinção ocorra, é necessário um erro de previsão: no contexto de extinção, a ausência ou redução do US em relação ao esperado promove a inibição da resposta. (BOUTON et al., 2020; RESCORLA, 2006). Segundo Rescorla (2001), aumentar a discrepância entre expectativa e realidade pode fortalecer o aprendizado da extinção.

A tarefa de esquiva inibitória (EI) é amplamente utilizada para investigar o aprendizado aversivo (IZQUIERDO et al., 2016), baseando-se na tendência exploratória de roedores diante de novos ambientes (JABLONSKI et al., 2013). No treino, o animal é colocado em uma caixa e recebe choque nas patas ao descer de uma plataforma; no teste, avalia-se o tempo que permanece na plataforma (CAMMAROTA et al., 2003). Altas latências indicam boa retenção, e baixas, pouca retenção ou amnésia (GOLD, 1986). Testes repetidos sem choque levam à extinção da resposta (VIANNA et al., 2001).

A EI envolve aprendizado pavloviano, em que o choque (US) e o contexto (CS) são pareados, evocando resposta aversiva no teste. Durante o teste, podem ocorrer comportamentos como congelamento, alongamento, grooming, rearing e avaliação de risco (GOLD, 1986). A EI é uma tarefa dependente de hipocampo, onde os indivíduos aprendem em uma única sessão de treino, isso permite investigar as diferentes fases do processamento mnemônico associado a ela (ABEL; LATTAL, 2001; MCGAUGH; SHAW, 1990).

A atividade oscilatória cerebral também influencia a recuperação de memórias de extinção, coordenando interações entre regiões cerebrais durante tarefas cognitivas e comportamentais (FRIES, 2015). Várias regiões encefálicas participam do do aprendizado de extinção, de particular importância, o hipocampo. A literatura sugere, que no hipocampo há aumento do acoplamento teta–gama (RADISKE et al., 2020; TORT et al., 2009), além de maior sincronia entre hipocampo e outras estruturas. Esses achados indicam papel crítico das oscilações regiões encefálicas, particularmente envolvendo o hipocampo, embora ainda não haja definição de uma assinatura eletrofisiológica específica para a extinção da memória de evitamento.

Metodologia

Sujeitos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 300 e 350 g. Os animais foram mantidos em caixas-moradia individualmente após a cirurgia, com temperatura e umidade controladas, água e comida ad libitum, e sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados durante o período claro do ciclo e todos os procedimentos estiveram de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de uma matriz de microeletrodos de 32 canais sem cânulas-guia, para aquisição do sinal eletrofisiológico. Para a confecção, foram utilizados fios de tungstênio de 30 μm e cânulas de aço inoxidável de 0,2 mm de calibre, conforme descrito por Rossato et al. 2019 e Ramanathan et al. 2018.

Para o implante da matriz, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica nas seguintes coordenadas: CA1 do hipocampo: AP -4,2 mm, ML $\pm$ 2,4 mm, DV -3,0 mm; Paxinos e Watson, 2006.

Tarefa comportamental

Foi utilizada a tarefa de esquivas inibitória (step-down). O aparato consiste em uma caixa metálica (50 $\times$ 25 $\times$ 25 cm) com piso composto por barras de bronze (1 mm de diâmetro, espaçadas em 1 cm) e uma plataforma de madeira (7 $\times$ 25 cm) em uma das extremidades.

- Treino: o animal foi colocado na plataforma, voltado para a parede oposta à grade. Ao descer e tocar a grade com as quatro patas, recebia um choque elétrico (0,4 mA por 2 s), sendo imediatamente retirado e devolvido à gaiola moradia.
- Extinção (24h após o treino): os animais foram novamente colocados na plataforma e foi avaliado o tempo de latência para descer da mesma (máx. 600 s). Quando o animal descia, iniciava-se a sessão de extinção, na qual o animal podia explorar livremente o aparato por 300 s sem receber choque.
- Teste (48h após o treino): os animais foram novamente colocados sobre a plataforma e foi avaliado o tempo de descida para a grade. Assim que o animal descia da plataforma ele era retirado do aparato comportamental.

Na figura 1 pode-se observar o desenho do protocolo experimental.

Eletrofisiologia

A atividade elétrica encefálica foi registrada utilizando o sistema de aquisição de dados CerePlex Direct (Blackrock Microsystems LCC, Utah, EUA). Os sinais das single-units

foram amplificados ($\times 10.000$), digitalizados (30 kHz) e armazenados em um computador para análise posterior. Os sinais LFP (local field potential) foram adquiridos na frequência de amostragem de 30 kHz e filtrados com passa-banda entre 0,3 e 500 Hz.

Análise dos dados

A análise dos dados coletados foi realizada com rotinas personalizadas escritas em Python. Foi utilizado o método do periodograma de Welch (com janelas de Hamming de 3 s e sobreposição de 75%) para computação de espectros de potência, filtrados nas bandas teta (5–10 Hz), beta (12–30 Hz) e gama (30–80 Hz) e armazenados para análises posteriores. Para avaliar as oscilações nas bandas de frequência analisadas durante a tarefa EI, as sessões de teste e extinção tiveram sua potência normalizada utilizando os dados de uma sessão basal de cada sujeito.

Resultados e Discussões

O aprendizado de extinção permite que respostas comportamentais previamente adquiridas, como o medo, sejam ajustadas frente a mudanças no ambiente. No condicionamento pavloviano, um estímulo inicialmente neutro, ao ser pareado com um estímulo aversivo, passa a provocar resposta de medo. A extinção, dependente de erro de previsão, não elimina a memória original, mas estabelece um novo aprendizado inibitório.

A tarefa de esquia inibitória é um modelo amplamente utilizado para estudar memória de medo em roedores. Nela a inferência da memória é feita nas sessões de teste pela mensuração do tempo que os animais passam sobre a plataforma antes de descender para a grade. Repetidos testes sem punição levam à extinção da resposta aversiva. Neste estudo, ratos Wistar machos receberam implantes de microeletrodos no hipocampo para registro da atividade elétrica cerebral. Após a recuperação, os animais foram treinados na esquia inibitória e passaram pelo protocolo de extinção descrito previamente e foram testados. As oscilações hipocámpais foram registradas ao longo da sessão de extinção e na sessão de teste.

Para testar o protocolo de extinção, os animais foram treinados com um choque elétrico de 0,4 mA. Um grupo foi submetido ao protocolo de extinção, enquanto o outro permaneceu em suas caixas-moradia. Os animais foram testados 24 h ou 48 h após o treino, e a latência para descer da plataforma foi registrada. Os dados da figura 2 são apresentados como mediana e intervalo interquartil; $n = 8$ –11 animais por grupo. Nossos resultados mostram que a extinção ocorre em uma única sessão comportamental. No dia do teste, os animais foram divididos em dois grupos, um que não passou pela extinção (barras cinzas) e um que passou pela extinção (barras vermelhas). A memória de extinção é evidenciada em um teste 48 h após o treino.

- **Treino $\times$ Teste 48h (Sem Extinção)** – aumento significativo da latência no grupo sem extinção (Wilcoxon pareado, $p = 0,0078$), confirmando aquisição da memória aversiva.
- **Teste 48h (Sem Extinção) $\times$ Teste 48h (Extinção)** – latência significativamente menor no grupo Extinção (Mann–Whitney U, $p = 0,0035$), evidenciando efeito da extinção na atenuação da resposta de esquia.

• **Treino × Teste 24h (Extinção)** – aumento significativo da latência no grupo Extinção (Wilcoxon pareado, $p = 0,0010$), indicando que, nesse momento intermediário, ainda há presença de resposta de medo.

Esses resultados confirmam que o protocolo adotado induz memória aversiva robusta no grupo Sem Extinção e que a manipulação experimental reduz a resposta de esquiva no grupo Extinção. Além disso, a persistência de latências elevadas no teste de 24h pós-extinção no grupo Extinção reforça a ideia de que o processo de extinção envolve etapas dinâmicas, inicialmente demandando tomada de decisão sob ameaça presumida e, posteriormente, permitindo a reavaliação do contexto como seguro.

Durante a sessão de extinção, na qual o animal é colocado sobre a plataforma e ele desce, observamos que o acoplamento fase–amplitude entre oscilações teta e de alta frequência (HFO) no hipocampo variou de acordo com o momento comportamental (Figura 3). A análise dos comodulogramas revelou aumento claro da modulação teta–HFO no intervalo imediatamente anterior à descida (5–0 s), em comparação com o período de 10–5 s prévio. Esse efeito foi confirmado pela análise estatística do índice de modulação (MI) normalizado (Figura XX), que mostrou diferença significativa entre os intervalos (teste de Friedman, $\chi^2 = 17,54$, $p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn indicou que o MI foi significativamente maior em 5–0 s antes do step-down em relação a 10–5 s antes (** $p < 0,001$) e também em relação ao intervalo de 0–5 s após (* $p < 0,01$). Esses resultados sugerem que o aumento do acoplamento teta–HFO precede a resposta de esquiva, possivelmente refletindo maior demanda de processamento avaliativo diante da ameaça.

Além disso, a análise de regressão linear entre o MI normalizado e a razão de latência Reteste/Teste revelou associação positiva significativa (Figura 3c; $R^2 = 0,649$, $p = 0,031$). Esse achado indica que animais com maior acoplamento teta–HFO durante o momento crítico da extinção apresentaram maior manutenção da resposta de esquiva no reteste, sugerindo que a atividade oscilatória hipocampal pode prever a persistência da memória aversiva.

(a) Representação esquemática dos estados comportamentais durante os intervalos de 10–5 s antes, 5–0 s antes e 0–5 s após o step-down, acompanhada pelos comodulogramas correspondentes (frequência de fase × amplitude).

(b) Índice de modulação (MI) teta–HFO normalizado nos três intervalos comportamentais mostrados em (a). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). O teste de Friedman revelou efeito significativo ($\chi^2 = 17,54$, $p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn com correção de Bonferroni indicou diferença significativa entre 10–5 s antes e 5–0 s antes (** $p < 0,001$) e entre 5–0 s antes e 0–5 s após (* $p < 0,01$).

(c) Regressão linear entre o MI normalizado e a razão Reteste/Teste. Observou-se associação positiva significativa ($R^2 = 0,649$, $p = 0,031$), indicando que maiores valores de modulação teta–HFO estão relacionados a uma maior razão de latência no reteste, refletindo um comportamento de esquiva sustentado.

Conclusão

Nosso estudo destaca o acoplamento teta-HFO como um promissor marcador eletrofisiológico para a memória de extinção. Essas descobertas ajudam a preencher uma lacuna crítica na nossa compreensão dos mecanismos neurais subjacentes à aprendizagem de extinção aversiva. Pesquisas futuras irão explorar se interrupções nesse mecanismo de acoplamento afetam a aquisição e a recordação da memória de extinção, potencialmente oferecendo insights mais profundos sobre a base neural dos transtornos de memória traumática.

Referências

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 11(2):180-7, 2001.

BOUTON ME, THRAILKILL EA, TRASK S, ALFARO F. Correction of response error vs. stimulus error in the extinction of discriminated operant learning. *J Exp Psychol Anim Learn Cogn* 46: 398–407, 2020.

BOUTON, Mark E.; WOODS, A. M. Extinction: Behavioral mechanisms and their implications. *Learning and memory: A comprehensive reference*. Oxford: Academic Press, v. 2, p. 61-83, 2017.

BROWN, Alexa; VILLARUEL, Franz R.; CHAUDHRI, Nadia. Neural correlates of recall and extinction in a rat model of appetitive Pavlovian conditioning. *Behavioural Brain Research*, v. 440, p. 114248, 2023.

CAMMAROTA, Martín et al. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallation of an extinguished conditioned fear response. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 737-741, 2003.

DVIR, Maor et al. Fear conditioning and extinction in anxious and non-anxious youth: A meta-analysis. *Behaviour research and therapy*, v. 120, p. 103431, 2019.

FRIES, P. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron* 88, 220–235 628, 2015.

GOLD, Paul E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral & Neural Biology*, 1986.

IZQUIERDO, Iván; BEVILAQUA, Lia RM; CAMMAROTA, Martín. A arte de esquecer. *estudos avançados*, v. 20, p. 289-296, 2006.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane RG; MYSKIW, Jociane C. Fear memory. *Physiological reviews*, v. 96, n. 2, p. 695-750, 2016.

JABLONSKI, S. A. et al. Determinants of novel object and location recognition during development. *Behavioural brain research*, v. 256, p. 140-150, 2013.

MCGAUGH, J. L.; MCINTYRE, C. K.; POWER, A. E. Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem*, 78(3):539-52, 2002.

MCGAUGH, James L.; SHAW, Gordon L. Neurobiology of learning and memory. World Scientific, 1990.

Pavlov, I.P. Conditional reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford, England: Oxford Univ. Press, 1927.

RADISKE, Andressa 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.

RAMANATHAN, Karthik R. et al. Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 4527, 2018.

RESCORLA RA. Deepened extinction from compound stimulus presentation. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 32: 135–14, 2006.

RESCORLA, RA (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 27 (2), 115.

ROSSATO, Janine I. et al. PKM ζ inhibition disrupts reconsolidation and erases object recognition memory. *Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 10, p. 1828-1841, 2019. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/39/10/1828.full.pdf>. Acesso em: 03 mai. 2021.

TORT, Adriano BL et al. Theta–gamma coupling increases during the learning of item–context associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 49, p. 20942-20947, 2009.

VIANNA, Monica RM et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 21, p. 12251-12254, 2001.

WHITE, N. M.; MCDONALD, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 77(2):125-8, 2002.

Anexos

Figura 1. Esquema do protocolo experimental.

Figura 2. Extinção na tarefa de esquia inibitória step-down.

Figura 3. Acoplamento fase–amplitude teta–HFO no hipocampo durante a tarefa de esquia inibitória com step-down.

CÓDIGO: SB0627

AUTOR: ANA LUIZI BARACHO DA SILVA

COAUTOR: THAIS PRISCILA LIMA SILVA

COAUTOR: JANINE INEZ ROSSATO

COAUTOR: GÊNEDY KARIELLY DA SILVA APOLINÁRIO

COAUTOR: ANNA LYVIA AZEVEDO CAVALCANTE

ORIENTADOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

TÍTULO: Envolvimento da degradação proteica hipocampal na persistência da memória de extinção

Resumo

As memórias de medo podem ser bastantes persistentes, no entanto, não são estáticas: quando evocadas, podem seguir caminhos distintos. A evocada repetida não reforçada pode levar ao processo de extinção, no qual uma nova memória reduz a resposta aversiva original. Por outro lado, a evocação também pode tornar a memória lábil, exigindo sua reestabilização por meio da síntese proteica em um processo denominado reconsolidação. Estudos indicam que o hipocampo dorsal está envolvido na modulação das memórias de medo ou aversivas. No entanto, os mecanismos moleculares que regulam esse processo permanecem pouco compreendidos. Alguns estudos sugerem que a degradação proteica mediada pelo proteassoma controla a remodelação sináptica, regulando a disponibilidade de receptores AMPA na densidade pós-sináptica, os quais são fundamentais para a plasticidade sináptica e para o armazenamento de memórias. Neste trabalho utilizamos ratos machos Wistar com cânulas implantadas no hipocampo dorsal. Os animais foram submetidos ao protocolo de extinção na tarefa de esquiva inibitória e foram tratados com lactacistina ou pep2m. Nossos dados indicam que a infusão intra-hipocampal de lactacistina ou pep2m imediatamente após a reativação da memória de extinção prejudica a persistência da mesma, o que é evidenciado pelo aparecimento da memória de medo original.

Palavras-chave: Reconsolidação. Hipocampo. AMPA. Degradação proteica.

TITLE: Hippocampal protein degradation in the persistence of extinction memory

Abstract

Fear memories are highly persistent, yet they are not static. Upon retrieval, they may follow distinct trajectories. Repeated non-reinforced retrieval induces extinction, whereby a new memory trace attenuates the original aversive response. Conversely, retrieval can render the memory labile, requiring restabilization through protein synthesis in a process known as reconsolidation. Evidence indicates that the dorsal hippocampus contributes to the modulation of fear or aversive memories. However, the molecular mechanisms underlying this regulation remain poorly understood. Previous studies suggest that proteasome-mediated protein degradation governs synaptic remodeling by modulating the availability of AMPA receptors at the postsynaptic density, which are essential for synaptic plasticity and memory

storage. In the present study, we used male Wistar rats implanted with cannulae in the dorsal hippocampus. The animals underwent an extinction protocol in the inhibitory avoidance task and received treatment with lactacystin or pep2m. Our findings show that intra-hippocampal infusion of lactacystin or pep2m immediately after extinction memory reactivation impairs its persistence, as demonstrated by the re-emergence of the original fear memory.

Keywords: Reconsolidation. Hippocampus. AMPA. Protein degradation.

Introdução

A memória é a capacidade do indivíduo de recordar e armazenar informações (Nader, 2015). Tem a função de adaptar o organismo ao ambiente por meio da aprendizagem, modificando comportamentos para favorecer a sobrevivência (Ortega et al., 2022).

O aprendizado possibilita que informações adquiridas sejam armazenadas em memórias de longa duração (MLD), embora nem sempre com consequências positivas. Sobre isso, o medo intenso induz memórias persistentes que podem resultar em evitação exacerbada e levar ao desenvolvimento de fobias e outros transtornos de ansiedade (Glenberg, 1997; Almaraz et al., 2023).

As MLD não são fixas e imutáveis e a repetição de lembranças não reforçadas pode levar à redução gradual da resposta e à extinção do traço mnemônico, resultando em uma nova associação que diminui a intensidade da resposta original aprendida (Ferrara et al., 2019; Inda et al., 2011).

As MLD podem se desestabilizar quando reativadas e, para perdurarem, devem passar por uma reestabilização dependente da síntese protéica em um processo denominado reconsolidação (Misanin et al., 1968; Przybylski et al., 1997; Nader et al., 2000). Durante a reconsolidação, engramas preexistentes podem ser atualizados e reforçados (Hardt et al., 2010; McKenzie et al., 2011; Dudai, 2012). Assim, a reconsolidação e a extinção desempenham papéis opostos; a reconsolidação mantém ou fortalece a memória do medo, enquanto a extinção a enfraquece (Kida, 2023).

Nosso laboratório têm demonstrado que o hipocampo é fundamental para a ocorrência da reconsolidação da memória de extinção, sugerindo sua participação apenas quando a reativação envolve um erro de predição, ou seja, nos casos em que o que é esperado não condiz com o que de fato acontece (Rossato et al., 2010; Radiske et al., 2015; Radiske et al., 2017).

Embora numerosas evidências indiquem o envolvimento de diferentes proteínas na reconsolidação da memória de extinção, os mecanismos que regulam a degradação proteica nesse fenômeno permanecem pouco compreendidos. Algumas teorias apontam que a degradação proteica, mediada pelo proteassoma, regula a síntese proteica e a remodelação da densidade pós-sináptica por meio da eliminação de proteínas estruturais sinápticas (Kaang et al., 2009; Lee et al., 2008).

A comunicação sináptica é regulada em grande parte por alterações na composição das proteínas na sinapse, em particular, das proteínas localizadas na densidade pós-sináptica, que estruturam intimamente os receptores com seus sistemas de transdução de sinal. Além disso, mudanças duradouras na força da eficácia sináptica são controladas pela adição ou remoção de receptores na densidade pós-sináptica (Delint-Ramirez et al., 2010; Bats et al., 2007).

Os receptores AMPA são de extrema importância pois estão relacionados com a formação de circuitos neurais e com o processamento das informações no sistema nervoso central (Chater et al., 2014; Cao et. al., 2023). Sendo assim, a regulação da expressão e a função dos receptores AMPA é fundamental para os processos de aprendizado e memória (Cull-Candy et al., 2006; Traynelis et al., 2010; Swanson et al., 1997).

Portanto o entendimento de como a degradação proteica regula a síntese de proteínas na remodelação da densidade pós-sináptica, através da modificação da reciclagem de rAMPA é de suma importância, pois os processos plásticos relacionados ao processamento mnemônico dependem desta atividade sináptica.

Metodologia

Descrição da área de estudo e modelo animal

Trata-se de um estudo quantitativo com desenho de pesquisa do tipo experimental com a utilização de ratos machos adultos da linhagem Wistar. Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas da Memória do Instituto do Cérebro (ICe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) localizado em Natal, Rio Grande do Norte. Os animais serão tratados conforme a Lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Eles receberam ração e água a vontade e permaneceram no ciclo de 12h claro/escuro, tendo a temperatura controlada (21°C). Em cada caixa (caixa padrão de polisulfona 49cm x 34cm x 16cm) foram mantidos 5 animais, sendo acopladas a um mini-isolador, com 40 trocas de ar por hora (Alesco®, Ltda., Monte Mor - São Paulo - Brasil). Seguindo as diretrizes éticas da Lei AROUCA (Lei nº 11.794/2008) aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN, Certificado 384.010/2024. O aluno realizou o curso de manejo de animais (Figura 1).

Procedimentos cirúrgicos para implante de cânula

Para os procedimentos cirúrgicos de implantação de cânulas, os animais foram anestesiados por administração i.p. de cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e posteriormente foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal (AP - 4.2 mm; ML $\pm$ 3.0 mm; DV - 3.0 mm; Paxinos e Watson, 2006). Como as cirurgias para implantação de cânulas no hipocampo duram em média 25-30 minutos, a associação de ketamina + xilazina, que possui um efeito anestésico leve a moderado, é suficiente para a segurança do animal. Os animais foram mantidos nas suas gaiolas moradias originais após o procedimento cirúrgico.

Todos os animais receberam meloxicam (2 mg/kg,s.c.) como analgésico imediatamente antes da cirurgia e nos três dias subsequentes. Os experimentos começaram de 7 a 10 dias após a cirurgia.

Procedimentos comportamentais na tarefa de esquiva inibitória (EI)

A tarefa de esquiva inibitória é comumente usada para investigar processos de aprendizagem e memória de evitação em roedores. Trata-se de 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 animal quando o mesmo 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 dos animais (Figura 2). 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, ao descerem a grade com as quatro patas receberam um choque (0,4 mA durante 2 segundos). Imediatamente após o choque os animais foram removidos da caixa de treinamento e colocados na gaiola moradia. O tempo máximo de permanência na plataforma nessa sessão foi de 30 segundos; animais que não desceram nesse intervalo foram excluídos do estudo.

A extinção da memória foi conduzida em cinco sessões consecutivas, uma vez por dia. Em cada sessão, o animal foi colocado novamente sobre a plataforma, mas ao descer para o piso não recebia choque e podia explorar a caixa por 30 segundos. Caso não descesse espontaneamente em até 300 segundos, era empurrado até o piso gradeado. Animais que, ao final das sessões de extinção, apresentaram latência de descida superior a 30 segundos também foram excluídos do estudo. A reativação da memória de extinção ocorreu no 7º dia. Nessa sessão, o animal foi colocado na plataforma e, ao descer, foi imediatamente retirado da caixa, sem receber choque e, submetido aos diferentes tratamentos farmacológicos. A sessão de teste foi realizada 1 ou 7 dias após a reativação, muito semelhante a da sessão de treino, exceto pelo fato de que o animal não recebeu choque ao descer da plataforma (Figura 2).

Infusão das drogas

As microinjeções (1 µl/lado) foram realizadas em salas limpas adjacentes à sala experimental através de infusores acoplados às cânulas guia e conectados a seringas Hamilton com tubos Tygon. A taxa de fluxo (0,5 µl/min) foi controlada usando bombas de infusão. Após completar as microinjeções, deixamos os infusores no lugar por 1 min para minimizar o refluxo.

Drogas infundidas:

- PEP2m (inibe a interação NSF/rAMPA, inibe a expressão de rAMPA na membrana sináptica; 5 pmol/ul - Ralph et al., 2001; Rossato et al., 2019).
- LACTACISTINA (inibidor irreversível do proteassoma 26S; 32 ng/ul - Jarome et al., 2011).

Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism. Para comparações entre dois grupos usamos o teste-t de Student, e para comparação entre três ou mais grupos, utilizamos ANOVA de medidas repetidas seguidas de Bonferroni. O nível de significância adotado foi 5%.

Resultados e Discussões

A recordação repetida e não reforçada pode induzir a extinção de memórias consolidadas, uma forma de aprendizagem que envolve a formação de uma nova associação que inibe a expressão da original. Estudos do nosso laboratório indicam que a recordação torna a memória de extinção suscetível à amnésia, indicando que esse tipo de memória é propenso à reconsolidação, que é evidenciado comportamentalmente pelo reaparecimento da memória de medo.

Nossos dados mostram que os animais efetivamente extinguem a memória de medo adquirida após o treinamento na esQUIVA inibitória. A extinção é evidenciada pela redução da latência de descida da plataforma ao longo dos 5 dias de extinção. A figura 3 ilustra a extinção para os distintos tratamentos realizados, além da redução gradativa da latência de descida, podemos observar que as curvas de extinção não diferem para os distintos tratamentos realizados.

Quando investigamos se os tratamentos afetam a persistência da memória de extinção, observamos que a administração intra-hipocampal de lactacistina logo após a sessão de reativação prejudicou a retenção da memória em questão, esse prejuízo foi observado em um teste realizado 1 ou 7 dias mais tarde. Esse prejuízo é observado pelo aumento da latência de descida, evidenciando o prejuízo da memória de extinção, o que faz com que a memória de medo retorne (Figura 4A, Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebeu lactacistina após a reativação (Teste 1D - Média = 133,5; Desvio Padrão = 104,4) em comparação ao grupo que recebeu veículo (Média = 12,25; Desvio Padrão = 7,51); $t(21) = 4.02$, $p = 0.0006$, $d = 1.63$). Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebeu lactacistina após a reativação e foi treinado 7 dias depois ($M = 156.3$; $DP = 124.9$) em comparação ao grupo Veículo e foi treinado no mesmo intervalo de tempo ($M = 9.75$; $DP = 4.98$); $t(21) = 4.07$, $p = 0.0005$, $d = 1.61$). Para avaliar a janela de tempo deste efeito, fizemos o mesmo experimento só que desta vez a infusão foi realizada 6 horas após a reativação. Observamos que neste caso a lactacistina não prejudica a persistência da memória de extinção tanto em um teste realizado 1 como 7 dias mais tarde (Figura 4B). Para mostrar que o efeito da lactacistina está atrelado ao período que a memória de extinção é reativada, fizemos outro experimento onde a infusão foi feita um dia após o término da extinção, só que neste caso sem a sessão de reativação. Observamos que se a droga é infundida sem a sessão de reativação a persistência da memória de extinção é prejudicada (Figura 4C). Esses resultados indicam que a infusão de lactacistina logo após a reativação impede a persistência da memória de extinção, evidenciado pelo reaparecimento da memória de medo.

A literatura sugere que a degradação proteica está envolvida na regulação da reciclagem de receptores AMPA. Antes de avaliar a possível interação, fomos investigar se estes receptores são importantes para a persistência da memória de extinção após sua reativação. Os animais foram treinados e submetidos ao protocolo de extinção como descrito anteriormente. Um dia mais tarde, os animais passaram pela reativação ou não e, receberam infusão intra-hipocampal de pep2m. A memória de extinção foi testada 1 ou 7 dias mais tarde. Semelhante ao observado anteriormente, somente a infusão imediatamente após a reativação provoca amnésia (Figura 5A, estatística, Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebeu pep2m após reativação ($M = 99,82$; $DP = 61,67$) em comparação ao grupo que recebeu veículo ($M = 11,33$; $DP = 9,80$), $t(18) = 4,24$, $p = 0,0005$, $d = 1,91$). Um teste t para amostras independentes indicou que os valores foram significativamente maiores no grupo que recebe pep2m após a reativação ($M = 119,5$; $DP = 77,87$) em comparação ao grupo veículo ($M = 10,67$; $DP = 5,10$), $t(18) = 4,16$, $p = 0,0006$, $d = 1,87$.)

Se o tratamento é feito 6h após a reativação (Figura 5B) ou na ausência da reativação (Figura 5C) esse efeito amnésico não é observado.

Em conjunto, esses resultados indicam que tanto a degradação protéica dependente do proteassoma, inibida pela lactacistina, quanto a mobilização de receptores AMPA para a membrana sináptica, bloqueada pelo PEP2m, são processos necessários para a reconsolidação da memória extinção na esQUIVA inibitória.

Conclusão

Os resultados deste trabalho corroboram com dados prévios do laboratório, que mostram que a memória de extinção também pode ser reconsolidada. Visto que, se bloquearmos a degradação proteica e a inserção de receptores AMPA na sinapse, logo após a reativação, observamos amnésia para a memória de extinção, evidenciada pelo reaparecimento da memória original de medo.

Referências

- ALMARAZ-ESPINOZA, A.; GRIDER, M. H. Physiology, Long Term Memory. In: StatPearls. StatPearls Publishing, 2023.
- BATS, C. et al. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, v. 53, n. 5, p. 719–734, 2007.
- Bevilaqua, L. R. M., et al.. Role of protein phosphatase 2C from bovine adrenal chromaffin cells in the dephosphorylation of phospho-serine 40 tyrosine hydroxylase: Dephosphorylation of pSer40TH by PP2C. *Journal of Neurochemistry*, v. 85, n. 6, p 1368–1373, 2003.
- CAO, Y. Y. et al. Molecular mechanisms of AMPA receptor trafficking in the nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 1, p. 111, 2023.
- CHATER, T. E.; GODA, Y. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 401, 2014.
- CULL-CANDY, S. et al. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 16, n. 3, p. 288-297, 2006.
- DELINT-RAMIREZ, I. et al. In Vivo Composition of NMDA Receptor Signaling Complexes Differs between Membrane Subdomains and Is Modulated by PSD-95 And PSD-93. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 24, p. 8162–8170, 2010.
- DUDAI, Yadin. The restless engram: consolidations never end. *Annual Review of Neuroscience*, v. 35, n. 1, p. 227–247, 2012.
- FERRARA, N. C. et al. GluR2 endocytosis-dependent protein degradation in the amygdala mediates memory updating. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 5180, 2019.
- GLENBERG, A. M. What memory is for: Creating meaning in the service of action. *Behavioral and Brain Sciences*, v. 20, n. 1, p. 41–50, 1997.

HARDT, O. et al. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annual Review of Psychology*, v. 61, n. 1, p. 141–167, 2010.

INDA, M. C. et al. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 5, p. 1635–1643, 2011.

JAROME, T. J. et al. Activity Dependent Protein Degradation Is Critical for the Formation and Stability of Fear Memory in the Amygdala. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e24349, 2011.

KAANG, Bong-Kiun. et al. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 15, n. 5, p. 430–435, 2009.

KIDA, S. Interaction between reconsolidation and extinction of fear memory. *Brain Research Bulletin*, v. 195, p. 141-144, 2023.

LEE, S. et al. Molecular characterization of T-type Ca(2+) channels responsible for low threshold spikes in hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Neuroscience*, v. 155, n. 4, p. 1195–1203, 2008.

MCKENZIE, S; EICHENBAUM, H. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? *Neuron*, v. 71, n. 2, p. 224–233, 2011.

MISANIN, J. R. et al. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, v. 160, n. 3827, p. 554–555, 1968.

NADER, K. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 10, p. a021782, 2015.

NADER, K. et al. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 2000.

ORTEGA-DE SAN LUIS, C.; RYAN, T. J. Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. *Journal of Biological Chemistry*, v. 298, n. 5, 2022.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 2006.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research*, v. 84, n. 1-2, p. 241–246, 1997.

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. Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. *The Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 16, p. 6570–6574, 2015.

ROSSATO, J. I. et al. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 50, p. 21801–21805, 2010.

ROSSATO, J. I. et al. PKM ζ Inhibition Disrupts Reconsolidation and Erases Object Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 10, p. 1828–1841, 2019.

SWANSON, G. T. et al. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 58-69, 1997.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010.

Anexos

Figura 1. Certificado de conclusão do curso de ética e manejo de animais de laboratório.

Figura 2. Esquema do experimento na tarefa de Esquiva Inibitória (EI).

Figura 3. Curvas de extinção para os distintos tratamentos.

Figura 4. A infusão intra-hipocampal de lactacistina logo após a reativação prejudica a persistência da memória de extinção.

Figura 5. A infusão intra-hipocampal de pep2m logo após a reativação prejudica a persistência da memória de extinção.

CÓDIGO: SB0629

AUTOR: ANA CAROLAINÉ GOMES DE LIMA

COAUTOR: JÉSSICA LOHHAYNE DE MELO LÚCIO

COAUTOR: INGRID ELAINE RODRIGUES DOMINGOS

COAUTOR: DOROTH MIRANDA ALMEIDA SILVA

ORIENTADOR: KEMAL ALI GER

TÍTULO: QUAIS OS EFEITOS DA SALINIZAÇÃO NA MICROALGA
SCENEDESMUS OBLIQUUS

Resumo

A salinização da água doce, causada por fatores naturais e humanos, como o uso excessivo de recursos hídricos, reduz a biodiversidade aquática. O fitoplâncton, responsável por grande parte da produção de oxigênio e base da cadeia alimentar, é sensível ao estresse osmótico provocado pelo aumento da salinidade, o que pode afetar seu crescimento e função ecológica. Este estudo analisou o crescimento de *Scenedesmus obliquus*, uma microalga de água doce com potencial comercial, em diferentes concentrações de NaCl (0 a 10 g/L), ao longo de 12 dias. Desse modo, acreditamos que o estresse salino causado pelo aumento da concentração de NaCl irá gerar uma diminuição no crescimento de *Scenedesmus*. A espécie apresentou tolerância moderada, com crescimento reduzido acima de 6 g/L, mas manteve atividade celular até os níveis mais altos de salinidade testados, indicando certa resistência ao estresse salino.

Palavras-chave: NaCl.Salinização.Fitoplâncton.Água doce.

TITLE: WHAT ARE THE EFFECTS OF SALINISATION ON THE MICROALGA
SCENEDESMUS OBLIQUUS

Abstract

The salinisation of fresh water, caused by natural and human factors such as excessive use of water resources, reduces aquatic biodiversity. Phytoplankton, responsible for much of the oxygen production and basis of the food chain, is sensitive to osmotic stress caused by increased salinity, which can affect its growth and ecological function. This study analysed the growth of *Scenedesmus obliquus*, a freshwater microalga with commercial potential, at different NaCl concentrations (0 to 10 g/L) over 12 days. Thus, we believe that saline stress caused by increased NaCl concentration will lead to a decrease in the growth of *Scenedesmus*. The species showed moderate tolerance, with reduced growth above 6 g/L, but maintained cellular activity up to the highest salinity levels tested, indicating some resistance to salt stress.

Keywords: NaCl.Salinization.Phytoplankton.Freshwater

Introdução

FITOPLÂNCTON

O fitoplâncton (microalgas e cianobactérias) desempenha um papel essencial na vida aquática, na regulação climática e na economia. São a base da cadeia alimentar, sendo assim o nível trófico primário nos ecossistemas aquáticos (FALKOWSKI et al., 1998). Estima-se que o fitoplâncton seja responsável por cerca de 50% a 70% do oxigênio do planeta, regulando assim o clima global (FIELD et al., 1998; FALKOWSKI, 2012).

Com o aumento descontrolado da salinização, os organismos fitoplanctônicos sofrem com estresse osmótico, ou seja, alterações bruscas de salinidade, podendo levar o organismo à morte (DELGIORGIO et al., 2018). Alterações na composição das espécies são prejudiciais para aquelas que não se adaptam a diferentes concentrações de sais, assim como alterações na composição das linhagens, podendo reduzir a eficiência da fotossíntese e da taxa de crescimento (RICHARDSON, 2008; PAUL et al., 2015), afetando bruscamente a cadeia trófica marinha (DUARTE et al., 2020).

A salinização da água doce, impulsionada por atividades humanas como o uso de sal em estradas, práticas agrícolas (irrigação) e processos de mineração, tem provocado alterações significativas na composição iônica e na condutividade elétrica das águas interiores. Esse processo crescente e multicausal é conhecido como Síndrome da Salinização da Água Doce (Freshwater Salinization Syndrome – FSS) (KAUSHAL et al., 2005; KAUSHAL et al., 2018). Essa síndrome não apenas eleva os teores de sais, como também desencadeia mudanças no equilíbrio ácido-base, mobiliza metais e nutrientes, e promove transformações químicas que podem comprometer a biodiversidade e os ciclos biogeoquímicos dos ecossistemas aquáticos.

No que tange à comunidade fitoplanctônica, experimentos em mesocosmos mostram que níveis elevados de cloreto — por exemplo, acima de 400 mg Cl⁻/L — provocam uma drástica redução na biomassa total e na diversidade de espécies (PITTS et al., 2021). Esse declínio ocorre em paralelo com a reorganização da comunidade: enquanto algas verdes sensíveis desaparecem, cianobactérias tolerantes, como *Planktolyngbya*, aumentam expressivamente seu aporte, ampliando sua biomassa em até seis vezes (PITTS et al., 2021).

Além disso, mesmo em experimentos de longo prazo simulando intrusão salina, observou-se uma severa queda na riqueza de espécies de fitoplâncton: de 14 espécies em água doce para apenas 4 em níveis salinos elevados (FREEMAN et al., 2020). Notavelmente, Chlorophyta e Euglenophyta foram os grupos mais afetados, enquanto cianobactérias, embora menos diversas, mostraram maior dominância dentro da comunidade (FREEMAN et al., 2020).

SCENEDESMUS

Estes organismos podem ser classificados pela natureza química, tipos de pigmentos, aspectos citológicos e morfológicos segundo TOMASELLI (2004). As aplicações mais comuns são na aquicultura como meio alimentar direto e indireto, nas produções de camarões e peixes, uma das espécies que é utilizada é a Chlorophyceae (*Scenedesmus* spp.) dentre outras classes e espécies. (SILVA et al., 2003; MULLER-FEUGA, 2004).

A *Scenedesmus* é um gênero de microalga verde, da classe das Chlorophyceae, esse grupo de microalgas é onipresente em ambientes de água doce, ocupando o nicho de produtor primário em ecossistemas aquáticos, contribuindo de forma importante para a circulação de nutrientes. Uma das principais características é a capacidade adaptativa, podendo mudar

morfologicamente, quando ameaçada por predadores, fazendo com o que sua colônia aumente em resposta.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é analisar o grau de tolerância da cepa *Scenedesmus* sp. quando exposta a diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl).

HIPÓTESE

Desse modo, acreditamos que o estresse salino causado pelo aumento da concentração de NaCl irá gerar uma diminuição no crescimento de *Scenedesmus*.

Metodologia

A cepa utilizada foi isolada de ecossistema aquático de água doce, foi mantida em laboratório sob a temperatura de 23 °C (+- 1°C) e luminosidade de: 12:12 horas claro/escuro.

As cepas foram expostas a diferentes tipos de tratamentos com duas réplicas, indo de 0 até 10. Tivemos o controle que foi composto apenas pelo meio Wright's Cryptophyte (WC) e os demais tratamentos obtiveram o mesmo meio de cultivo, mas com concentrações de NaCl diferentes sendo elas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 g/L. O cloreto de sódio foi pesado utilizando uma balança analítica e em seguida foi dissolvido no meio Wright 's Cryptophyte (WC). Os erlenmeyers foram todos com capacidade de 125ml, contudo adicionamos apenas 70ml do meio de cultura com o cloreto diluído, como mostra a figura 1.

O volume das células de *Scenedesmus obliquus* foi calculado para definir a concentração inicial do experimento, onde iniciamos com uma concentração de 100.000 mil células por ml.

As amostragens foram realizadas a cada 2 dias, e colocadas em tubos de Falcon com capacidade de 10ml contendo 5ml de cada amostra, realizamos a medição da intensidade da luz em um espectrofotômetro com comprimentos de onda de 680 (nm) e 750 (nm). Para que fosse possível a contagem das células, fixamos com a solução Lugol (Iodo de potássio), e posteriormente precipitado para uma contagem mais precisa. Foram retiradas amostras com auxílio de pipetador eletrônico, juntamente com um microscópio óptico e uma câmara de Neubauer. Após a determinação da abundância das células, foi possível definir a taxa de crescimento r entre todos os dias através da fórmula:

$$r = \ln(C_f/C_i)/t$$

Onde:

C_f = Concentração final

C_i = Concentração inicial

t = Tempo em dias (12 dias).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O comportamento das taxas de crescimento das cepas foi *Scenedesmus* ap. ao serem expostas aos tratamentos foram analisadas visualmente através de análises de modelos lineares generalizados (GLM) ($r \sim$ salinidade), realizadas no RStudio (R CORE TEAM, 2022).

Resultados e Discussões

A análise dos gráficos evidencia de forma clara a influência da salinidade sobre o crescimento celular ao longo do tempo. No primeiro gráfico, referente à densidade celular em função da salinidade, observa-se que, durante os primeiros dias de cultivo, até aproximadamente o sétimo dia, não há diferenças marcantes entre os tratamentos, mantendo-se as densidades celulares em níveis baixos. Contudo, a partir do oitavo dia, ocorre um aumento expressivo na densidade celular, revelando a interação entre o tempo de cultivo e a salinidade. Entre os diferentes tratamentos, a salinidade 5 g/L destacou-se por apresentar um pico acentuado, atingindo valores próximos a $2,0 \times 10^7$ células/mL, sugerindo ser a condição mais favorável para o crescimento. Em concentrações intermediárias (0 a 4g/L), verificou-se crescimento moderado, enquanto em concentrações mais elevadas (8, 9 e 10 g/L) a densidade celular foi significativamente reduzida, evidenciando um efeito inibitório do excesso de sal. Destaca-se ainda que a variabilidade entre os pontos aumenta após o oitavo dia, o que demonstra maior sensibilidade da cultura às condições de salinidade nesta fase do cultivo, como mostra o primeiro gráfico.

O segundo gráfico, que apresenta a taxa de crescimento específica em função da salinidade, confirma esses padrões. Durante a maior parte do período experimental, as taxas variaram entre 0,2 e 0,4 d⁻¹ para as salinidades de 0 a 7 g/L, indicando crescimento positivo e relativamente estável. Mais uma vez, a salinidade 5 mostrou-se a mais eficiente, registrando um pico de crescimento entre o oitavo e o nono dias, ultrapassando 0,5 d⁻¹. Em contraste, as salinidades mais elevadas (particularmente 9 e 10 g/L) apresentaram valores bastante reduzidos, chegando a registrar taxas negativas nos primeiros dias no tratamento com salinidade 10 g/L, o que sugere mortalidade celular ou ausência de crescimento. Após o pico em torno do nono dia, todas as condições experimentais apresentaram uma redução gradual da taxa de crescimento, indicando o início da fase estacionária do cultivo, possivelmente em decorrência de limitação de nutrientes ou acúmulo de metabólitos inibitórios.

De forma integrada, os resultados permitem concluir que há uma relação direta entre taxa de crescimento e densidade celular final, na qual as condições que proporcionaram maiores taxas também resultaram em maiores densidades. O padrão temporal observado segue a dinâmica clássica de culturas microbianas, caracterizada por uma fase inicial de adaptação lenta, seguida de uma fase exponencial de rápido crescimento e, posteriormente, por uma fase estacionária. Do ponto de vista estatístico e biológico, a salinidade exerce efeito significativo sobre o desenvolvimento celular, sendo esse efeito não linear. Assim, concentrações intermediárias, especialmente a salinidade 5 g/L, configuram-se como a condição ótima para maximizar o crescimento, enquanto extremos de baixa (0) e alta salinidade (8 a 10 g/L) apresentam impacto negativo sobre a viabilidade e desempenho celular.

Os resultados obtidos com esse experimento demonstram que, a salinidade reduziu o crescimento para todos os tratamentos, porém ele só foi significativo em tratamentos acima de 7g/L.

Foi possível observar que o experimento não sofreu alteração significativa no Controle (0), mas nos demais teve um declínio que se enquadra na margem de erro esperada, fazendo com o que a hipótese estatística ficasse dentro da margem significativa de desvio padrão mostrando resultados diferentes do estudo de caso feito por (Dao et al.,2024). que observou

que a *Scenedesmus* sp. tolera salinidade leve (~4%) e não consegue sobreviver a condições mais altas (~8%) após 12 dias de experimento, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas. Existem também, artigos como (ALVENSLEBEN; MAGNUSSON; HEIMANN, 2015). que relata o crescimento da *Scenedesmus* a tolerância a salinidades de 18/L.

Conclusão

Foi possível observar que a *Scenedesmus* sp. teve o crescimento reduzido nas salinidades com concentrações acima de 6 g/L. Nos primeiros nove dias de experimento com a concentração citada acima, a cepa se mostrou resistente, com a presença de colônias e novas células, mas a partir do décimo dia iniciou-se uma queda na densidade celular, o que ocorreu nas cepas de salinidade 7, 8, 9 e 10 g/L.

Durante as contagens, as amostras mostraram-se resistentes, onde nos últimos dias do experimento a queda na abundância foi brusca, na salinidade 8g/L e resistindo nas salinidades de 9 e 10 g/L, até o último dia. Isso mostra que apesar do efeito negativo a *Scenedesmus* sp. conseguiu manter o seu crescimento.

Estudar a tolerância de *Scenedesmus* a diferentes níveis de salinidade é essencial para compreender os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que permitem sua sobrevivência em ambientes cada vez mais impactados pela salinização das águas doces. Compreender como essa microalga responde a estresses salinos de forma crônica — não apenas em curto prazo — pode revelar adaptações relacionadas ao metabolismo de lipídios, produção de pigmentos protetores ou ajuste osmótico. Além disso, por ser uma espécie modelo amplamente usada em estudos ecotoxicológicos e biotecnológicos, avanços nesse campo podem contribuir tanto para o manejo de ecossistemas aquáticos afetados pela salinização quanto para o desenvolvimento de cultivos resilientes em ambientes salobros ou com água reutilizada.

Referências

- Falkowski, P. G., et al. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374), 200–206, 1998.
- Wright, C. S. (1987). A culture medium for the growth of freshwater cryptophytes. *Journal of Phycology*, 23(2), 240–244, 1987.
- Boyd, P. W., et al. (2010). Marine phytoplankton temperature versus growth responses from polar to tropical waters – outcome of a scientific community-wide study. *PLoS ONE*, 5(5), e63091, 2010.
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27–37, 2009.
- Domingos, Ingrid Elaine Rodrigues. Efeito da salinidade no biovolume, crescimento e morfologia de cianobactérias formadoras de florações. 2021. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

Vieira et al. (2024) e outros trabalhos em Journal of Applied Phycology, modos mixotróficos e heterotróficos de crescimento de Scenedesmus, 2024.

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgas, productos and applications. Ciência Rural, v.36, n.6, nov-dez, 2006.

VICTOR, Maurício Moraes et al. Microalgas: Uma estratégia sustentável na transformação e obtenção de compostos orgânicos. Quim. Nova, v.47, n.2, nov, 2023.

KIRROLIA, Anita et al. Salinity as a factor affecting Scenedesmus quadricauda. J. Algal Biomass Utiln, v.4, n.2, p. 28-34, fev. 2011.

SINGH, Rahul Prasad et al. unlocking the adaptation mechanisms of the oleaginous microalga Scenedesmus sp. Frontiers in Microbiology, 18 november 2024.

DAO, D. T.; LE, H. Y.; NGUYEN, M. H.; PHAM, T. H.; LE, T. M. A. Salinity tolerance and nutrient uptake of the freshwater microalga Scenedesmus protuberans. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, [S. l.], v. 9, p. 100554, 2024. DOI: 10.1016/j.cscee.2024.100554. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666017224000869>. Acesso em: 26 ago. 2025.

FREEMAN, M. C. et al. Long-term effects of road salt on lake phytoplankton communities. Limnology and Oceanography Letters, v 5, n. 1, p. 31-38, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lol2.10122>. Acesso em: 28 ago. 2025.

ÓPEZ-RUÍZ, A. et al. Salinity-induced shifts in competition between green algae and cyanobacteria. Science of the Total Environment, v. 668, p. 977–986, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.076>. Acesso em: 28 ago. 2025.

QADIR, M. et al. Economics of salt-induced land degradation and restoration. Natural Resources Forum, v. 38, n. 4, p. 282–295, 2014.

RIBEIRO, C. B. et al. Processos de salinização em aquíferos e impactos ambientais. Geociências, v. 38, n. 1, p. 87–96, 2019.

SILVA, F. A. et al. Salinização de solos e águas: desafios para a agricultura irrigada. Revista de Ciências Agrárias, v. 40, n. 3, p. 513–524, 2017.

VON ALVENSLEBEN, N.; MAGNUSSON, M. E.; HEIMANN, K. R. Salinity tolerance of four freshwater microalgal species and the effects of salinity and nutrient limitation on biochemical profiles. Journal of Applied Phycology, 2016.

Anexos

FIGURA 1

FIGURA 2

FIGURA 3

FIGURA 4

CÓDIGO: SB0649

AUTOR: HADASSA SOARES DOS SANTOS

COAUTOR: RENATA ALEXANDRA MOREIRA DAS NEVES

COAUTOR: LARISSA GABRIELA VASCONCELOS MARTINS

ORIENTADOR: RENATA ANTONACI GAMA

TÍTULO: COMPARAÇÃO DE DIETAS ARTIFICIAIS PARA O ESTABELECIMENTO DE COLÔNIAS DE MOSCAS NECRÓFAGAS EM INSETÁRIO

Resumo

Chrysomya megacephala é uma espécie de mosca frequentemente usada em pesquisas, pela ampla distribuição e facilidade de criação em laboratório, onde tradicionalmente se usa carne bovina como dieta. Contudo, essa prática apresenta limitações de custo, conservação e manuseio, motivando a busca por alternativas artificiais mais práticas e eficientes. Este estudo avaliou o uso de rações úmidas, sachês, como dieta para o estabelecimento de colônias de moscas necrófagas. Foram comparadas cinco dietas: quatro tipos de sachês e uma dieta artificial composta por levedo de cerveja, leite em pó e farinha láctea. Em cada 100g de cada dieta, foram acrescentados cem ovos de *C. megacephala* e o monitoramento foi realizado a cada 24h, observando-se a duração do ciclo e aferição de massa e tamanho. Também foram realizadas análises bromatológicas e organolépticas das dietas. Os resultados mostraram variações nutricionais relevantes: o controle apresentou 7,14% de proteína, enquanto o sachê Pedigree carne e porco atingiu 10,86%. As dietas em sachê apresentaram mudanças mais rápidas de cor e odor, mas promoveram crescimento acelerado das larvas e descarte mais precoce. Indivíduos criados com Pedigree carne e porco e Pedigree frango apresentaram maior peso e tamanho em comparação aos demais sachês e ao controle. Esses achados reforçam o potencial do uso de sachês na criação de *C. megacephala*, para padronização, manutenção de colônias e aplicações em pesquisas de interesse médico e forense.

Palavras-chave: Moscas necrófagas. Dietas artificiais. Manutenção em laboratório.

TITLE: COMPARISON OF ARTIFICIAL DIETS FOR ESTABLISHING NECROPHAGOUS FLIES COLONIES IN INSECTARY

Abstract

Chrysomya megacephala is a fly species frequently used in research due to its widespread distribution and ease of laboratory rearing, where beef is traditionally used as a diet. However, this practice has cost, conservation, and handling limitations, prompting the search for more practical and efficient artificial alternatives. This study evaluated the use of moist rations, sachets, as a diet for establishing colonies of necrophagous flies. Five diets were compared: four types of sachets and an artificial diet composed of brewer's yeast, powdered milk, and milk flour. One hundred *C. megacephala* eggs were added to every 100g of each diet, and monitoring was performed every 24h, observing the duration of the cycle and measuring mass and size. Chemical and organoleptic analyses of the diets were also

performed. The results showed significant nutritional variations: the control diet had 7.14% protein, while the Pedigree beef and pork sachet reached 10.86%. The sachet diets showed faster color and odor changes but promoted accelerated larval growth and earlier culling. Individuals raised on Pedigree beef and pork and Pedigree chicken presented greater weight and size compared to the other sachets and the control. These findings reinforce the potential of using sachets in *C. megacephala* breeding, for standardization, colony maintenance, and applications in medical and forensic research.

Keywords: Necrophagus flies. Artificial diets. Laboratory maintenance.

Introdução

A família Calliphoridae (Diptera) é composta por espécies de moscas conhecidas como varejeiras, que possuem grande importância médica e forense, pois além de causarem miíases, grande parte delas são necrófagas e vetores mecânicos, por isso se torna importante a realização de estudos direcionados, por exemplo, à análise toxicológica e cálculo do Intervalo Post Mortem (IPM).

Dentro da família, a espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) que é conhecida por sua ampla distribuição geográfica, tem se mostrado útil em pesquisas, principalmente na área da entomologia forense, devido principalmente a sua fácil criação em laboratório [38]. No campo da entomotoxicologia, ramo da entomologia forense que avalia os efeitos de substâncias químicas no ciclo biológico de insetos [20,23], a *C. megacephala* é amplamente empregada na detecção de substâncias tóxicas, pois suas larvas bioacumulam esses compostos, possibilitando sua identificação mesmo após a degradação dos tecidos humanos [24]. Além da importância forense, a *C. megacephala* tem relevância médica por atuar como vetor mecânico de patógenos, favorecendo a disseminação de microrganismos e contribuindo para surtos de doenças, sobretudo em áreas urbanas com saneamento precário [19]. Também pode provocar miíase facultativa, por se atraírem pelo odor de tecidos em decomposição em hospedeiros vertebrados vivos [39].

Devido à importância dessas moscas, o estabelecimento de colônias em laboratório é uma etapa fundamental para o avanço de pesquisas na área. Essa prática garante controle preciso de variáveis ambientais e alimentares, permitindo obter dados mais exatos sobre o ciclo de vida, comportamento e desenvolvimento das espécies estudadas [4,33] e envolve desde o isolamento da espécie até sua criação e manutenção em laboratório, exigindo condições ambientais controladas e oferta nutricional adequada. Embora a carne bovina seja a dieta tradicional, seu uso apresenta desvantagens, como odor forte e atração de insetos indesejados, favorecendo contaminações secundárias [35].

Diante dessa problemática, estudos têm sido direcionados para a análise do uso de dietas artificiais (Quadro 1), visando melhorar a qualidade das manutenções e das condições dos insetários, sem comprometer o desenvolvimento e a oviposição dos insetos criados [34,37]. A formulação de dietas artificiais visa evitar interferências que prejudiquem a interpretação dos dados e reduzir problemas do uso de substratos naturais, como odores, proliferação de fungos, atração de insetos indesejados e risco de contaminação [1,9,21,26]. A padronização e controle das dietas são essenciais para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados em ambientes laboratoriais [33].

Considerando a importância da elaboração de estudos com moscas nas mais diversas áreas de conhecimento e a problemática da utilização de dietas que possam trazer efeitos negativos na

criação de colônias em laboratório, ainda aliado à busca por otimização e melhorias nesses fatores com o uso de dietas artificiais, o presente estudo visa comparar e analisar uma dieta artificial alternativa, utilizando rações úmidas em sachê, usadas na alimentação de cães e gatos, buscando uma opção que venha contribuir para o estabelecimento de colônias de moscas necrófagas em insetário, trazendo uma proposta de dieta que é de fácil obtenção, já que pode ser encontrada em supermercados, lojas de artigos Pet e pequenos comércios, além de já estar higienizada e pronta para uso, facilitando assim o seu manuseio em laboratório.

Metodologia

Escolha da espécie e coleta:

Os ensaios foram realizados com a espécie *Chrysomya megacephala* de colônia estabelecida a partir de coleta realizada na mata dos Saguís, localizada no Centro de Biociências no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Natal, utilizando a armadilha adaptada de Ferreira (1978) contendo 100g de iscas de moela apodrecida (Figura 1). Foram instaladas cinco armadilhas na mata e, após duas horas, elas foram levadas ao Laboratório de Insetos Vetores (LIVE) e colocadas em congelador a -20°C por três minutos, para anestesiamento das moscas, permitindo a retirada e posterior identificação das espécies em estereomicroscópio. A *C. megacephala* é de fácil identificação: cor verde metálica, três listras negras transversais no abdômen, gena amarelada e espiráculo castanho (Figura 2). Após a identificação, as *C. megacephala* foram colocadas em gaiolas de acrílico (30x30x30 cm), mantidas em laboratório sob condições controladas ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$, $80\pm 10\%$ e fotoperíodo 12h claro/12h escuro) e alimentadas com a dieta padronizada por Gama et al. (2021) e algodão umedecido com solução de sacarose a 20%. Os ovos postos pela geração selvagem foram utilizados nos ensaios.

Seleção das dietas artificiais:

Foram selecionadas para as análises, quatro rações úmidas em sachê utilizadas na alimentação de cães e gatos (Figura 3), e como controle foi utilizada a dieta padronizada por Gama et al. (2021) composta por farinha láctea, leite em pó, e levedo de cerveja em pó (1:1:1) e água destilada para hidratar.

Análises Bromatológicas:

Foram realizadas no laboratório de alimentos do Departamento de Nutrição (UFRN). Proteínas, cinzas, umidade e lipídios do controle foram determinados em laboratório, a matéria fibrosa foi calculada pela diferença de 100% e os outros compostos. Nos sachês, proteínas, umidade e cinzas foram realizados, os demais foram obtidos do rótulo. As análises foram realizadas de acordo com o protocolo utilizado no laboratório, segundo o Instituto Adolf Lutz, 2008.

Umidade: É obtida através da metodologia da remoção de água por aquecimento. Foram utilizadas cápsulas, previamente secas na estufa, que foram pesadas em balança de precisão e em seguida foram pesadas 3 gramas de amostra, em triplicata. As amostras, já nas cápsulas, foram direcionadas a estufa a 105°C , onde ficaram por 3 horas até a realização da 1ª pesagem, as cápsulas voltam a estufa e as pesagens são realizadas a cada 2h e são finalizadas após a amostra ter uma redução menor ou igual a 0,01g. Os dados foram anotados e o cálculo foi feito utilizando a fórmula:

$$\% \text{Umidade} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial} \times 100$$

Peso inicial = peso do alimento úmido (g); Peso final = peso do alimento seco (g); Peso alimento seco = (peso cápsula + amostra seca) - peso cápsula.

Cinzas: São obtidas através da incineração, que ocorre a aproximadamente 550°C . As

amostras secas foram pesadas (3g) e carbonizadas em bico de Bunsen, depositadas em cadinhos já secos e pesados - recipientes utilizados para levar as amostras à mufla, pois são resistentes ao calor - e levadas a mufla em temperatura de 550°C, até a eliminação completa do carvão. Foi considerado o fim da incineração ao obter cinzas brancas ou ligeiramente acinzentadas. Os dados das pesagens foram direcionados aos cálculos utilizando a fórmula:

$$\% \text{cinzas} = \frac{\text{peso cinzas(g)}}{\text{peso amostra(g)}} * 100$$

Onde $\text{Peso cinzas} = (\text{peso final} - \text{peso cadinho})(g)$.

Proteínas: O método de Kjeldahl foi utilizado para determinar o teor de proteínas por meio da quantificação do nitrogênio. O processo envolveu três etapas: digestão da amostra com ácido sulfúrico e catalisador para converter o nitrogênio orgânico em sulfato de amônio; destilação, liberando amônia que foi capturada em solução de ácido bórico; e titulação, quantificando o borato de amônio com ácido clorídrico. Foram usadas 2g de amostra, seguindo-se o aquecimento a 350°C, adição de reagentes específicos e medição final pela mudança de cor, permitindo calcular a porcentagem de proteínas, seguindo a fórmula:

$$N \text{ total}(\%) = (V_a - V_b) * f * 0,0014 * 100 / P(g)$$

$$\text{Proteína total}(\%) = NT * 6,5$$

Onde: N=nitrogênio; V_A=Volume de HCl 0,1N gasto amostra; V_B=Volume HCl 0,1 N gasto no branco; f=fator de correção do HCl 0,1 N; 0,0014=miliequivalente grama do nitrogênio; 6,25=fator de conversão geral do nitrogênio em proteína; P=peso da amostra em gramas.

NT=Nitrogênio total.

O fator de correção (f) utilizado foi 1,03.

Também foi realizado o cálculo para conversão de proteína em amostra seca, para amostra úmida utilizando:

$PU = (PS(1 - (U/100)))$, onde PU=Proteína em base úmida, PS=Proteína em base seca, U=teor de umidade.

Lipídios: O método de Soxhlet foi utilizado para extrair lipídios da amostra por solubilização em solvente orgânico em circuito fechado. A amostra (5g) foi colocada em cartucho de papel filtro e extraída com 60mL de éter etílico/petróleo aquecido a 80°C por 2h, alternando submersão e arrasto. Após a extração, o solvente foi evaporado em estufa a 105°C e o resíduo lipídico resfriado em dessecador e pesado. A porcentagem de lipídios foi determinada a partir da massa obtida, pelo cálculo:

$$\% \text{Lipídios} = [(\text{peso balão de soxhlet} + \text{lipídios}) - (\text{peso balão de soxhlet seco})] * 100$$

Fibras: A matéria fibrosa abrange as fibras e carboidratos. Esses dados foram obtidos para a dieta controle através do cálculo:

$$100\% - \% \text{umidade} - \% \text{cinzas} - \% \text{proteínas} - \% \text{lipídios} = \% \text{matéria fibrosa.}$$

Nos sachês, foram retirados do rótulo da embalagem.

Análises organolépticas:

Foram registradas alterações de cor, odor e aspecto das dietas ao longo do tempo, comparando-se o estado inicial e durante a oferta às larvas, com observação de crescimento microbiano.

Bioensaios:

Cada dieta recebeu 100 ovos em 100g de alimento em potes de 230 mL, em triplicata. As observações diárias incluíram manutenção, mudança de estádios larvais, duração do ciclo e comportamento. Vinte indivíduos na fase adulta foram pesados e medidos utilizando balança de Shimadzu e papel milimetrado. O ensaio terminou quando todos atingiram a fase adulta ou morreram.

Resultados e Discussões

Bromatologia: Os ensaios de composição - análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos, estão presentes na tabela 1. As análises bromatológicas revelaram diferenças importantes entre a dieta controle (Gama et al., 2021, utilizada no LIVE) e os sachês testados. Em relação à umidade, observou-se variação de 74,34% no controle para 82,45% no sachê da marca Pedigree (sabor frango, para cães). O teor de cinzas variou de 0,98% (controle) a 2,17% (Whiskas, sabor frango, para felinos). Para proteínas, os valores oscilaram entre 7,14% (controle) e 10,96% (Pedigree, sabor carne e porco, para cães). Já os lipídeos foram de 1,54% no controle e chegaram a 3% nos demais sachês.

No caso dos carboidratos, as embalagens dos sachês não informam valores numéricos diretos. Contudo, apresentam a quantidade de matéria fibrosa, que mostrou grande diferença: 16% na dieta controle contra apenas 2% nos sachês.

Análises organolépticas: As dietas Pedigree, carne e porco e de frango, começaram a apresentar pequenas alterações já no primeiro dia, com formação de bolhas e odor fraco. A partir do quarto dia, essas mudanças se tornaram mais pronunciadas, apresentando cheiro forte e apodrecido. No quinto dia, a textura de uma das repetições passou de pedaçada para homogênea e, após 24h, estava completamente líquida. Nesse período, a cor e o cheiro ficaram mais perceptíveis de mudanças, onde o odor era muito forte e fétido e a cor estava esverdeada em ambos sabores. No sexto dia, ambas as dietas já não continham mais larvas, sendo então descartadas.

As dietas Whiskas (carne e frango) apresentaram alterações já no primeiro dia, com odor levemente ácido, formação de bolhas e uma camada esbranquiçada na superfície. As mudanças se intensificaram a partir do quarto dia, quando o cheiro se tornou mais forte, lembrando urina. A textura permaneceu em pedaços até o último dia em que ainda havia larvas (quinto dia para a carne e sexto para o frango). A cor sofreu um escurecimento em relação ao início, passando a um tom de marrom médio no sachê de frango e marrom escuro no sachê de carne.

Na dieta controle, a textura começou mais densa e foi se tornando gradualmente cremosa e homogênea. Por volta do nono dia, uma das três repetições apresentou consistência mais elástica. O odor mudou no segundo dia, lembrando leite azedo, mas permaneceu estável durante todo o experimento, sem ser incômodo. Já a cor foi clareando dia após dia, até atingir um tom de bege bem claro. Ao final, uma repetição começou a escurecer e as demais se mantiveram semelhantes à cor inicial, todas com um leve esbranquiçado na região de superfície (Figura 4).

Bioensaios: A duração do ciclo de *C. megacephala* criada nos sachês, tanto da Whiskas quanto da Pedigree, tiveram tempo de duração semelhantes, de 11 dias. Porém, os sachês Pedigree carne e porco e Whiskas frango chegaram ao estágio de pupa mais rápido em relação aos demais. Já a dieta controle apresentou um desenvolvimento mais lento, sendo a única em que ainda havia larvas no primeiro estágio nos dois primeiros dias de observação. Essa diferença foi marcante: enquanto no controle predominavam larvas de terceiro estágio (L3), as dietas teste já apresentavam pupas ou até mais pupas do que larvas.

Assim, é possível inferir que a dieta controle resultou em um ciclo mais prolongado e menos eficiente em comparação aos sachês testados, desde a fase larval até a emergência do adulto (Quadro 2).

Além disso, foram realizadas pesagens e medições nos indivíduos adultos (Quadro 3), que variaram de 0,0276g (controle) e 0,0661g (Pedigree frango), e tamanho variando de 8,5 (controle) e 10 nos dois sachês da marca Pedigree, obtendo destaque ao sachê Pedigree frango, que manteve o maior tamanho e peso, seguido do Pedigree carne e porco. Nessa análise, o controle também se manteve bem inferior nos dois parâmetros (peso e tamanho) em relação aos sachês, mesmo aos da marca Whiskas.

Os resultados obtidos são satisfatórios e levam a um aspecto positivo quanto ao uso de sachês no estabelecimento de colônias, em especial a Pedigree Frango, que em comparação aos demais sachês e à dieta controle, combinou alta eficiência nutricional com melhor conversão em biomassa, favorecendo tanto a sobrevivência quanto o crescimento das larvas. Estrada et al. (2009) cita que as dietas têm fatores importantes a serem observados, além dos aspectos nutricionais, como textura, homogeneização e umidade, que se fazem importantes no desenvolvimento desses insetos. Além disso, as demais dietas que estão listadas no quadro 1, por exemplo, têm em comum a utilização de gelatinosos como o ágar ou alimentos que podem ser de difícil obtenção a depender da localidade, levando a sugerir a utilização de sachês como uma boa opção para estabelecimento, criação e manutenção de colônias de moscas necrófagas, principalmente pela sua facilidade de obtenção e por ser uma dieta pronta para uso, sem necessidade de preparo complexo ou insumos laboratoriais de difícil acesso, como ágar e leveduras descritos em dietas artificiais da literatura. Essa praticidade amplia o potencial de utilização em laboratórios com diferentes níveis de infraestrutura e favorece a padronização de colônias de *Chrysomya megacephala* em contextos acadêmicos e forenses.

Apesar dos resultados positivos, alguns aspectos merecem ser aprofundados em estudos futuros, como a interação entre a microbiota presente nos diferentes substratos e o desenvolvimento larval, assim como os possíveis efeitos de aditivos comerciais, como conservantes e aromatizantes, sobre o metabolismo dos insetos.

Conclusão

As dietas em sachê, embora tenham tido uma mudança de odor e textura mais rápida em relação ao controle e de forma mais evidente, se mostraram eficientes quanto a duração do ciclo de desenvolvimento, e notavelmente, resultaram em indivíduos com um tamanho e peso maiores. Dessa forma, mostrou-se como uma boa opção para o uso no estabelecimento de colônias, ressaltando que as dietas são fáceis de utilizar, vêm prontas para uso e podem ser encontradas facilmente em diversos tipos de comércio e em diferentes estados ou cidades do país.

Por isso, é interessante que os estudos utilizando dietas com rações úmidas em sachê sejam continuados, a fim de uma padronização do uso, avaliação das gerações seguintes, buscando analisar aspectos como razão sexual, copulação, oviposição e comportamento desses indivíduos, visando melhorias para a criação e estabelecimento de colônias de moscas necrófagas em laboratório, ainda buscando otimizar as manutenções visto que as dietas são bem úmidas e não necessitaram ser umedecidas durante os ensaios.

Referências

- [1]AMORIM, D.S.; SPINELLI, G. R. Entomologia forense: importância e aplicações. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 319–320, 2007.
- [2]ANDERE, A.A. et al. Genome sequence of *Phormia regina* Meigen (Diptera: Calliphoridae): implications for medical, veterinary and forensic research. BMC Genomics, v. 17, n. 1, 28 out. 2016.
- [3]AOAC (2005) - Association of Officiating Analytical Chemists. Official method of Analysis. 18th Edition, Washington DC, Method 935.14 and 992.24
- [4]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
- [5]BARBOSA, L.S; JESUS, D.M.L; AGUIAR-COELHO V.M. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. Revista Brasileira de Zootecias. 6: 207-217.2004
- [6]BARBOSA T.M. & VASCONCELOS S.D. An updated checklist of myiasis-inducing Diptera species in livestock in Northeastern Brazil. Archivos de Zootecnia. 64 (246): 187-190. 2015.
- [7]CARNEIRO, L.T. et al. The Nocturnal Oviposition Behavior of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Brazil and Its Forensic Implications. Journal of Medical Entomology, 10 dez. 2020.
- [8]CARVALHO, C.J.B. de; RAFAEL, J.A.; COURI, M.S.; RICCARDI, P.R.; SILVA, V.C.; OLIVEIRA, S.S.; LAMAS, C.J.E. 2024. Cap. 36, Diptera Linnaeus, 1758, pp.783-831. In: RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B. de; CASARI, S. & CONSTANTINO, R. (eds). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 2ª ed. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 880 pp. <https://doi.org/10.61818/56330464c36>
- [9]CATTS, E.P.; GOFF, M.L. Forensic entomology in criminal investigations. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 37, p. 253–272, 1992.
- [10]CHAUDHURY, M.F.; SKODA, S.R. An Artificial Diet for Rearing *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Journal of Economic Entomology, v. 106, n. 4, p. 1927–1931, 1 ago. 2013.
- [11]COURTNEY G.W., MERRIT, R.W. Dípteros (Moscas que não picam). Em: Likens GE (org.) Enciclopédia de águas interiores. Academic Press, Londres, pp. 288–298, 2009.
- [12]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: pp. 203-207. 2009
- [13]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.

- [14]FOERSTER, N.; SORESINI, G.; PAIVA, F.; SILVA, F. A. da; LEUCHTENBERGER, C.; MOURAO, G. First report of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in free-ranging giant otter (*Pteronura brasiliensis*). *Brazilian Journal Veterinary Parasitology*, v. 31, n. 4, e009522, 2022.
- [15]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. Saúde*, Brasília, 28(1):e2017316, 2019.
- [16]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. Maggot Therapy: basic protocol for maintenance, disinfection, transport, and application of larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). *Entomological Communications*, 3, 2021.
- [17]GOFF, M. L.; LORD, W.D. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, New York, v. 22, n. 4, p. 378–382, 2001.
- [18]GREENBERG, B. Flies as Forensic Indicators. *Journal of Medical Entomology*, v. 28, n. 5, p. 565–577, 1 set. 1991.
- [19]GREENBERG, B. Flies and disease. Princeton: Princeton University Press, 1971.
- [20]GREENBERG, B.; KUNICH, J.C. Entomology and the law: flies as forensic indicators. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [21]GRISOLIA, C. K. Toxicologia ambiental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- [22]INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), 1020 p., 2008.
- [23]INTRONA, F. et al. The use of insects in forensic investigations: an overview. *Medical Science and the Law*, London, v. 41, n. 4, p. 276–280, 2001.
- [24]OLIVEIRA-COSTA, J. Insetos “peritos”: a entomologia forense no Brasil. 1ª.ed. Campinas: Millennium Editora. p.14. 2013.
- [25]OLIVEIRA-COSTA, J. Manual de entomologia forense. Rio de Janeiro: Ciência Moderna, 2011.
- [26]OLIVEIRA, D.R.; VASCONCELOS, S.D. Comparative performance of two artificial diets for the rearing of necrophagous blow flies (Diptera: Calliphoridae) in laboratory. *Forensic Science International*, v. 327, p. 110974, 2021.
- [27]PAIVA, B.A.S; DIAS, T.D.; MARISE, M.; CARRARO, V.M. Um ensaio de dieta artificial de carne vegetal para a criação de moscas varejeiras, para utilização em pesquisa científica, 2021.
- [28]PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001

- [29]PIRES, S.M.; CÁRCAMO, M.C.; ZIMMER, C.R.; RIBEIRO, P.B. INFLUÊNCIA DA DIETA NO DESENVOLVIMENTO E INVESTIMENTO REPRODUTIVO DE *CHRYSONOMYIA MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). Arquivos do Instituto Biológico, v. 76, n. 1, p. 41–47, mar. 2009.
- [30]RODRIGUES BRANQUINHO, F.; KÜTTER KROLOW, T. O ACERVO DE DIPTERA (INSECTA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS. DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins, v. 11, n. 3, 22 abr. 2024.
- [31]RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. Zoologia de Invertebrados: uma abordagem funcional – evolutiva. 7º Ed. São Paulo. Roca. p. 843 – 877, 2005.
- [32]SHERMAN, R.A. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. Diabetes Care, Washington, DC, v. 26, n. 2, p. 446–451, 2003.
- [33]TOMBERLIN, J. K. et al. Rearing blow flies (Diptera: Calliphoridae) for research and forensic applications. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 46, p. 55–75, 2002.
- [34]TOMBERLIN, J.K. et al. A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 56, p. 401–421, 2011.
- [35]VAIRO, K.P.; MOURA, M.O. Entomologia forense na prática: do laboratório à utilização do vestígio. Millenium Editora. 2021.
- [36]VANIN, S.; ROSSI, R. Moscas (Diptera, Calliphoridae) associadas à decomposição cadavérica em diferentes ecossistemas brasileiros. Revista Brasileira de Entomologia, v. 53, n. 2, p. 227–234, 2009.
- [37]VASCONCELOS, S.D.; COSTA, D.L.F. Entomologia forense: aspectos teóricos e aplicações. Recife: Editora Universitária UFPE, 2020.
- [38]VASCONCELOS, S.D.; SALGADO, R.L.A importância das moscas califorídeas na entomologia forense: aplicações e desafios. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2014.
- [39]ZUMPT, F. Myiasis in man and animals in the Old World. London: Butterworths, 1965.

Anexos

Quadro 1 - Dietas artificiais já testadas para a criação de moscas necrófagas em laboratório.

Figura 1 - Representação da armadilha adaptada de Ferreira (1978): Duas garrafas Pet encaixadas, sem a parte inferior. A) Armadilha instalada, seta vermelha indica por onde acontece a entrada dos insetos. B) Armadilha com insetos coletados.

Fig2- Características dos adultos de *C. megacephala*: A) Visão anterior: a) espiráculo anterior castanho; b) gena amarelada. B) Visão anterior. C) Visão dorsal: c) halter; d) três faixas transversais negras no abdômen com coloração verde metálico. D) Corpo da mosca

Figura 3 - Sachês selecionados para a realização das análises

Tabela 1 - Dados das análises bromatológicas da dieta já utilizada no cotidiano, assim como as demais dietas em sachê.

Quadro 2 - Resultados da comparação de tempo de duração das dietas

Tabela 2 - Resultados das medições e pesagens dos indivíduos adultos

Figura 4 - Dietas no início dos ensaios e ao final, onde não haviam larvas e as dietas foram descartadas

CÓDIGO: SB0658

AUTOR: MILLENY REBECA DANTAS ALVES

ORIENTADOR: SERGIO MAIA QUEIROZ LIMA

TÍTULO: Ecologia e conservação de duas novas espécies de peixes anuais do gênero *Hypsolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) da bacia do rio Piranhas-Açu no Rio Grande do Norte

Resumo

A família Rivulidae, com 492 espécies, representa o grupo de peixes de água doce que exibem um intenso dimorfismo sexual e são ameaçados de extinção no Brasil. Entre eles, destaca-se o gênero *Hypsolebias*, que inclui 56 espécies anuais endêmicas da Caatinga. No Rio Grande do Norte, novas áreas feitas na bacia do rio Piranhas-Açu resultaram na descoberta de duas novas espécies: *Hypsolebias* sp.1 e *Hypsolebias* sp.2 como característica do gênero ocorrem poças temporárias e se encontram em risco devido à exploração de petróleo e a expansão de parques eólicos na região. O estudo teve como objetivo caracterizar e analisar a qualidade da água dos ambientes e possíveis impactos dessas atividades. Foram feitas coletas de amostras em três localidades, todas próximas de poços de petróleo e através de análise químicas feitas na água foi descoberto presença de Hidrocarbonetos de petróleo (TPH) constatando presença de poluentes químicos que têm efeitos prolongados para a biota aquática. As duas novas espécies *Hypsolebias* foram classificadas como vulnerável de acordo com os critérios da IUCN a contaminação está permitindo efeitos negativos na reprodução dos peixes, destacamos a necessidade de medidas de conservação e de políticas de monitoramento ambiental. Dessa forma, é preciso de mais pesquisas, principalmente na área da ecotoxicologia, para preservar essas espécies contra às pressões ambientais causadas pelas atividades petrolíferas.

Palavras-chave: Caatinga, Rivulidae, *Hypsolebias*, Piranhas-Açu, Petróleo

TITLE: Characterization of Chemical Petroleum Pollutants in Seasonal *Hypsolebias* Fish Habitats (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in the Piranhas-Açu River Basin, Rio Grande do Norte.

Abstract

The family Rivulidae, with 492 species, represents a group of freshwater fish that exhibit intense sexual dimorphism and are threatened with extinction in Brazil. Among them, the genus *Hypsolebias* stands out, which includes 56 annual species endemic to the Caatinga. In Rio Grande do Norte, new areas surveyed in the Piranhas-Açu river basin resulted in the discovery of two new species: *Hypsolebias* sp.1 and *Hypsolebias* sp.2. Like other species in the genus, they inhabit temporary pools and are at risk due to oil exploration and the expansion of wind farms in the region. The study aimed to characterize and analyze the water quality of these habitats and the potential impacts of these activities. Water samples were collected from three locations, all near oil wells. Chemical analysis of the water revealed the

presence of total petroleum hydrocarbons (TPH), confirming the presence of chemical pollutants that have long-term effects on aquatic life. The two new *Hypsolebias* species were classified as vulnerable according to IUCN criteria. The contamination is causing negative effects on the fish's reproduction, highlighting the need for conservation measures and environmental monitoring policies. Therefore, more research, especially in the field of ecotoxicology, is necessary to preserve these species against the environmental pressures caused by petroleum activities.

Keywords: Caatinga, Rivulidae, *Hypsolebias*, Piranhas-Açu, oil

Introdução

A família de peixes neotropicais Rivulidae, que inclui 492 espécies, figura como o grupo de peixes de água doce mais ameaçado de extinção no Brasil (ICMBio, 2018; Fricke et al., 2025). Representantes desse grupo ocorrem em todos os biomas brasileiros, especificamente em ambientes aquáticos rasos que vão desde poças em áreas florestais até alagados mais abertos no semiárido (Costa, 2002). No geral, os peixes rivulídeos alcançam em média 80 mm de comprimento, exibem intenso dimorfismo sexual e são geralmente classificados em dois grupos: os que possuem ciclo de vida anual, vivendo em alagados temporários formados pelas águas das chuvas, com capacidade de produzir embriões resistentes à dessecação, e os não-anuais, encontrados em ambientes perenes rasos em qualquer época do ano (Costa, 2009; Polacik et al. 2021). Na Caatinga, o gênero *Hypsolebias* Costa 2006 inclui 56 espécies de peixes anuais endêmicos, com ocorrências para mais de 10 bacias hidrográficas do Nordeste. No estado do Rio Grande do Norte (RN), duas espécies de *Hypsolebias* são conhecidas: *H. bonita* Abrantes, Ramos, Bento & Lima 2023 da bacia do rio Apodi Mossoró (oeste do RN) e *H. lulai* Ramos, Nielsen, Abrantes, Lira & Silva 2023 do rio Trairi (leste do RN). A fim de investigar a conservação e novas áreas de ocorrência de *Hypsolebias* do RN, novos estudos de campo durante o período chuvoso de 2024 foram realizados na região entre os municípios de Alto do Rodrigues, Pendências e Macau, inseridos na bacia do rio Piranhas-Açu. Além de possibilitar a expansão da amostragem de *Hypsolebias* no estado, os recentes esforços levaram à descoberta de outras duas novas espécies (já descritas formalmente e aguardando a publicação). *Hypsolebias* sp.1 e sp.2 são encontradas em três localidades diretamente impactadas por empreendimentos petrolíferos e eólicos. Em virtude da biologia de vida anual e a restrição geográfica a alagados da várzea do rio Piranhas-Açu, é possível que as novas espécies já se encontrem ameaçadas por esses impactos. A Bacia Potiguar sedimentar, localizada no Rio Grande do Norte, constitui a maior área de exploração petrolífera onshore do Brasil, incluindo dezenas de campos produtivos e milhares de poços em operação na porção baixa do rio Piranhas-Açu (Assunção, 2018). Em específico, a porção do baixo rio Piranhas-Açu foi drasticamente modificada por esse empreendimento energético desde a década de 1980, sem qualquer investigação científica dos seus impactos para a biota local (Assunção, 2018; ANP 2024). No entanto, um dos problemas mais preocupantes no contexto da conservação de peixes de água doce da Caatinga, é que algumas espécies já não são mais encontradas na natureza e possivelmente estão extintas em seus habitats naturais, por exemplo, *Hypsolebias marginatus* (Costa & Brasil, 1996). Os peixes anuais são sensíveis às alterações nas condições limnológicas (Polacik et al. 2020). Portanto, é possível que as modificações antrópicas como as advindas da expansão urbana ou agrícola, introdução de espécies exóticas, bem como empreendimentos de matriz energética eólicos e petrolíferos atrapalhem os ciclos de vida desses organismos e as características físico-químicas dos alagados onde vivem (ICMBio 2013, 2018). Como consequência, os efeitos ambientais desses impactos tendem a alterar o nível do lençol freático, promover perda de habitat,

provocar declínio populacional e até mesmo culminar em extinções de espécies (Costa 2002; Costa 2012; Volcan & Guadagnin, 2020). Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo identificar a presença de poluentes químicos da água nas poças temporárias, habitats de *Hypsolebias* sp., na bacia rio Piranhas-Açu, Rio Grande do Norte. Analisar o risco e impacto desses poluentes para as espécies, além de buscar alternativas para preservação das espécies desse gênero, contribuindo para a proteção dos ecossistemas de água doce.

Metodologia

Área de estudo A área de estudo do presente estudo inclui três localidades distribuídas na porção baixa da bacia do rio Piranhas-Açu no RN (Fig.1). Os sítios de amostragem estão situados no município de Macau e são geograficamente próximos, com distância de quatro quilômetros entre as localidades 1 e 2 (onde *Hypsolebias* sp. 1 ocorre em ambas localidades), e nove quilômetros entre a última e a localidades 3 (*Hypsolebias* sp. 2). Junto com outros municípios da região, a área de estudo está inserida na Bacia Potiguar, uma das principais bacias sedimentares do Brasil (Assunção et al. 2018). A área de estudo é caracterizada por vegetação decídua hiperxerófila, com formação de Caatinga arbustiva-arbórea. O clima predominante é o tipo semiárido BSh, caracterizado por uma precipitação anual média de aproximadamente 600 mm (Abrantes et al. 2023). A maior parte do período chuvoso ocorre entre os meses de março e junho, enquanto os meses mais secos são setembro e outubro (INPE, 2024). De acordo com os dados mais recentes da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2024), a área de estudo possui mais de 620 poços de petróleo em atividade (Fig.1). Cabe destacar que a bacia do rio Piranhas-Açu é uma das contempladas com o projeto da transposição do rio São Francisco e já está recebendo águas do rio São Francisco. Além disso, a região tem sido um polo atrativo para expansão de empreendimentos eólicos, salineiros e de carcinicultura, os quais têm provocado desmatamento da vegetação ciliar e alterações na dinâmica hídrica do rio Piranhas-Açu (Fig.1). Conforme indicado pelo Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima, esta é uma área de importância biológica de prioridade extremamente alta para conservação na Caatinga (MMA, 2018). Coleta de espécimes e amostras de água As coletas de espécies foram realizadas sob a autorização 30532-1/2011 emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO). O esforço de pesca foi padronizado em 400 peneiradas de mão (80 x 40 cm) divididas para dois coletores (200 para cada) num intervalo de 30 minutos. Cada localidade foi fotografada e teve os atributos ecológicos aferidos (e. g. profundidade, dimensões, substrato, cobertura vegetal, vegetação aquática, espécies associadas e impactos ambientais) (Tabela 1). Em laboratório os espécimes foram triados e tiveram o comprimento padrão aferido com paquímetro digital. Nas três localidades da bacia do rio Piranhas-Açu conhecidas para as espécies de *Hypsolebias*, foram coletadas duas amostras replicadas de água em garrafas de vidro de 1 litro e armazenadas em uma caixa com gelo para preservar as propriedades químicas. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises Ambientais Processamento Primário e Biocombustíveis (LABPROBIO) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde executou-se dois tipos de análises químicas: Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) e Varredura por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS). Análise química da água Em laboratório, a execução das análises de varredura de TPH incluiu: preparação e incubação de amostras, separação por cromatografia, quantificação e identificação dos analitos por tempo e retenção dos espectros de massa dos analitos. A cada etapa foi realizada utilizando um detector de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa Clarus 600 MS (PerkinElmer, Waltham,

EUA), seguindo metodologia de Anjos et al. (2023). A análise de TPH é um dos métodos mais aplicados para investigar a ocorrência de contaminações da água ou do solo provenientes de vazamento de petróleo. Isto se deve ao fato do baixo custo da análise, obtenção de resultados num curto espaço de tempo e a capacidade detectar, isolar, e quantificar compostos químicos específicos em produtos petrolíferos (Lambert et al. 2001). Os resultados da análise são apresentados por localidade ao longo do texto e na tabela 2.

Limiares de contaminação A análise dos limiares de contaminação de hidrocarbonetos de petróleo foi realizada de forma comparativa seguindo a resolução 347/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água doce do Brasil e estabelece as concentrações limiares permitidas de efluentes tóxicos nos corpos d'água doce. A identificação e aplicações dos poluentes químicos foi realizada consultando o código de cada composto disponível na base de dados do American Chemical Society (CAS) (<https://www.cas.org/pt-br/cas-data/cas-registry>). Estado de conservação A avaliação do estado de conservação das duas espécies de *Hypsolebias* foi proposta seguindo os critérios da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2022).

Resultados e Discussões

As três localidades amostras apresentaram variação nas dimensões dos corpos d'água, com comprimentos entre 31 e 53 metros (m), larguras de 18,3 a 31 m e áreas variando de 583 a 1.347 m². A profundidade média foi maior na localidade 1 (148 cm) e menor na localidade 2 (83 cm). A transparência da água variou entre transparente (locais 1 e 2) e barrenta (local 3), refletindo diferenças no tipo de substrato, predominantemente lamoso, exceto na localidade 2, onde foi arenoso. A vegetação aquática foi composta pelas espécies *Echinodorus* sp. e *Nymphaea* sp, incluindo as formas: flutuante (local 1), submersa (local 2) e emergente (local 3), com vegetação marginal presente em todas as áreas caracterizada pela ocorrência de espécies jurema-preta *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir e faveleira *Cnidoscolus quercifolius* Pohl trees (Tabela 1). Todas as áreas estão sob impacto direto de empreendimentos petrolíferos e eólicos, o que pode afetar a qualidade da água, a disponibilidade de habitats e, consequentemente, a persistência dessas espécies endêmicas. A Federação Internacional dos Proprietários de Petróleo (ITOPF, 2024) estima que entre os anos de 1970 e 2022, ocorreram aproximadamente dois mil derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados em ambientes aquáticos, com volumes variando de pequenos (7 a 700 toneladas) a grandes (> 700 toneladas). O desenvolvimento de novas tecnologias na área da engenharia ambiental diminui significativamente o número de acidentes petrolíferos. No entanto, uma vez que entram em contato com água, os poluentes químicos de petróleo possuem efeitos tóxicos e prolongados que representam ameaças para a vida nos ecossistemas aquáticos. De acordo com a resolução CONAMA 357/05, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água doce do Brasil, os habitats dos rivulídeos podem ser classificados nas categorias de classe II e III, sendo destinados à proteção e equilíbrio natural de comunidades aquáticas. Esta resolução também estabelece as concentrações limiares permitidas de efluentes tóxicos nos corpos d'água doce continental. Detectamos através das análises de TPH contaminação de hidrocarboneto de petróleo nos habitats de *H. sp.1* com concentrações variando de 284 µg/L (localidade 01) a 447,88 µg/L (localidade 02), e contaminação na única localidade de *H. sp.2* com 291,73 µg/L (localidade 03). No entanto, hidrocarbonetos de petróleo não estão incluídos na lista de efluentes tóxicos da resolução 357/05. Por outro lado, identificamos que os bifenilos policlorados (PCBs) têm efeitos tóxicos semelhantes ou superiores aos hidrocarbonetos (Miller et al., 2024), e são regulamentados com uma concentração máxima permitida de 0,001 µg/L em água doce (CONAMA, 2005). Ao entrar em contato com a água,

o petróleo está sujeito a passar por diferentes processos como evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação, absorção e biodegradação pela biota. Ainda assim, nossas análises de TPH sugerem uma possível extrapolação dos limites que poderiam ser “aceitáveis” na água doce. Além disso, também foi possível detectar através das análises de varredura de TPH alguns poluentes químicos tóxicos oriundos de petróleo, tais como Ciclotetrasiloxano, octametil; Ciclopentasiloxano, decametil; Cicloheptasiloxano, tetradecametil; Ácido hexadecanoico, éster etílico e Fenol, p-terc-butil, que são amplamente aplicados na indústria de polímeros, produtos cosméticos e líquidos inflamáveis (Tabela. 2), cujo os efeitos tóxicos são duradouros em ambientes aquáticos. Os efeitos fisiológicos desses poluentes na biota aquática podem afetar principalmente a fertilidade de organismos. Dado esse cenário, sugerimos a devida regularização dos limiares permitidos de hidrocarbonetos de petróleo na água doce e o monitoramento da água em áreas de empreendimentos petrolíferos em terra (onshore) por parte do Instituto de Gestão das Águas do Estado do Rio Grande do Norte (IGARN). Embora não tenhamos testado diretamente os efeitos tóxicos dos poluentes em *Hypsolebias*, sabe-se que os hidrocarbonetos presentes no petróleo bruto são tóxicos e, mesmo em baixas concentrações, podem causar defeitos no desenvolvimento embrionário, toxicidade no sistema imunológico e desregulação endócrina em peixes (Whitehead et al., 2017). Os estudos de campo realizados permitiram a coleta de exemplares de *Hypsolebias* sp.1 e sp.2 para análises morfológicas, nas quais identificamos um padrão de colorido inédito, denominado aqui como fenótipo “intersexual”, caracterizado pela ocorrência simultânea dos padrões de macho e fêmea em um único indivíduo (Fig.), registrado em mais de 30 espécimes incluindo juvenis (entre 10 e 25 milímetros) e adultos (25-48mm) nas três localidades amostradas (Fig. 2 e 3). Cabe destacar que não foram encontradas localidades ambientalmente íntegras para estabelecer um “grupo controle” de *Hypsolebias* que possibilitasse comparações entre habitats impactados e preservados em relação ao padrão intersexual. Assim, utilizamos como base comparativa informações dos habitats e material biológico já coletado de estudos anteriores com os congêneres filogeneticamente próximos, como *H. gongobira* (rio Pacoti, CE), *H. antenori* (rio Jaguaribe, CE) e *H. bonita* (rio Apodi-Mossoró, RN), depositados na Coleção Ictiológica da UFRN (Abrantes et al. 2023). Nessas espécies, o padrão intersexual não foi identificado e, segundo a bibliografia consultada para o gênero *Hypsolebias* (Costa, 2007; Costa, 2010; Costa et al., 2012, 2014; Britzke et al., 2016; Abrantes et al., 2020, 2023), esse fenótipo não é mencionado, sugerindo tratar-se de um padrão inédito para o grupo (Fig.3). Apesar de pouco compreendido, este fenótipo emerge como um potencial bioindicador para qualidade de água doce na Caatinga potiguar (Kuhn et al. 2025). No contexto ecotoxicológico, o ritmo da evolução adaptativa aos ambientes em mudanças (impactos antrópicos) depende principalmente das características do ambiente, como velocidade, gravidade e complexidade das mudanças ambientais em curso, e sobretudo, das características das espécies, como tamanho da população, e tempo de geração (Miller et al. 2024; Park et al. 2025). Portanto, com base no conjunto de evidências ambientais e morfológicas encontradas, este estudo hipotetiza que, dado que os peixes anuais produzem embriões sensíveis às condições limnológicas e apresentam dimorfismo sexual marcado, a ocorrência do fenótipo intersexual sugere que a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo na água pode estar promovendo efeitos negativos na biologia reprodutiva e na viabilidade populacional de *Hypsolebias* sp.1 e sp.2 nos alagados onde vivem. Assim, verifica-se a necessidade de novos estudos para elucidar se esse fenótipo corresponde a uma resposta adaptativa influenciada pela seleção sexual (escolha de parceiros), por pressões ambientais (contaminação da água) ou por ambas simultaneamente. Além disso, destaca-se o alerta para a conservação das espécies de *Hypsolebias* na bacia do rio Piranhas-Açu. A área de ocorrência das espécies de *Hypsolebias*, entre os municípios de Pendências e Macau (RN),

é intensamente explorada por atividades petrolíferas desde 1981 (ANP, 2024). Nessa região, o campo de exploração abrange 65 km² e conta com mais de 620 poços de petróleo onshore em atividade (ANP, 2024; Fig.). Enquanto a *H. sp.1* foi registrada em duas localidades, *H. sp.2* ocorreu em um único alagado. Observou-se que a exploração de poços de petróleo afeta diretamente os três habitats amostrados, com distâncias mínimas de apenas 10 metros entre os poços de exploração e os alagados (Fig. 4). Além dos impactos petrolíferos, a região apresenta rápida expansão de parques eólicos, inclusive a cinco quilômetros ao sul das localidades citadas (Fig.5). Ambos os empreendimentos envolvem a supressão da vegetação arbustiva da Caatinga, resultando na perda da vegetação marginal, essencial para a manutenção dos habitats dos peixes de água doce (Casatti, 2010). Considerando que *Hypsolebias sp.1* e *sp.2* possuem ciclo de vida sazonal e estão restritas a habitats temporários e isolados, identifica-se que todas as três localidades amostradas estão sujeitas ao declínio continuado em virtude dos impactos citados. Com áreas de ocupação (AOO) inferior a 20 km², tanto *H. sp.1* quanto *H. sp. 2* podem ser classificadas na categoria ‘vulnerável’ segundo o critério D2 da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2022). Diante desse contexto, entende-se que as ameaças cumulativas ressaltam a necessidade urgente de medidas de conservação para proteger essas espécies e seus ecossistemas.

Conclusão

A Caatinga possui uma rica ictiofauna de água doce que durante anos foi negligenciada por políticas ambientais que colocam em risco muitas espécies (Azevedo-Santos et al. 2021). Neste Bioma, *Hypsolebias* é o gênero de peixes endêmicos mais ameaçado de extinção, com cerca de 73% das espécies presentes na lista vermelha (MMA, 2022). No Rio Grande do Norte, identifica-se novas espécies que ainda não estão oficialmente descritas, mas que possivelmente estão em vias de extinção em virtude de impactos petrolíferos diretos nos alagados onde vivem. Tais impactos são corroborados neste estudo por análises químicas da água (TPH) que indicam elevada contaminação de Hidrocarbonetos de Petróleo na água, seguida da identificação de poluentes químicos que possuem efeitos tóxicos e duradouros para biota aquática, afetando principalmente o comportamento, a fisiologia e genética de organismos vivos (Miller et al. 2024; Park et al. 2025). Embora o estudo não tenha testado diretamente os efeitos tóxicos dos poluentes nos peixes, constatou-se a ocorrência de um padrão de colorido incomum em mais de 30 espécimes, caracterizado pela ocorrência simultânea do fenótipo de macho e fêmea num único indivíduo. Hipotetiza-se então que os poluentes de petróleo podem estar promovendo efeitos negativos na biologia de *Hypsolebias sp.1* e *sp.2*, que produzem embriões sensíveis às condições físico-químicas do ambiente, possuem ciclo de vida anual, dimorfismo sexual marcado e distribuição geográfica restrita em alagados na várzea do rio Piranhas-Açu (Polacik et al. 2021). Conclui-se que apesar da relevância econômica da indústria petrolífera, seus riscos ecológicos reforçam a necessidade de políticas regulatórias e de monitoramento ambiental mais eficientes para proteção dos ecossistemas aquáticos (Altoé & Feroni, 2024). Além disso, este estudo também destaca a continuação de estudos técnicos e científicos, tanto *in situ* como *ex situ*, que podem ser cruciais para garantir a proteção das espécies *Hypsolebias* ameaçadas. Ainda que sejam descritivos, os resultados deste estudo possibilitam o início de uma nova linha de pesquisa com ecotoxicologia, visando compreender como o fenótipo intersexual emerge no contexto na seleção sexual e seleção natural. Esperamos que essas perspectivas aumentem a compreensão científica sobre a persistência dessas espécies no Antropoceno e promovam a implementação de medidas de mitigação para neutralizar os impactos antropogênicos nas zonas úmidas da Caatinga.

Referências

- ABRANTES, Yuri Gomes; LIMA, Sergio Maia Queiroz; RAMOS, Telton Pedro Anselmo; BENNEMANN, Ana Beatriz Alves; TEIXEIRA, Francisco Keilo; REZENDE, Carla Ferreira; BENTO, Diego de Medeiros; MEDEIROS, Lucas Silva de. Geographic distribution and conservation of seasonal killifishes (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from the Mid-Northeastern Caatinga ecoregion, northeastern Brazil. *Neotropical Biology and Conservation*, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 301-315, 31 jul. 2020. Pensoft Publishers. DOI: <http://dx.doi.org/10.3897/neotropical.15.e51738>. ABRANTES, Yuri Gomes; RAMOS, Telton Pedro Anselmo; BENTO, Diego de Medeiros; LIMA, Sergio Maia Queiroz. Molecular delimitation of the seasonal killifishes of the *Hypsolebias antenori* species group (Cyprinodontiformes, Rivulidae), with description of two new species from the Caatinga coastal basins, northeastern Brazil. *Zootaxa*, [S.l.], v. 5389, n. 5, p. 545-562, 22 dez. 2023. Magnolia Press. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.5389.5.2>. ABRANTES, Yuri Gomes; BENNEMANN, Ana Beatriz Alves; LUSTOSA-COSTA, Silvia Y.; BENTO, Diego de Medeiros; RAMOS, Telton Pedro Anselmo; LIMA, Sergio Maia Queiroz. Diversity and conservation of fishes from karstic areas of the Jandaíra Formation in the Brazilian semiarid. *Papéis Avulsos de Zoologia*, [S.l.], v. 63, p. e202363011, 2023. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. DOI: <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2023.63.011>. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Dados sobre os campos de petróleo e gás natural no Polo Potiguar. [S.l.], 2024. Disponível em: <https://geomaps.anp.gov.br/>. Acesso em: 24 jul. 2024. ALTOÉ, Lorena; FERONI, Rafael C. Principais impactos ambientais gerados pelas atividades de exploração e produção de petróleo. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, [S.l.], v. 11, n. 27, p. 13-28, 2024. DOI: <https://doi.org/10.21438/rbgas.v11i27.13>. ASSUNÇÃO, Marcus Vinicius Dantas de. O estudo da eficiência ambiental dos campos onshore das bacias costeiras brasileiras na perspectiva da água produzida de petróleo. 2018. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Petróleo) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018. AZEVEDO-SANTOS, V. M.; et al. Conservation of Brazilian freshwater biodiversity: Thinking about the next 10 years and beyond. *Biodiversity and Conservation*, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 235-241, 2021. Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-020-02076-5>. BRITZKE, R.; NIELSEN, D. T.; OLIVEIRA, C. Description of two new species of annual fishes of the *Hypsolebias antenori* species group (Cyprinodontiformes: Rivulidae), from Northeast Brazil. *Zootaxa*, [S.l.], v. 4114, n. 2, p. 123-138, 2016. Magnolia Press. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4114.2.2>. CASATTI, L. Changes in the Brazilian Forest Code: potential impacts on the ichthyofauna. *Biota Neotropica*, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 31-34, 2010. Instituto Virtual da Biodiversidade. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400001>. COSTA, Wilson José Eduardo Moreira. Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação. Curitiba: Editora UFPR, 2002. COSTA, Wilson José Eduardo Moreira. Descriptive morphology and phylogenetic relationships among species of the Neotropical annual killifish genera *Nematolebias* and *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 1-26, 2006. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000100001>. COSTA, Wilson José Eduardo Moreira. Aplocheiloid fishes of the Brazilian Atlantic Forest: history, diversity and conservation. *Vertebrate Zoology*, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 147-167, 2009. Senckenberg Natural History Collections. COSTA, Wilson José Eduardo Moreira. Taxonomic revision of the seasonal South American killifish genus *Simpsonichthys* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). *Zootaxa*, [S.l.], v. 1669, n. 1, p.

1-134, 2007. Magnolia Press. COSTA, Wilson José Eduardo Moreira; AMORIM, Pedro F.; MATTOS, José L. Species delimitation in annual killifishes from the Brazilian Caatinga, the *Hypsolebias flavicaudatus* complex (Cyprinodontiformes: Rivulidae): implications for taxonomy and conservation. *Systematics and Biodiversity*, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 71-91, 2012. Taylor & Francis. DOI: <https://doi.org/10.1080/14772000.2012.664177>. ICMBio – INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Vol. VI — Peixes. Brasília: ICMBio, 2018. 1234 p. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-1. [S.l.], 2022. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 28 ago. 2025. KUHN, A. V.; COSTA, J. H. A. da; SOUZA, U. P.; LIMA, G. V. de; PEREIRA, P. H. C.; DOLATTO, R. G.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Ecotoxicological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons and fish biomarkers in a marine protected area. *Regional Studies in Marine Science*, [S.l.], v. 85, p. 104155, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.104155>. LAMBERT, M.; et al. An evaluation of field total petroleum hydrocarbon (TPH) systems. *Journal of Hazardous Materials*, [S.l.], v. 83, n. 1-2, p. 65-68, 2001. Elsevier. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E MUDANÇA DO CLIMA (MMA). Portaria nº 148, de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, seção 1, n. 108, p. 74, 8 jun. 2022. MILLER, J. T.; CLARK, B. W.; REID, N. M.; KARCHNER, S. I.; ROACH, J. L.; HAHN, M. E.; WHITEHEAD, A. Independently evolved pollution resistance in four killifish populations is largely explained by few variants of large effect. *Evolutionary Applications*, [S.l.], v. 17, n. 1, p. e13648, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.13648>. PARK, J.; BROWN, C.; HESS, C.; ARMSTRONG, M.; ROCKE, D. M.; GALVEZ, F.; WHITEHEAD, A. Multiple stressors in the Anthropocene: urban evolutionary history modifies sensitivity to the toxic effects of crude oil exposure in killifish. *Evolutionary Applications*, [S.l.], v. 18, n. 5, p. e70112, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.70112>. POLAČIK, M.; VRTÍLEK, M.; REICHARD, M.; ŽÁK, J.; BLAŽEK, R.; PODRABSKY, J. Embryo ecology: developmental synchrony and asynchrony in the embryonic development of wild annual fish populations. *Ecology and Evolution*, [S.l.], v. 11, n. 9, p. 4945-4958, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.742>. RAMOS, Telton P. A.; NIELSEN, Dalton T. B.; ABRANTES, Yuri G.; LIRA, Fabio Origuela de; LUSTOSA-COSTA, Silvia Y. A new species of cloud fish of the genus *Hypsolebias* from Northeast Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, [S.l.], v. 21, n. 3, 2023. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0068>. SARGES, Igor Ferreira; SILVA, Maria C.; LIMA, José R. Consequências ambientais da extração de petróleo no Brasil: de algas à pescada. *Jornada Acadêmica GEAS Brasil*, [S.l.], 2024. VIEIRA, Amália Myrelle da Silva; OLIVEIRA, Rodrigo Lima de; DANTAS, Jefferson Marinho da Costa. Petróleo no RN: uma avaliação econômica sobre a produção histórica e perspectivas futuras / Petroleum in Rio Grande do Norte. *Brazilian Journal of Development*, [S.l.], v. 6, n. 8, p. 63824-63839, 2020. *Brazilian Journal of Development*. DOI: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n8-710>. VOLCAN, Matheus Vieira; GUADAGNIN, Débora L. Annual and non-annual fish assemblages respond differently to environmental and spatiotemporal variations of temporary wetlands from southern Brazil. *Freshwater Biology*, [S.l.], v. 65, n. 12, p. 2023-2036, 2020. Wiley. DOI: <https://doi.org/10.1111/fwb.13589>

CÓDIGO: SB0667

AUTOR: VIVIANE TAINA CARVALHO DA SILVA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Análise histopatológica das alterações em glândulas salivares menores linguais decorrente da indução do câncer oral.

Resumo

A complexidade no entendimento dos inúmeros mecanismos que envolvem a carcinogênese oral, demanda estudos detalhados para auxiliar no entendimento desse complicado processo. Desta forma, a análise histopatológica 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 essa a cavidade oral. Diante disso, realizamos um estudo utilizando ratos da linhagem Wistar que é um animal que possui muita similaridade com o sistema humano, submetendo-o a um processo de indução de carcinogênese química, analisando características histopatológicas das diferentes etapas de desenvolvimento do carcinoma oral. Espera-se que os achados do presente projeto possam contribuir para a melhoria no entendimento do processo de carcinogênese, futura atuação de biomarcadores e suas relações com prognóstico das lesões, objetivando um tratamento mais promissor e eficiente para os pacientes acometidos por lesões que compõem o espectro de formação do carcinoma epidermoide oral.

Palavras-chave: Carcinogênese. Câncer Oral. Histopatologia. Histomorfometria.

TITLE: Histopathological analysis of alterations in lingual minor salivary glands resulting from oral cancer induction

Abstract

The complexity of comprehending the multiple mechanisms underlying oral carcinogenesis necessitates detailed investigations to elucidate this intricate process. In this regard, the clinicopathological evaluation of the progression of chemically induced oral carcinogenesis provides insights not only into its development but also into the genesis of potential pathological alterations that may affect the oral cavity. Accordingly, we conducted a study employing Wistar rats, an experimental model with substantial similarity to the human system, which were subjected to chemical induction of carcinogenesis. Histopathological features were analyzed across the different stages of oral carcinoma development. The findings of the present study are expected to contribute to a deeper understanding of the carcinogenic process, to the future identification and application of biomarkers, and to the elucidation of their associations with lesion prognosis, thereby supporting the development of more effective and promising therapeutic strategies for patients affected by lesions within the spectrum of oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Carcinogenesis. oral cancer. histopathology. histomorphometry.

Introdução

No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte por doença perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) indicam que o câncer de boca é o sétimo tumor mais incidente na população brasileira. O INCA estimou para o ano de 2006, 13.470 novos casos da doença (BRASIL, 2005). O carcinoma epidermóide oral (CEO) tem origem nos tecidos epiteliais e os locais mais acometidos são borda lateral de língua, lábio inferior e assoalho de boca. Entretanto, qualquer superfície bucal pode ser afetada. Considerado uma doença predominantemente do sexo masculino, atinge principalmente indivíduos acima dos 45 anos de idade e leucodermas (NEVILLE et al, 2009). O câncer de boca está associado a fatores como o consumo de tabaco, papilomavírus humano (HPV) e o álcool (CHAMOLI et al., 2021). O câncer de lábio é uma das mais frequentes neoplasias malignas da cavidade oral provavelmente devido esta localização anatômica ser mais facilmente diagnosticada, apresentando um melhor prognóstico e uma sobrevida de 5 anos ou mais, em comparação ao câncer de língua (LUNA-ORTIZ et al, 2004). 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 teve por objetivo analisar, descritiva e comparativamente, as características histopatológicas das lesões em glândulas salivares menores linguais durante o processo de indução química da carcinogênese oral.

Metodologia

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização do Estudo

Esta pesquisa consiste em uma análise histopatológica descritiva e comparativa das alterações em glândulas salivares menores de língua decorrente da indução química da carcinogênese oral pelo 4-NQO em ratos e que pertencem ao espectro de malignidade.

2.2 Animais experimentais

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% (0,3 ml/100g) (figura 1).

2.3 Processamento laboratorial e análise histopatológica das lesões induzidas quimicamente

Foram obtidos cortes de 5 µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro e coradas em hematoxilina-eosina, a partir disso, as lesões coletadas foram submetidas a análise histopatológica para serem categorizadas de acordo com o diagnóstico e considerando o grau de evolução da lesão no processo de carcinogênese. Desta forma, os casos serão diagnosticados como mucosa oral normal, provenientes de ratos do grupo controle; Casos diagnosticados como displasia oral leve; Casos diagnosticados como displasia oral severa; Casos diagnosticados como carcinomas in situ e casos diagnosticados como carcinoma epidermoide oral. Os casos diagnosticados como carcinoma epidermoide oral de língua serão analisados quanto às possíveis alterações histopatológicas em glândulas salivares menores, tais como: Degeneração de ácinos serosos e tubulosas mucosas; Áreas de fibrose no interior das glândulas salivares menores; Ectasia e displasia ductal; Presença de eosinofilia; Presença de infiltrado inflamatório; Invasão neoplásica das glândulas salivares menores; Metaplasia e Hiperplasia Ductal.

Material de Consumo:

- Xilol I (15 minutos)
- Xilol II (15 minutos)
- Álcool Absoluto (3 minutos)
- Álcool 95° GL (3 minutos)
- Álcool 70° GL (3 minutos)
- Água corrente (5 minutos)

- Hematoxilina de Harris (5 minutos)
- Água corrente (5 minutos)
- Solução álcool-ácida a 1% (passagem rápida)
- Água corrente (5 minutos)
- Eosina de Lison (2 minutos)
- Álcool 70° GL (3 minutos)
- Álcool 95° GL (3 minutos)
- Álcool Absoluto (3 minutos)
- Xilol I (3 minutos)
- Xilol II (3 minutos)
- Xilol III (3 minutos)
- Montagem em Resina Permout® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)

2.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos apropriados, com o objetivo de testar as hipóteses do presente estudo. Os dados foram digitados originalmente na planilha eletrônica Excel (Microsoft Windows XP Home edition®) e posteriormente exportados para o formato DBF (Data Base Format), para poderem ser lidos pelo programa GraphPad InStat (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95®, GraphPad Software, San Diego, Califórnia-USA), onde foram feitas as análises estatísticas descritivas

2.5 Implicações Éticas

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 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 parecer aprovado com n. 317.051/2022.

Resultados e Discussões

1. RESULTADOS

3.1 Degeneração de ácinos serosos e tubulosa mucosa

Dentre as alterações em glândulas salivares menores, a degeneração de ácinos serosos foi presente em 36 casos (81,81%) de um total de 44 (figura 2). Nas glândulas túbulo mucosas, os casos de degeneração corresponderam a 40 casos de um total de 44 casos (90,91%) (figura 3).

3.2 Fibrose em glândula ácino serosa e tubulosa mucosa

A presença de fibrose foi observada em 24 casos (54,55%) de um total de 44 casos em glândulas salivares menores em ácinos serosos (figura 4). Nas glândulas tubulosas mucosas, a fibrose foi presente em 26 casos (59,9%) de um total de 44 casos (figura 5).

3.3 Ectasia ductal, displasia ductal e displasia em ácino seroso

Ectasia ductal foi uma alteração presente em 33 casos (75%) de um total de 44 casos (figura 6). A displasia em ácinos serosos foi correspondente a 35 casos (79,55%) de um total de 44 casos (figura 7). A displasia ductal foi uma alteração observada em 38 casos (86,36%) de um total de 44 casos (figura 8).

3.4 Infiltrado inflamatório linfocítico e área de eosinofilia

O infiltrado inflamatório esteve presente nos 44 casos analisados, variando de intensidade de uma amostra para outra (figura 9). Áreas de eosinofilia foram encontradas em 16 casos (36,36%) analisados de um total de 44 casos (figura 10).

3.5 Invasão neoplásica, metaplasia ductal e hiperplasia ductal

A invasão neoplásica ocorreu em 25 dos casos (56,82%) analisados de um total de 44 casos (figura 11). A presença de metaplasia ductal, em glândulas salivares menores acinares serosas e tubulosas mucosas, foi de 28 casos (63,64%) de um total de 44 casos (figura 12). Hiperplasia ductal foi presente 26 casos (59,09%) de um total de 44 casos (figura 13).

1. DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide oral, dentre os casos de câncer de cabeça e pescoço, é o mais prevalente. O câncer de boca compreende regiões de lábio interno, 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

culturais e diferenças regionais (DAROIT et al., 2023). Quanto à localização anatômica mais prevalente do câncer de cavidade oral, a língua é a região mais afetada entre as populações europeias e dos Estados Unidos (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

O presente estudo analisou características histopatológicas de lesões em glândulas salivares menores decorrentes da indução do câncer oral, sendo analisadas alterações presentes em glândulas salivares menores em ácinos serosos e túbulos mucosos. Foram analisadas alterações na porção secretora e condutora das glândulas. Dentre as alterações histopatológicas avaliadas estão a presença de degeneração, ectasia ductal, fibrose, displasia, invasão neoplásica, metaplasia ductal, hiperplasia ductal, infiltrado inflamatório e áreas de eosinofilia (figura 14 e 15). Um achado relevante em nosso estudo foi a presença de infiltrado inflamatório em todos os casos analisados, vale ressaltar que o grau de intensidade da inflamação variou de uma amostra para outra, mas esse grau de variação não foi levado em consideração na presente pesquisa, sendo levado em consideração apenas sua presença ou ausência. Áreas de eosinofilia foram observadas em 36,36% dos casos.

Os casos de invasão neoplásica foram presentes em 56,82% dos casos analisados. Os achados quanto a presença de hiperplasia ductal nas lâminas analisadas que correspondeu a 59,09% dos casos é similar ao encontrado em outras pesquisas, nos estudos de Bhola et al. os casos de hiperplasia ductal em glândulas salivares menores foi de 53% dentre as amostras analisadas. Além disso, a degeneração acinar também se mostrou significativa nas avaliações deste estudo. A degeneração acinar pode ter sido resultado do agente carcinógeno que causou uma isquemia tecidual que por sua vez pode ter induzido a proliferação e degeneração da glândula salivar acinar (MOHAN et al., 2016). Ademais, a degeneração em glândulas salivares menores túbulo mucosas foi discretamente maior se comparada a degeneração acinar. A metaplasia ductal se mostrou mais elevada nos resultados do presente estudo se comparada aos resultados de outras pesquisas, tendo uma presença de 63,64% nos casos analisados.

Conclusão

1. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos, foi observada diversas alterações em glândulas salivares menores localizadas na língua decorrente do processo de carcinogênese induzido quimicamente pelo agente 4NQO. A inflamação foi presente em todas as amostras analisadas. E a degeneração, tanto em ácinos serosos quanto em túbulos mucosas, foi presente na maioria dos casos, e a presença de displasia ductal também foi observada. É necessário mais estudos sobre a carcinogênese induzida quimicamente para entender como esse processo afeta as glândulas salivares menores e quais as principais alterações observadas.

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. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 19, n. 2, p. 299-303, jan./mar. 2023. DOI: 10.4103/jcrt.jcrt_1832_21.

CHAMOLI, A.; GOSAVI, A. S.; SHIRWADKAR, U. P.; WANGDALE, K. V.; BEHERA, S. K.; KURREY, N. K.; KALIA, K.; MANDOLI, A. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncology*, v. 121, p. 105451, out. 2021. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2021.105451.

DAROIT, N. B.; MARTINS, L. N.; GARCIA, A. B.; HAAS, A. N.; MAITO, F. L. D. M.; RADOS, P. V. Oral cancer over six decades: a multivariable analysis of a clinicopathologic retrospective study. *Brazilian Dental Journal*, v. 34, n. 5, p. 115-124, dez. 2023. DOI: 10.1590/0103-6440202305264.

INCA. Incidência de câncer no Brasil. 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acesso em: 02 jul. 2021.

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.

MOHAN, S. P.; CHITTURI, R. T.; RAGUNATHAN, Y. T.; LAKSHMI, S. J.; NALLUSAMY, J.; JOSEPH, I. Minor salivary gland changes in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: a histopathological study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, v. 10, n. 7, p. ZC12–ZC15, 2016. DOI: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20218.8116>.

SARODE, S. C.; SARODE, G. S.; SENGUPTA, N.; GHONE, U. Tobacco induced epithelial dysplasia at minor salivary gland excretory duct and oral cancer. *Oral Oncology*, v. 122, p. 105525, Nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105525>.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, v. 45, n. 4, p. 309-316, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>.

Anexos

Figura 1 - Sequência do protocolo de indução.

Figura 2 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Degeneração de Ácinos Serosos

Figura 3 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Degeneração de Tubulosas Mucosas

Figura 4 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Fibrose em Glândula Acinosa Serosa

Figura 5 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Fibrose em Glândula Tubulosa Mucosa

Figura 6 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Ectasia Ductal

Figura 7 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Displasia em Ácino Seroso

Figura 8 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Displasia Ductal

Figura 9 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Infiltrado inflamatório linfocítico

Figura 10 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Área de Eosinofilia

Figura 11 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Invasão Neoplásica

Figura 12 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Metaplasia Ductal

Figura 13 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Língua / Hiperplasia Ductal

Figura 14- a.Área de infiltrado inflamatório linfocítico nas proximidades dos ácinos serosos/
b.Hiperplasia Ductal/ c.Displasia Ductal/ d.Ectasia Ductal/ e.Metaplasia Ductal/
f.Degeneração e Necrose de Glândulas Tubulosas Mucosas.

Figura 15- g.Neoplasia maligna invadindo as glândulas tubulosas mucosas/ h.Invasão de ilha neoplásica maligna em glândula tubulosa mucosa de língua/ i. Seta amarela: Extensa área de degeneração e necrose dos ácinos serosos; Seta azul: Área de fibrose.

CÓDIGO: SB0674

AUTOR: EVELLYN JHADY NEGRIS DE CARVALHO

COAUTOR: RYAN CARLOS DE QUEIROZ AQUINO

COAUTOR: VINICIUS EDUARDO DA SILVA

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: ANÁLISE DE 691 PACIENTES COM CÂNCER CERVICAL ATENDIDOS PELA LIGA CONTRA O CÂNCER, PARA APLICAÇÃO DE IA E GERAÇÃO DE BANCO DE DADOS CLÍNICO-MOLECULAR-PATOLÓGICO NA GESTÃO DE TRATAMENTO

Resumo

O câncer do colo do útero configura-se como um dos principais desafios de saúde pública mundial, com alta mortalidade em países de baixa e média renda. A detecção precoce e a estratificação adequada de risco ainda representam barreiras significativas, agravadas pela heterogeneidade tumoral e pelos custos elevados do tratamento. Neste estudo, foram analisados dados clínicos, histopatológicos e moleculares de 691 pacientes atendidas na Liga Contra o Câncer (Natal/RN), a fim de treinar e validar modelos de aprendizado de máquina aplicados à classificação prognóstica. Foram utilizados diferentes algoritmos, como Support Vector Machine (SVM), K-Nearest Neighbors (KNN), Random Forest (RF), Regressão Logística (RL) e Gradient Boosting (GB). Todos foram combinados à validação cruzada k-folds, balanceamento com SMOTE e estratégia One-vs-One (OVO). O primeiro modelo, que incluiu SVM, obteve acurácia média de 90,72% (desvio padrão de 5,71%). Já o segundo modelo, com substituição do SVM por GB, redução de atributos e otimização de hiperparâmetros, alcançou desempenho superior, com acurácia de 93,23% e desvio padrão de 1,98%. Os resultados apontam que modelos baseados em Random Forest e Gradient Boosting, aliados a técnicas de pré-processamento adequadas, apresentam maior estabilidade, demonstrando potencial como ferramentas de apoio à decisão clínica. A adoção desse tipo de abordagem pode contribuir para a personalização terapêutica e para a melhoria da sobrevida.

Palavras-chave: Câncer cervical; Inteligência Artificial; Estratificação de risco.

TITLE: ANALYSIS OF 691 CERVICAL CANCER PATIENTS TREATED BY THE LEAGUE AGAINST CANCER, FOR APPLICATION OF AI AND GENERATION OF A CLINICAL-MOLECULAR-PATHOLOGICAL DATABASE IN TREATMENT MANAGEMENT

Abstract

Cervical cancer is one of the main global public health challenges, with high mortality rates in low- and middle-income countries. Early detection and adequate risk stratification still represent significant barriers, exacerbated by tumor heterogeneity and high treatment costs.

In this study, clinical, histopathological, and molecular data from 691 patients treated at the League Against Cancer (Natal, Rio Grande do Norte) were analyzed to train and validate machine learning models for prognostic classification. Different algorithms were used, including Support Vector Machine (SVM), K-Nearest Neighbors (KNN), Random Forest (RF), Logistic Regression (RL), and Gradient Boosting (GB). All were combined with k-fold cross-validation, balancing with SMOTE, and One-vs-One (OVO) strategy. The first model, which included SVM, achieved an average accuracy of 90.72% (standard deviation of 5.71%). The second model, which replaced SVM with GB, feature reduction, and hyperparameter optimization, achieved superior performance, with an accuracy of 93.23% and a standard deviation of 1.98%. The results indicate that models based on Random Forest and Gradient Boosting, combined with appropriate preprocessing techniques, exhibit greater stability, demonstrating potential as clinical decision-support tools. Adopting this type of approach can contribute to therapeutic personalization and improved survival.

Keywords: Cervical Cancer; Artificial Intelligence; Risk Stratification.

Introdução

O câncer do colo do útero representa um importante problema de saúde pública mundial, sendo o quarto tipo mais comum entre as mulheres (Gomes da Silva; Ministério da Saúde, 2016). A gravidade do cenário é acentuada em países de baixa e média renda, onde a desigualdade socioeconômica dificulta o acesso a exames de rotina, que são cruciais para o monitoramento e a detecção precoce de neoplasias. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), foram registrados mais de 600 mil novos casos e cerca de 350 mil mortes pela doença globalmente. No Brasil, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2022) estima uma taxa de incidência bruta de 15,38 casos para cada 100 mil mulheres para o ano de 2022, com mortalidade de 4,60 óbitos a cada 100 mil mulheres no ano de 2020. A principal causa do câncer cervical é a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), especialmente por tipos de alto risco, como o 16 e o 18 (INCA, 2022). A doença origina-se a partir de alterações celulares no colo do útero, a região que conecta o útero à vagina (Fowler, 2018). Uma característica fundamental dessa condição é sua longa fase de desenvolvimento. O câncer do colo do útero apresenta-se como uma doença de evolução lenta, caracterizada por uma fase pré-clínica prolongada, durante a qual podem surgir lesões precursoras passíveis de detecção e tratamento antes da progressão para a forma invasiva. Essa característica biológica é o que fundamenta a eficácia dos programas de rastreamento, uma vez que possibilita a identificação precoce das alterações celulares no epitélio cervical e a intervenção em estágios iniciais, reduzindo o risco de desenvolvimento do câncer invasivo (INCA, 2016). Porém, em casos de HIV não tratado, por exemplo, o desenvolvimento de um processo carcinogênico ocorre com rápida progressão, diminuindo em até menos da metade do tempo que normalmente leva-se para desenvolver-se em mulheres com o sistema imune eficaz (OMS, 2022). Apesar da eficácia comprovada dos programas de rastreamento na redução da incidência de pacientes com a neoplasia cervical (INCA, 2022), mulheres em estágio avançado possuem baixas opções para tratamento, o que pode justificar a alta taxa de mortalidade, sobretudo em países com o desenvolvimento socioeconômico precário. Devido à patologia carcinogênica complexa, resultado da infecção viral, alterações imunológicas, ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumores, há uma grande heterogeneidade tumoral, tornando o tratamento difícil e caro. Estima-se que a prevenção e o tratamento do câncer cervical no Brasil custem US\$ 1,32 bilhões, com os gastos indiretos representando 51% dos custos totais, seguidos pelos custos médicos diretos (consultas e procedimentos) e de transporte (8%) (Novaes et al., 2015). Diante disso, a identificação de

marcadores clínicos, patológicos e moleculares torna-se essencial para individualizar o tratamento, melhorar a precisão do prognóstico e reduzir o risco de recidiva. Portanto, usar ferramentas de Inteligência Artificial baseada em Machine Learning apresenta-se como uma alternativa de aperfeiçoamento de protocolos visando tratamentos personalizados. Por isso, integrantes do Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação (LAICI) juntamente com o Instituto de Tecnologia de Mauá coletaram e utilizaram 691 dados da Liga Contra Câncer, hospital localizado na cidade de Natal, capital do Rio Grande do Norte, a fim de obter como produto um tratamento mais eficaz de acordo com o prontuário médico e o estudo molecular treinado em uma Inteligência Artificial.

Metodologia

O projeto (Figura 1) foi desenvolvido a partir da análise, extração e utilização de 691 dados de pacientes com câncer cervical alocados na Liga Contra o Câncer, na cidade de Natal/RN. Em colaboração entre o Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação (LAICI) e o Instituto de Tecnologia de Mauá, foram selecionados, inicialmente, 1390 casos de pacientes, os quais 644 foram excluídos por falta de informações. Os 746 pacientes restantes com dados completos seguiram para a etapa de análise histopatológica, na qual 55 foram excluídas por apresentarem lesões benignas. Com isso, a amostra final do estudo foi composta por 691 pacientes. As informações coletadas foram organizadas em uma planilha do Excel, estruturada em categorias distintas: Identificação e Dados Demográficos; Informações Clínicas e Antecedentes de Saúde; Histórico Ginecológico e Obstétrico; Detalhes do Diagnóstico e Estadiamento; Resultados de Exames Laboratoriais e de Imagem; Procedimentos Cirúrgicos e Achados Anatomopatológicos; Registros de Tratamento; Perfil Imunohistoquímico; Acompanhamento e Desfecho clínico. Os pacientes elegíveis foram posteriormente classificados em quatro grupos: vivas com recidiva (n=45), vivas sem recidiva (n=369), óbitos com recidiva (n=148) e óbitos sem recidiva (n=92). O desenvolvimento do protótipo inicial de aprendizado de máquina foi feito a partir da submissão do conjunto de dados a quatro algoritmos amplamente reconhecidos na literatura científica: Support Vector Machines (SVM), método que procura um hiperplano que maximize a margem de separação entre as classes no espaço de características; K-Nearest Neighbors (KNN), classifica um novo ponto de teste examinando os k exemplos de treinamento mais próximos e atribuindo a classe majoritária entre eles; Random Forest (RF), que consiste em um conjunto de árvores de decisão construídas sobre amostras aleatórias do conjunto de dados; e Regressão Logística (RL) (Hastie; Tibshirani; Friedman, 2008). Após a definição de análise estatística, houve a aplicação de técnica de validação cruzada, utilizando método k-folds, em que os dados passaram por um processo de embaralhamento, visando minimizar possíveis vieses e elevar a confiabilidade. As informações foram divididas de forma que 80% constituíssem o conjunto de treinamento, enquanto os 20% restantes fossem reservados para teste. Além disso, devido a predominância numérica da categoria “vivos sem recidiva” foi incorporado o algoritmo SMOTE (Synthetic Minority Over-sampling Technique), que permitiu a geração de amostras sintéticas com base nas categorias minoritárias, promovendo uma distribuição mais equilibrada entre os grupos e evitando o enviesamento do modelo para a classe majoritária. Em seguida, foi implementada a estratégia one-vs-one (OVO), na qual os classificadores foram organizados em pares para confrontos diretos, com quatro modelos selecionados: SVM, KNN, Random Forest (RF) e Regressão Logística (RL). Assim, as combinações de disputa foram: SVM × KNN, SVM × RF, SVM × RL, KNN × RF, KNN × RL e RF × RL. Ou seja, para cada paciente, os resultados desses

confrontos indicavam a classe vencedora, sendo que a categoria mais frequente ao final das rodadas era atribuída ao indivíduo em questão. Após isso, para o segundo protótipo, foi realizada filtragem de atributos, removendo-se variáveis redundantes que poderiam comprometer a eficácia do processamento. Para isso, foi realizada a classificação de importância com o auxílio inicial de dois algoritmos: GB e RF, originando a exclusão de 19 colunas. Nessa etapa, portanto, os algoritmos de Random Forest e Gradiente Boosting (GB) foram utilizados separadamente para gerar rankings de importância das variáveis, com base na influência estatística de cada uma sobre as classificações, descartando as variáveis que apresentaram baixa relevância em ambas as listas. Diferente do modelo anterior, a otimização de hiperparâmetros foi realizada e o cruzamento de dados foi feito com SVM substituído pelo GB, uma vez que os dados não apresentavam linearidade suficiente para justificar o uso do primeiro. KNN, RF e RL foram mantidos. A otimização individual dos hiperparâmetros de cada classificador, que determinam o comportamento interno dos algoritmos, foram ajustados por meio de testes sucessivos para identificar a combinação ideal que maximiza o desempenho de cada modelo de forma independente. Ainda assim, a construção do segundo modelo seguiu a mesma lógica geral do primeiro: validação cruzada k-folds, aplicação do SMOTE para balanceamento e utilização da estratégia OVO para decisão da classificação final. Por fim, tanto para o primeiro quanto para o segundo modelo, a avaliação do desempenho foi realizada com o uso da matriz de confusão. Esta ferramenta apresenta uma matriz quadrada de 4x4, na qual as colunas correspondem às classes previstas pelo modelo e as linhas às categorias reais atribuídas às pacientes. O desempenho ideal é representado pela concentração dos acertos ao longo da diagonal principal, enquanto os valores fora da diagonal sinalizam os erros e as respectivas confusões cometidas pelo algoritmo.

Resultados e Discussões

O primeiro modelo construído para a tarefa de classificação incorporou, em sua arquitetura, quatro algoritmos: SVM (Support Vector Machine); KNN (K-Nearest Neighbors), RF (Random Forest) e RL (Regressão Logística). Esses algoritmos foram combinados usando a estratégia One-vs-One (OVO). Essa configuração inicial permitiu que o primeiro sistema obtivesse uma acurácia média de 90,72%, acompanhada de um desvio padrão médio de 5,71%. Quando analisada a matriz de confusão desse modelo (Figura 1), foi possível observar que, para a Classe 1 (Vivos sem recidiva), o modelo apresentou um desempenho bastante consistente, realizando 367 classificações corretas e apenas 2 incorretas, sendo estas últimas equivocadamente atribuídas à Classe 2 (Óbitos sem recidiva). Na Classe 3 (Vivos com recidiva), observou-se um resultado perfeito, com 100% de acerto nas previsões (45 acertos em 45 casos). Já a Classe 4 (Óbitos com recidiva) obteve 147 acertos e somente 1 erro de classificação. Na sequência, foi elaborado um segundo modelo, no qual o SVM foi substituído pelo algoritmo GB (Gradient Boosting). Além dessa alteração estrutural, ocorreu a remoção de 19 colunas do conjunto de dados, a partir da classificação de importância feita por dois algoritmos (GB e RF), e a otimização dos hiperparâmetros dos classificadores. Essas modificações resultaram em uma melhora de desempenho, observada por um alcance de uma acurácia média de 93,23% e um desvio padrão médio de apenas 1,98% (Figura 3).

As modificações, que diferenciam os dois modelos gerados, resultaram em uma melhora de desempenho, observada por um alcance de uma acurácia média de 93,23% e um desvio padrão médio de apenas 1,98%, no segundo modelo formatado. A matriz de confusão correspondente ao protótipo dois (Figura 3), revela uma alta concentração de valores na

diagonal principal, o que indica um número elevado de classificações corretas. O menor desvio padrão, por sua vez, sugere maior estabilidade e confiabilidade do algoritmo, reduzindo a variação dos resultados e reforçando seu potencial para aplicações práticas (Hastie; Tibshirani; Friedman, 2008). Sendo assim, o avanço mais significativo foi observado na transição entre os protótipos, sendo a substituição do algoritmo SVM pelo Gradient Boosting (GB), associada à remoção de variáveis e à otimização dos hiperparâmetros, determinante para o aprimoramento do desempenho. Essa observação preveniu que o algoritmo pudesse originar respostas viciadas e menos precisas, gerando uma acurácia que variou de 90,72% para 93,23% do primeiro para o segundo modelo, além de permitir maior estabilidade ao protótipo, refletida na drástica redução do desvio padrão (de 5,71% para 1,98%), que indicou maior confiabilidade (Hastie; Tibshirani; Friedman, 2008). A superioridade do Gradient Boosting Machine (GBM), técnica de aprendizado baseada em boosting, em relação ao Support Vector Machine (SVM) pode ser evidenciada no estudo de Singh (2018), em que a implementação de GBM alcançou 77,8% de sensibilidade, enquanto o SVM obteve 55,58% (Tanimu, 2022), com a otimização de hiperparâmetros sendo crucial para melhor desempenho (Singh 2018). Além disso, a relação complexa e não linear dos dados trabalhados apresenta-se como outro fator para que o SVM não atingisse o seu melhor desempenho. Isso acontece, pois o SVM funciona como um classificador de margem ampla que aprendem funções de limite linear (HSU, 2020). Quanto ao GB, assim como o Random Forest, baseado em árvores de decisão, torna-se mais adequado para capturar esses padrões e interações complexas. Sendo assim, a implementação prática do GB representa uma melhora significativa na utilização dos dados, permitindo ao modelo captar relações não lineares e proporcionar previsões mais precisas. A melhoria entre o modelo inicial e o subjacente evidenciaram que ajustes adicionais e otimização de hiperparâmetros podem elevar ainda mais o desempenho de aprendizagem de máquinas, aumentando a confiabilidade e sendo passível de se tornar uma possível ferramenta para aplicações clínicas.

Conclusão

O desenvolvimento de um modelo de aprendizado de máquina para prever o desfecho clínico de pacientes com câncer do colo do útero, utilizando dados do hospital Liga Contra o Câncer de Natal/RN, demonstrou ser uma abordagem promissora para otimizar o tratamento e o prognóstico. O estudo comparou dois protótipos distintos, evoluindo de um modelo inicial com acurácia média de 90,72% para um segundo, mais aprimorado, que atingiu 93,23% de acurácia com um desvio padrão significativamente menor, de 1,98%. Essa melhoria foi possível por modificações, como a substituição do algoritmo SVM por Gradient Boosting (GB), a remoção de variáveis menos relevantes e a otimização dos hiperparâmetros. Sendo assim, a transição entre os modelos evidenciou a importância de escolher as ferramentas de aprendizado de máquina adequadas para a natureza dos dados. A alta complexidade e a natureza não linear das variáveis clínicas e patológicas do câncer cervical tornaram o GB uma escolha superior ao SVM, permitindo ao modelo capturar relações sutis e complexas que são cruciais para a precisão das previsões. A redução do desvio padrão no segundo modelo, de 5,71% para 1,98%, indica uma maior estabilidade e confiabilidade do algoritmo. Portanto, a introdução de Machine Learning na área médica representa um passo importante para enfrentar os desafios impostos pela heterogeneidade tumoral e pelos altos custos do tratamento do câncer cervical. O modelo desenvolvido possui potencial para se tornar uma ferramenta de apoio à decisão clínica, permitindo, já no momento do diagnóstico, a classificação de pacientes em categorias de risco. Essa estratificação possibilitaria aos

oncologistas modular a intensidade da terapia e a frequência do acompanhamento de forma individualizada, o que poderia melhorar as taxas de sobrevida. Dessa forma, o modelo gerado, ao classificar pacientes em diferentes grupos de risco, propõe-se a tornar-se uma ferramenta de apoio à decisão clínica, permitindo que os oncologistas ajustem as estratégias terapêuticas de forma individualizada. A análise inicial do projeto proposto sugere que a contínua pesquisa e o desenvolvimento de modelos mais sofisticados podem pavimentar o caminho para uma medicina mais precisa e acessível.

Referências

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, v. 543, p. 378–384, 2017.

CRAFTON, S. M.; SALANI, R. Beyond chemotherapy: an overview and review of targeted therapy in cervical cancer. *Clinical Therapeutics*, v. 38, p. 449–458, 2016.

CROSBIE, E. J.; EINSTEIN, M. H.; FRANCESCHI, S.; KITCHENER, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, v. 382, p. 889–899, 2013.

FOWLER, J. R.; JACK, B. W. Cervical Cancer. In: STATPEARLS. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431093/>. Acesso em: 17 ago. 2025.

GOMES DA SILVA, J.; BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero_2016_corrigido.pdf. Acesso em: 17 ago. 2025.

HARSH, D.; SINGH. Diagnosis of Cervical Cancer using Hybrid Machine Learning Models MSc Research Project Data Analytics. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://norma.ncirl.ie/3425/1/harshdevsingh.pdf>.

HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; FRIEDMAN, J. The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction. 2. ed. New York: Springer, 2008.

HSU, B.-M. Comparison of Supervised Classification Models on Textual Data. *Mathematics*, v. 8, n. 5, p. 851, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Dados e números sobre câncer do colo do útero: relatório anual 2022. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_colo_22setembro2022.pdf. Acesso em: 17 ago. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Fatores de risco para o câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/fatores-de-risco>. Acesso em: 17 ago. 2025.

JIANG, J. et al. Predictive model for the 5-year survival status of osteosarcoma patients based on the SEER database and XGBoost algorithm. *Scientific Reports*, v. 11, p. 5542, 2021.

NOVAES, H. M. D. et al. Annual national direct and indirect cost estimates of the prevention and treatment of cervical cancer in Brazil. *Clinics*, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 289–295, 2015.

OJESINA, A. I. et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*, v. 506, p. 371–375, 2014.

ONCOLOGY, FIGO COMMITTEE. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 125, p. 97–98, 2014.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Câncer do colo do útero. Washington, D.C.: OPAS, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer-do-colo-do-utero>. Acesso em: 17 ago. 2025.

SANTANA, E. et al. Câncer cervical: etiologia, diagnóstico e prevenção. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 15, n. 4, p. 199–204, 2008.

SNIJDERS, P. J.; STEENBERGEN, R. D.; HEIDEMAN, D. A.; MEIJER, C. J. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *The Journal of Pathology*, v. 208, p. 152–164, 2006.

TANIMU, J. J. et al. A Machine Learning Method for Classification of Cervical Cancer. *Electronics*, v. 11, n. 3, p. 463, 2022.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 65, p. 87–108, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cervical Cancer. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. Acesso em: 17 ago. 2025.

Anexos

Figura 1 - Fluxograma da metodologia utilizada. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 - Matriz de confusão protótipo 1.

Figura 3 - Matriz de confusão protótipo 2

CÓDIGO: SB0688

AUTOR: LUCAS BARBOSA DA COSTA

ORIENTADOR: HUGO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ROCHA

TÍTULO: Blends antioxidantes constituídos de xilana de sabugo de milho e extratos de alho e limão

Resumo

Este trabalho tem como objetivo investigar as propriedades bioativas da xilana, um polissacarídeo rico em unidades de xilose extraído do sabugo de milho (*Zea mays*), a fim de contribuir tanto para a valorização de subprodutos agrícolas quanto para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis. A produção em larga escala de milho, atualmente a terceira commodity mais comercializada no mundo, gera quantidades significativas de resíduos, uma vez que, a cada 100 kg de grãos, aproximadamente 18 kg correspondem a sabugo. Considerando esse cenário, a pesquisa buscou avaliar o potencial desse material como fonte de compostos de interesse farmacológico, com ênfase em atividades antioxidantes. Para isso, foram realizadas análises químicas destinadas a verificar a pureza das amostras, além da elaboração de blends envolvendo a xilana em associação com substâncias conhecidas por sua ação antioxidante, como extratos de alho e limão. Os resultados preliminares indicaram que a xilana apresenta propriedades redutoras e capacidade de neutralizar radicais hidroxila, características importantes no combate ao estresse oxidativo. Dessa maneira, o estudo reforça a relevância da exploração científica da xilana, tanto para a proposição de novas aplicações biomédicas quanto para o aproveitamento sustentável de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: palavras-chaves: sabugo de milho; estresse oxidativo; *Zea mays*; polis

TITLE: Xylan Conjugation with Garlic and Lemon Extracts: Evaluation of In Vitro Antioxidant Activity

Abstract

This study aims to investigate the bioactive properties of xylan, a polysaccharide rich in xylose units extracted from corn cobs (*Zea mays*), in order to contribute both to the valorization of agricultural by-products and to the development of sustainable alternatives. Large-scale corn production, currently the third most traded commodity worldwide, generates significant amounts of residues, since approximately 18 kg of cobs are obtained for every 100 kg of grains. Within this context, the research sought to evaluate the potential of this material as a source of pharmacologically relevant compounds, with an emphasis on antioxidant activity. To achieve this, chemical analyses were performed to verify sample purity, along with the preparation of blends combining xylan with substances already known for their antioxidant action, such as garlic and lemon extracts. Preliminary results indicated that xylan exhibits reducing properties and the ability to neutralize hydroxyl radicals, both of which are important characteristics in combating oxidative stress. Thus, this study highlights the

relevance of the scientific exploration of xylan, not only for proposing new biomedical applications but also for the sustainable use of agro-industrial residues.

Keywords: Key-words: oxidative stress; antioxidant capabilities; polysaccharide;

Introdução

1.1 importância econômica O milho desempenha um papel fundamental na economia global devido às suas diversas aplicações e demanda constante. Como uma das principais culturas alimentares e commodities agrícolas, o milho é amplamente cultivado em várias partes do mundo para alimentação humana e animal, além de ser uma fonte crucial para a indústria. O milho é consumido de várias formas, como grão, farinha, óleo, xarope de milho e produtos processados. Além disso, o milho é utilizado como matéria-prima na produção de uma variedade de produtos industrializados, incluindo plásticos, adesivos, amidos modificados, etanol e outros produtos químicos.

1.2 Importância do sabugo de milho O sabugo corresponde à porção central da espiga de milho, sendo composto por quatro partes distintas: a palha fina, a palha grossa, o anel lenhoso e a medula. A palha fina representa cerca de 5% do peso total do sabugo de milho, enquanto a palha grossa contribui com aproximadamente 33%. O anel lenhoso corresponde a maior parte, representando cerca de 60% do peso, enquanto a medula contribui com cerca de 2% (BHATTACHARIA et al., 2005, VIANA, 2017). O cerne do anel de madeira e a região central são compostos principalmente por hemicelulose, sendo as xilanas os seus principais constituintes (MELO-SILVEIRA, 2010). Embora a xilose seja um dos monossacarídeos mais abundantes nas xilanas, é amplamente aceito que essas moléculas também contenham ácido 4-O-metil-D-glucurônico e L-arabinose (SILVA et al., 1998). As xilanas obtidas a partir da estrutura do milho representam moléculas bioativas que exibem um notável potencial farmacológico em uma variedade de sistemas. Elas demonstram capacidade de inibir a proliferação de células tumorais (MELO-SILVEIRA et al., 2019) e da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, além de apresentarem propriedades anticoagulantes (MELO-SILVEIRA et al., 2012), imunomoduladoras (VIANA, 2017) e antioxidantes (JESUS et al., 2018). Há numerosos relatos de polissacarídeos que exibem atividade antioxidante (TROMMER; NEUBERT, 2005; CÂMARA et al., 2011; PATEL; NARAIAN; SINGH, 2012). Para ampliar a atividade antioxidante, uma abordagem sugerida é a criação de blends que combinem esses polissacarídeos com outros agentes antioxidantes bem conhecidos, como plantas medicinais e especiarias, como a cebola e alho (TABASUM et al., 2018). O alho (*Allium sativum*) tem sido amplamente utilizado como agente aromatizante em todo mundo, tanto na medicina tradicional quanto como um alimento funcional destinado a promover a saúde (RAHMAN e LOWE, 2006). Enquanto isso, o limão (*Citrus lemon*) é reconhecido como uma planta medicinal de importância significativa (DHANAVADE et al., 2011), pois, na qualidade de fruta cítrica, é uma rica fonte de antioxidantes e como ácido ascórbico, flavonóides e compostos fenólicos (MOOSAVY et al., 2017). No que tange à elaboração de misturas contendo xilanas e extratos aquosos de limão e alho, até o momento, não há registros de sua produção, assim como do seu emprego específicos para fins de atividade antioxidante. portanto, este estudo teve como objetivo a criação de combinações envolvendo esses três componentes e a avaliação de seu potencial como agentes bioativos

Metodologia

2.1 Obtenção do sabugo de milho Os grãos de milho utilizados neste estudo pertencem à espécie *Zea mays*. As três espigas de milho foram adquiridas no laboratório, no Rio Grande do Norte. Para a obtenção da farinha a partir dos sabugos de milho, os grãos foram removidos

e os sabugos passaram por um processo de secagem em estufa a 60 °C, seguido de trituração. Esse procedimento resultou na obtenção da farinha de sabugo de milho. Com o intuito de remover lipídios e pigmentos, foram adicionados 200 mL de etanol para cada 10 g de farinha. O material foi então mantido a 4 °C por 12 horas. Esse processo foi repetido até que não fossem mais visíveis pigmentos no álcool. Ao término do processo, obteve-se uma farinha livre de lipídios. Esse material foi utilizado nas etapas subsequentes.

2.2 Extração da xilana do sabugo de milho Os polissacarídeos presentes no sabugo de milho foram extraídos seguindo o procedimento descrito por Melo-Silveira (2010). Inicialmente, a farinha isenta de lipídios, obtida a partir do sabugo de milho, foi combinada com uma solução de NaOH 1,8 M numa proporção de 1 g de farinha para cada 25 mL de solução. Posteriormente, a mistura foi submetida a ondas de ultrassom a uma potência de 120 W, num total de 30 minutos: divididos em três ciclos de 10 minutos cada, com intervalos de 5 minutos entre eles. Após essa etapa, a solução foi centrifugada a 8.000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. O líquido sobrenadante foi separado e sobre ele foram adicionados quatro volumes de metanol, com o objetivo de precipitar os polissacarídeos. Essa mistura foi mantida nessas condições por 12 horas. Posteriormente, a amostra foi submetida a uma nova centrifugação a 8.000 rpm e 4°C, por 20 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado, composto pelos polissacarídeos, foi seco e empregado nas técnicas subsequentes. De acordo com o procedimento realizado, o material obtido foi designado com xilana extraída do sabugo de milho.

2.3 Determinação da composição química dos polissacarídeos obtidos Com a intenção de iniciar a caracterização química dos polissacarídeos extraídos, foram conduzidos testes para determinar a quantidade total de açúcares, o teor de proteínas e a concentração de compostos fenólicos. Em etapas posteriores, amostras do extrato bruto da xilana extraída do sabugo de milho (XIL) foram utilizadas, com uma concentração de 6 mg/mL em água destilada.

2.4 Dosagem de Açúcares Totais Os açúcares totais da amostra foram quantificados através do método do fenol/ácido sulfúrico. Xilose foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração, a partir da qual a quantidade de açúcares nas amostras foi determinada. O método baseia-se na quebra das hidroxilas dos carboidratos pela ação do ácido, convertendo os sacarídeos em furfural e metilfurfural. Estes compostos reagem com o fenol e o produto resultante é medido a 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

2.5 Dosagem de proteínas O teor de proteína correspondente da amostra foi determinado com o reagente de Bradford, comassie blue R 250, usou-se como padrão albumina bovina e sendo as leituras realizadas a 595 nm (SPECTOR, 1978).

2.6 Dosagem de compostos fenólicos Os compostos fenólicos foram avaliados quantitativamente pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando-se como padrão o ácido gálico. O reagente de Folin-Ciocalteu oxida os compostos fenólicos presentes na amostra, gerando uma coloração que é monitorada a 765 nm (MELO-SILVEIRA et al., 2012).

Atividades antioxidantes As atividades, cujo intuito é investigar o potencial antioxidante da amostra, foram realizadas após a mistura da XIL com o extrato de alho fervido.

2.7 Poder redutor O poder redutor das amostras foi avaliado seguindo a metodologia previamente descrita (MELO-SILVEIRA et al., 2014). Uma solução contendo as amostras em diferentes proporções, juntamente com os blends em tampão fosfato (0,2 M, pH 6.6) e ferricianeto de potássio (1%), foi incubada a 60 °C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%, seguida de mistura com água destilada e cloreto de ferro (0,1%). A absorbância da solução foi então medida a 700 nm.

2.8 Quelação de cobre Com intuito de reproduzir esse teste, sob a prática de Megías e colaboradores (2009), o ensaio é baseado na capacidade de uma determinada amostra quelar os íons de cobre em solução. A detecção dos íons livres na solução é realizada com o uso do reagente violeta de pirocatecol. Esse reagente consegue interagir com alguns espécimes de cátions como alumínio, cobre, bismuto e tório (ANTON, 1960). Conforme isso,

os compostos presentes nas amostras competem com o reagente violeta de pirocatecol para quelar os íons de cobre. Resumidamente, 230 μ L das amostras em diferentes proporções com os blends dissolvidas em tampão acetato pH 6,0 foram adicionadas a 6 μ L de violeta de pirocatecol a 4 mM, e somadas a 100 μ L de sulfato de cobre pentahidratado (50 μ g/mL no tampão acetato). Ao concluir o teste, toda a solução foi homogeneizada e monitorada a 632 nm. 2.9 Capacidade total de antioxidantes O ensaio é baseado na redução de molibdênio +6 para molibdênio +5 pelo extrato de polissacarídeo e subsequente formação de um complexo esverdeado fosfato/molibdênio+5 em pH ácido (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Os tubos contendo os polissacarídeos e reagentes (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sódio e 4 mM molibdato de amônia) foram incubados por 90 min. posteriormente, a absorbância de cada solução foi medida a 695 nm contra um branco. A capacidade de antioxidante total é expressa em equivalentes de ácido ascórbico, composto com atividade antioxidante conhecida. 2.10 Formação de blends Sob a perspectiva de ampliar a atividade antioxidante da amostra de xilana, realizou-se blends entre a XILANA e extrato de alho e limão em diferentes proporções a fim de encontrar o blend com melhor atividade antioxidante. Obteve-se 5 blends diferentes. 3.1 Ensaio de viabilidade celular p

Resultados e Discussões

No início, o projeto original envolvia a conjugação covalente do ácido gálico com a xilana. Entretanto, devido a circunstâncias que não estavam sob o controle do executor do projeto, foi necessário criar um plano alternativo de execução. Esse plano B consistiu no desenvolvimento de um blend composto por extrato de limão, alho e xilana, com o objetivo de produzir um produto com propriedades antioxidantes. 3.1 Caracterização da composição química da amostra de xilana Com a determinação da composição química foi observado que todos os blends eram muito semelhantes na quantidade de açúcares. Quando se abordou a possível presença de contaminação por compostos fenólicos, constatou-se um teor de 4% dessas substâncias nas amostras. Com relação à contaminação protéica, verificou-se que a amostra apresentou cerca de 1% de contaminação. 3.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES Foram realizados três testes antioxidantes, a amostra que exibiu melhor atividade antioxidante foi o blend 1:1 No teste capacidade de antioxidante total (CAT) obteve 54,7 mg de ácido ascórbico/g, no teste de poder redutor observou 46,2% de atividade e na capacidade quelante de íons cobre obteve 65,3%. 3.3 Resultados – Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) O ensaio de MTT foi conduzido para avaliar os efeitos citotóxicos da xilana (XIL), do extrato de alho e limão (ELG) e do blend (B1:1) em diferentes concentrações (0,025 – 1,5 mg/mL). O controle negativo (CN) apresentou viabilidade celular próxima a 100%, confirmando a normalidade do ensaio. O blend B1:1 demonstrou maior efeito proliferativo em baixas concentrações, com destaque para 0,05 mg/mL, que aumentou a viabilidade celular acima de 120% em comparação ao controle. Em concentrações intermediárias (0,25 – 1,0 mg/mL), o blend manteve viabilidade acima de 80%, indicando baixa citotoxicidade. Contudo, em 1,5 mg/mL observou-se discreta redução, permanecendo ainda acima de 70%. A xilana isolada (XIL) apresentou comportamento distinto: em todas as concentrações testadas, a viabilidade celular manteve-se reduzida em torno de 40–60%, sugerindo citotoxicidade moderada ou ausência de efeito proliferativo. Já o extrato de alho e limão (ELG) exibiu viabilidade variável conforme a concentração. Concentrações mais baixas (0,025–0,25 mg/mL) mantiveram viabilidade próxima de 60–70%. Em concentrações mais altas (0,5–0,7 mg/mL), houve queda acentuada, alcançando valores próximos a 40%, sugerindo efeito citotóxico mais evidente. De modo geral, os resultados indicam que o blend (B1:1) promoveu maior viabilidade celular, inclusive com efeito estimulatório em baixa concentração, enquanto a

xilana isolada apresentou efeito redutor consistente e o extrato de alho e limão mostrou-se citotóxico em doses mais elevadas.

Conclusão

A quantidade de contaminantes proteicos presente na xilana extraída do sabugo de milho mostrou-se muito baixa, indicando boa pureza do polissacarídeo. A concentração de compostos fenólicos também foi reduzida, reforçando a necessidade de avaliar os efeitos antioxidantes a partir da combinação com outros extratos. A associação da xilana com os extratos aquosos de alho e limão resultou em aumento significativo da capacidade antioxidante, evidenciando efeito sinérgico. Entre as formulações testadas, o blend 1:1 (50% xilana e 50% extrato de alho e limão) apresentou melhor desempenho antioxidante. No ensaio de viabilidade celular (MTT), o blend 1:1 promoveu maior viabilidade celular, apresentando inclusive efeito estimulatório em baixas concentrações. Em contrapartida, a xilana isolada exibiu efeito redutor consistente, enquanto o extrato de alho e limão demonstrou maior citotoxicidade em concentrações elevadas. De forma geral, os resultados reforçam o potencial do blend 1:1 como estratégia promissora para o desenvolvimento de formulações bioativas com aplicações biomédicas e sustentáveis.

Referências

JESUS, Andressa Pereira et al. Obtenção e caracterização de Xilana a partir de resíduos agrícolas (casca de arroz e sabugo de milho). In: CONGRESSO ESTADUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO IF GOIANO, 7., 2018, Rio Verde, 2018. p. 1 - 3. CARVALHO, Flavio Condé de. DISPONIBILIDADE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS E DO BENEFICIAMENTO DE PRODUTOS AGRÍCOLAS. Informações Econômicas, SP, v. 22, n. 12, p.31-46, 1992. CHEN, Yun et al. Polysaccharides from Traditional Chinese Medicines: Extraction, Purification, Modification, and Biological Activity. *Molecules*, v. 21, n. 12, p.1705- 1728, 13 dez. 2016. MELO-SILVEIRA, Raniere Fagundes 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 Science*, v. 13, n. 1, p.409- 426, 2012 COSTA, Leandro Silva et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 64, issue 1, p. 21-28, 2010. COSTA, Leandro Silva et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Heterofucans from the Seaweed *Sargassum filipendula*. *Marine Drugs*, v. 9, n. 6, p.952-966, 2011. DECKER, Eric A.; WELCH, Barbara. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 38, n. 3, p.674-677, 1990. CURCIO, Manuela et al. Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 57, n. 13, p.5933-5938, 2009. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956 EBRINGEROVÁ, Anna et al. The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties. *Carbohydrate Polymers*, Bratislava, v. 37, n. 3, p.231-239, 1998. FAO. FAO Cereal Supply and Demand Brief: The forecast for 2022 global cereal production lowered while stocks raised. 2022. MEGÍAS, E.; PASTOR-CAVADA, E.; TORRES-FUENTES, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; ROCIO, J.; PASTOR, J.; VIOQUE, J. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *Eur Food Res Technol*, v. 230, n. 2, p. 353-359, 2009. MELO-SILVEIRA, R.F.

Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010. MELO-SILVEIRA, Raniere et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Extract from a Neglected Agricultural Product: Corn Cobs. *Molecules*, v. 19, n. 4, p.5360-5378, 2014. MELO-SILVEIRA, Raniere Fagundes et al. Antiproliferative xylan from corn cobs induces apoptosis in tumor cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 210, p.245-253, abr. 2019. . TELLES, Cinthia B.s. et al. Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties in vitro. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, n. 3, p.514-521, 2011. YEN, Gow-chin; DUH, Pin-der; TSAI, Hui-ling. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, v. 79, n. 3, p.307-313, 2002. ABOLHASSANI1, Moussa 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. *International Journal of Health Studies*.

CÓDIGO: SB0689

AUTOR: VITOR MONTEIRO OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: BRUNO CAVALCANTE BELLINI

TÍTULO: Nova espécie de *Sminthurinus* (Hexapoda, Collembola, Symphypleona, Katiannidae) para o Nordeste brasileiro.

Resumo

O gênero *Sminthurinus* Börner, 1901 (Collembola, Katiannidae) abrange cerca 90 espécies amplamente distribuídas pelo planeta. Colêmbolos desse gênero são caracterizados por um quarto segmento antenal sem subdivisões, terceiro segmento antenal com papila sensorial basal, presença de cerda neosminturoide na área parafurcal, e dentes da fúrcula com quetotaxia ventral reduzida. O conhecimento desse gênero permanece limitado atualmente no Brasil, o que se dá devido à escassez de esforços para amostragem e da pequena quantidade de taxonomistas especializados no país. Esse trabalho tem como foco a descrição de uma nova espécie do gênero *Sminthurinus* Börner, 1901, coletada em Natal, no Rio Grande do Norte. Os espécimes foram coletados com armadilhas do tipo pitfall e montados para microscopia seguindo metodologia padronizada. Posteriormente foram estudados e desenhados sob microscópio óptico com câmara clara. *Sminthurinus* sp. nov. pode ser diagnosticada pelo complexo empodial II com unguículos bem desenvolvido, apêndice subanal da fêmea típico do gênero, região de assimetria de cerdas clipeal com seis cerdas, antena I com sete cerdas e dentes da fúrcula com 12 cerdas dorsais. A descrição de novas espécies é fundamental para fomentar pesquisas ecológicas e planos de conservação. Assim, este trabalho se alinha ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 15 (ODS 15), que tem como foco a conservação dos ecossistemas terrestres.

Palavras-chave: Quetotaxia, fauna edáfica, Região Neotropical, taxonomia.

TITLE: A new species of *Sminthurinus* (Hexapoda, Collembola, Symphypleona, Katiannidae) from Northeastern Brazil.

Abstract

The genus *Sminthurinus* Börner, 1901 (Collembola, Katiannidae) comprises about 90 species widely distributed across the planet. Collembolans of this genus are characterized by a fourth antennal segment without subdivisions, a third antennal segment with a basal sensory papilla, the presence of neosminthuroid setae in the parafurcal area, and dentes of the furca with reduced ventral chaetotaxy. Knowledge of this genus in Brazil is currently limited, due to the scarcity of sampling efforts and the small number of specialized taxonomists in the country. This work focuses on the description of a new species of the genus *Sminthurinus* Börner, 1901, collected in Natal, Rio Grande do Norte state. The specimens were collected with pitfall traps and mounted for microscopy following a standardized methodology. Subsequently, they were studied and drawn under a light microscope with a camera lucida. *Sminthurinus* sp. nov. can be diagnosed by the empodial complex II with a well-developed unguiculus, the typical female subanal appendage of the genus, a region of clypeal chaetotaxy

asymmetry with six setae, antenna I with seven setae, and dentes of the furca with 12 dorsal setae. The description of new species is fundamental for fostering ecological research and conservation plans. Thus, this work aligns with the Sustainable Development Goal 15 (SDG 15), which focuses on the conservation of terrestrial ecosystems.

Keywords: Chaetotaxy, soil fauna, Neotropical region, taxonomy.

Introdução

Sendo um dos clados mais basais de Hexapoda, fazendo parte do grupo Entognatha, juntamente com Diplura e Protura, a classe Collembola é representada por pequenos artrópodes ápteros presentes em quase todos os ecossistemas terrestres (PALACIOS-VARGAS ET AL; HORNUNG-LEONI; GARRIDO, 2012), sendo constituídos por quatro ordens: Entomobryomorpha, Poduromorpha, Symphypleona e Neelipleona (DEHARVENG, 2004). Colêmbolos desempenham papéis ecológicos muito importantes em relação à ciclagem de nutrientes do solo, e também participa na decomposição de matéria orgânica, além de regularem as populações de fungos e bactérias (HOPKIN, 1997). Esses artrópodes possuem um conjunto de sinapormofias exclusivas, sendo elas: o colóforo; a fúrcula, um apêndice bifurcado usado para saltar; e o tenáculo, uma estrutura que ancora a fúrcula em forma de repouso (HOPKIN, 1997). A ordem Symphypleona foi proposta por Börner em 1901, e nela estão agrupados colêmbolos com corpo globular, característica resultante da fusão dos segmentos torácicos e dos primeiros quatro segmentos do abdômen. Além disso, são animais que apresentam antenas mais longas do que a cabeça, e um aparelho bucal hipognato. A ordem atualmente possui 10 famílias reconhecidas (BRETTFELD, 1999), sendo elas: Arrhopalitidae Stach, 1956; Bourletiellidae Börner, 1912; Collophoridae Bretfeld, 1999; Dicyrtomidae Börner, 1906; Katiannidae Börner, 1913; Mackenziellidae Yosii, 1961; Sminthuridae Lubbock, 1862; Sminthuridae Börner, 1906; Spinothecidae Delamare-Deboutteville, 1961; e Sturmiidae Bretfeld, 1994.

Parte da superfamília Katiannoidea, a família Katiannidae, é o grupo mais diversificado, contém 22 gêneros e aproximadamente 200 espécies descritas (BELLINGER, 1996–2024). Na região Neotropical, Katiannidae é representada por cinco gêneros, sendo eles: *Arborianna Bretfeld*, 2002, *Katianna Börner*, 1906, *Katiannellina Delamare-Deboutteville & Massoud*, 1963, *Stenognathellus Stach*, 1956 e *Sminthurinus Börner*, 1901 (BELLINGER, 1996–2024). Apresentam uma distribuição muito ampla e uma morfologia que contém variações consideráveis entre seus gêneros. Contudo, o conhecimento da real diversidade dessa família continua incompleto, principalmente em regiões pouco amostradas como a Neotropical, já que esta abriga um número expressivo de espécies não descritas, o que demonstra uma lacuna de conhecimento que impossibilita o total entendimento da real biodiversidade edáfica, além de limitar a elaboração de estratégias de conservação (ABRANTES et al., 2010; POTAPOV et al., 2020). Os membros dessa família são colêmbolos globulares tipicamente muito pequenos, contendo espécies com cores vibrantes e chamativas. O grande abdômen (Tórax I a Abdômen IV) contém três pares de tricobótriassensorias (A, B e C) em um padrão triangular. O pequeno abdômen possui um par de tricobótrias (D), entretanto, essa característica pode ser ausente em certas espécies. Há a presença de um órgão metatrocanteral ao menos no trocânter III. No tenáculo, existem três dentes e um apêndice basal em cada um dos dois ramos, com o corpo do tenáculo contendo entre duas a nenhuma cerda (BRETTFELD, 1999).

Espécies desse gênero se caracterizam pelo: quarto segmento antenal (Ant. IV) sem subdivisões ou anelações claras; terceiro segmento antenal (Ant. III) com uma papila sensorial; sacos do tubo ventral lisos; fúrcula com chaetotaxia ventral reduzida no dens;

múcron curto, com a margem externa lisa e interna crenulada, sem cerda mucronal; presença de cerdas neosminturóides na área parafurcal; e, nas fêmeas, a cerda a0 no sexto segmento do abdômen (Abd. VI) é geralmente bifurcada (BRETZFELD, 1999; PALACIOS-VARGAS & VACAFLORES-ARGANDOÑA, 2020).

Esse trabalho apresenta a descrição detalhada de uma nova espécie do gênero *Sminthurinus* para o Brasil, enriquecendo o conhecimento sobre a fauna de solo para a manutenção dos ecossistemas terrestres, assim, se alinhando ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 15 (ODS 15) da Agenda 2030 da ONU.

Metodologia

As coletas foram feitas em um pequeno fragmento de Mata Atlântica chamado informalmente de “Mata da CAERN”, localizado na área do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal. Está área pertencia originalmente à grande mancha florestal que hoje é delimitada pelo Parque Estadual Dunas de Natal, entretanto, além de abranger um espaço pequeno, também foi modificada e alterada por estar inserida em um contexto de matriz urbana.

A amostragem da fauna de colêmbolos foi realizada a partir da utilização de armadilhas de queda (pitfall), um método popularmente eficaz para amostrar organismo que se deslocam na superfície do solo.

As expedições ocorreram durante o período diurno, havendo a instalação dos pitfalls no dia 25 de abril de 2022 e sua retirada no dia 27, após 48 horas. Em seguida, o material foi guardado em potes com álcool a 70%, contendo etiquetas com as informações do campo. A triagem foi feita no Laboratório de Collebola da UFRN, com uso de um microscópio estereoscópio Leica S8AP0, Placas de Petri e pissetas. Depois da triagem, os espécimes foram preparados em lâminas semipermanentes com os reagentes Líquido de Nesbit (para descolorir os espécimes), Líquido de Arlé (substância tampão) e Líquido de Hoyer, como meio de montagem. Posteriormente, os espécimes montados foram estudados em microscópio óptico Leica DM500, com câmara clara acoplada. A morfologia dos espécimes foi desenhada em grafite e em seguida vetorizada e organizada em pranchas descritivas no software CorelDraw 2022.

Resultados e Discussões

A seguir é apresentada a descrição e suas respectivas notas taxonômicas de *Sminthurinus* sp. nov.

Material analisado. Holótipo fêmea, Brazil, Rio Grande do Norte, Natal, Campus Central da UFRN, Mata da CAERN (05°50'09.8"S; 35°12'15.3"W), 25-27.iv.2022, Medeiros et al. coll., coleta com armadilhas do tipo pitfall. Parátipos 0 machos e 7 fêmeas, mesmos dados do holótipo. Antena. Ant. I com 7 cerdas, sendo 2 curtas; Ant. II com 15 cerdas; Ant. III com 20 cerdas, presença de 1 órgão apical e 3 protuberâncias (Fig. 1A); Ant. IV simples, sem subdivisões ou verticilos claramente distintos, com um total de 115 cerdas e 1 órgão sensorial apical (Fig. 1B).

Cabeça. com 8+8 olhos, mancha ocular com 2 cerdas interoculares. Região frontal: linha E com 2+2 cerdas; linha D com 1+1 espinhos e 1+1 cerdas; linha C com 1+1 espinhos finos e curtos; linha B com 2+2 espinhos finos e curtos; linha A com 2+2 cerdas. Região interantenal: linha γ com 2+2 ou 1+1 cerdas; linha β com 2+2 cerdas; linha α com 2+2 cerdas. Região clipeal: linha f com 6+6 cerdas; linha e com 7+7 cerdas; linha d com 5+5 cerdas; linha c com 6+6 cerdas; linha b com 10+10 cerdas; linha a com 9+9 cerdas; 3+3 cerdas pré labrais; área central clipeal de assimetria com 6 cerdas (Fig. 2A e B). Região do lábio com quatro cerdas basoproximais e quatro basolaterais (Fig. 2B).

Perna I. Coxa com 1 cerda; trocânter com 2 cerdas; fêmur com 11 cerdas, sendo uma dela mais grossa e com o alvéolo maior; tibiotarso com 37 cerdas, sendo mais longas na região apical. Complexo empodial com 1 cerda pré-tarsal, unguis 1 dente interno, sem túnica ou pseudoníquia, unguículus mais curto que o unguis, sem dentes evidentes (Fig. 3).

Perna II. Epicoxa sem cerdas; subcoxa com 2 cerdas; coxa com 2 cerdas; trocânter com 5 cerdas, sendo uma delas curta em amplo alvéolo (órgão trocanteral); fêmur com 13 cerdas; tibiotarso com 43 cerdas, sendo mais longas na região apical. Complexo empodial com 2 cerdas pré-tarsais, unguis 1 dente interno, sem túnica ou pseudoníquia, unguículus mais curto que o unguis, com um dente interno (Fig. 4).

Perna III. Epicoxa sem cerdas, subcoxa com 4 cerdas; coxa com 2 cerdas, sendo uma muito curta; trocânter com 4 cerdas, sendo uma delas curta e em amplo alveolo (órgão metatrocanteral); fêmur com 9 cerdas; tibiotarso com 37 cerdas, sendo 2 mais longas na região apical. Complexo empodial com 1 cerda pré-tarsal, unguis sem dente interno, sem túnica ou pseudoníquia, unguículus mais curto que o unguis, com um dente interno (Fig. 5).

Grande abdome. Corpo globoso sem segmentação aparente; quetotaxia formada por cerdas simples, curtas e lisas, tricobótrias A,B,C e D presentes; cerda neosminturóide presente na área parafurcal, juntamente com mais 8 cerdas simples (Fig. 6).

Pequeno abdome. Formado pelo Abd. VI. Valva anal dorsal com cerdas: as2-4; ms1-5, mps1-3 e ps1-2, ms1 ímpar e com ápice bifurcado, ps1 ímpar. Cada valva anal ventral com cerdas: aai1-4, ail-9; mpi1-2, mi1-5; pi1-3, mi5 modificada na fêmea em apêndice subanal característico do gênero (Fig. 7).

Fúrcula. Manúbrio com 7 cerdas dorsais; face ventral do manúbrio sem cerdas; Dens dorsal com 12 cerdas, dens ventral com 4 cerdas, seguindo a fórmula da base para o ápice: 1...3. Mucro com margem interna serrilhada, com ao menos 8 dentes.

Notas taxonômicas. No Brasil, há registro de duas espécies de *Sminthurinus*, *S. molinai* Arlé, 1940, do Rio de Janeiro, e *S. aureussetosus* Bretfeld, 2002, do Amazonas (BELLINGER, 1996–2024). *Sminthurinus* sp. nov. difere de ambas as espécies especialmente por: complexo

empodial II com unguículos bem desenvolvido (ausente ou reduzido em *S. molinai*), apêndice subanal da fêmea típico do gênero, amplo e serrilhado no ápice (acuminado, curvo e sem serrilhados em *S. molinai*), região de assimetria de cerdas clipeal com seis cerdas (cinco em *S. aureussetosus*), apenas margem interna do mucro serrilhada (ambas em *S. aureussetosus*), Ant. I com sete cerdas (cinco em *S. aureussetosus*), e dentes da fúrcula com 12 cerdas dorsais (11 em *S. aureussetosus*) (ARLÉ, 1940; BRETTFELD, 2002).

Conclusão

Embora os colêmbolos sejam os microartrópodes mais diversos e abundantes do planeta, desempenhando papéis fundamentais para a ciclagem de nutrientes e para a manutenção dos ecossistemas, existe uma ampla lacuna no conhecimento sobre esses animais no Brasil e em toda região Neotropical. Nesse contexto, este trabalho fornece descrição detalhada de uma nova espécie para o gênero *Sminthurinus* Börner, 1901, contribuindo para a redução do déficit de informação sobre a diversidade desse gênero, da família Katiannidae Börner, 1913, e da ordem Symphypleona como um todo. Portanto, este trabalho busca estabelecer uma base sólida que possa ser usada em futuras pesquisas científicas, além de ampliar o conhecimento da fauna de Collembola. A descrição de novas espécies é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas ecológicas e para a elaboração de projetos de conservação. Sendo assim, esse trabalho se alinha diretamente ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 15 (ODS 15), que tem como foco a conservação dos ecossistemas terrestres.

Referências

- ABRANTES, E. A. et al. Synthesis of Brazilian Collembola: an update to the species list. Zootaxa, Auckland, v. 2388, n. 1, p. 1-22, 2010. DOI: 10.11646/zootaxa.2388.1.1.
- ARLÉ, R. Uma nova espécie de *Sminthurinus* (Collembola) do Rio de Janeiro. Revista Chilena de Historia Natural, v. 44, p. 264-266, 1940.
- BELLINGER, P.F., CHRISTIANSEN, K.A. & JANSSENS, F. (1996–2014) Checklist of the Collembola of the World. Available from: <http://www.collembola.org>
- BELLINI, B. C.; WEINER, W. M.; WINCK, B. R. Systematics, Ecology and Taxonomy of Collembola: Introduction to the Special Issue. Diversity, v. 15, n. 2, p. 221, 2023.
- BÖRNER, C. Zur Kenntnis der Apterygoten-Fauna von Bremen und der Nachbardistrikte, Beitrag zu einer Apterygoten-Fauna Mitteleuropas. Abhandlungen Herausgegeben vom Naturwissenschaftlichen Verein zu Bremen, v. 17, p. 1-140, 1901.
- BRETTFELD, G. Synopses on Palearctic Collembola, Volume 2: Symphypleona. Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz, v. 71, n. 1, p. 1-318, 1999.
- BRETTFELD, 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, dez. 2002.
- DEHARVENG, Louis. Recent advances in Collembola systematics. Pedobiologia, v. 48, n. 5-6, p. 415-433, 2004.

HOPKIN, S. P. (1997). Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press.

PALACIOS-VARGAS, J. G.; HORNUNG-LEONI, C. T.; GARRIDO, I. Collembola in epiphytic bromeliads (*Tillandsia imperialis*: Bromeliaceae) from Hidalgo, Mexico and description of a new *Sminthurinus* (Collembola: Katiannidae). Zootaxa, Auckland, v. 3168, n. 1, p. 55-62, 2012.

PALACIOS-VARGAS, J. G.; VACAFLORES-ARGANDOÑA, M. A new genus and species of Katiannidae (Collembola: Symphypleona) from Bolivia. Zootaxa, v. 4819, n. 2, p. 201-215, jul. 2020.

POTAPOV, Anton et al. Towards a global synthesis of Collembola knowledge: challenges and potential solutions. Soil Organisms, v. 92, n. 3, p. 161-188, 2020. DOI: 10.25674/so92-3-1.

United Nations. (2015). Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development. (A/RES/70/1). General Assembly.

Anexos

Figura 1 Antena de *Sminthurinus* sp. nov. A. Ant. I, II e III. B. Ant. IV.

Figura 2. Cabeça de *Sminthurinus* sp. nov. A. Cabeça dorsal. B. Cabeça ventral (apenas região distal).

Figura 3. Perna I de *Sminthurinus* sp. nov.

Figura 4. Perna II de *Sminthurinus* sp. nov.

Figura 5. Perna III de *Sminthurinus* sp. nov.

Figura 6. Grande abdome de *Sminthurinus* sp. nov.

Figura 7. Pequeno abdome de *Sminthurinus* sp. nov.

Figura 8. Fúrcula de *Sminthurinus* sp. nov. A. Manúbrio. B. Dens. C. Mucro

CÓDIGO: SB0694

AUTOR: GABRIEL VITORIO DE ARAUJO SUASSUNA

ORIENTADOR: JUDNEY CLEY CAVALCANTE

TÍTULO: Variações da irrigação do braço em população do Rio Grande do Norte e seu papel clínico-cirúrgico

Resumo

O suprimento arterial para o ombro, braço e cotovelo humano se dá por ramos colaterais das artérias axilar (AA) e braquial (AB). Embora amplamente descrita, a anatomia desses vasos é bastante variável, com prevalência de padrões atípicos entre 12 e 77%, reforçando a importância do conhecimento de diferentes padrões arteriais por docentes e profissionais da saúde. O estudo objetivou identificar, descrever e avaliar a prevalência das variações encontradas na 3ª porção da AA e na AB em população do nordeste brasileiro. Foram utilizados 50 membros superiores – isolados, fixados em formalina e pré-dissecados - do Laboratório de Anatomia Humana da UFRN, os quais tiveram suas dissecações melhoradas. A anatomia das AA, AB e seus ramos foram descritas e catalogadas. O conhecimento das variações na irrigação do membro superior é de extrema importância para profissionais da saúde, permitindo um planejamento cirúrgico seguro e análise correta de exames de imagem. Portanto esse trabalho apresenta contribuições significativas na área, uma vez que apresenta dados acerca das variações mais comuns, com enfoque regional

Palavras-chave: Anatomia, artérias, variações anatômicas, membro superior

TITLE: Variations of the human arm arterial supply in the population of Rio Grande do Norte and its clinical-surgical role

Abstract

Arterial supply to the human shoulder, arm, and elbow is provided by collateral branches of the axillary (AA) and brachial (AB) arteries. Although widely described, the anatomy of these vessels is highly variable, with the prevalence of atypical patterns ranging from 12 to 77%, reinforcing the importance of knowledge of different arterial patterns for educators and healthcare professionals. This study aimed to identify, describe, and evaluate the prevalence of variations found in the 3rd part of the AA and the AB in a population from the Brazilian Northeast. Fifty upper limbs—isolated, fixed in formalin, and pre-dissected—from the Human Anatomy Laboratory of UFRN were used, and their dissections were refined. The anatomy of the AA, AB, and their branches was described and cataloged. Knowledge of the variations in the irrigation (blood supply) of the upper limb is extremely important for healthcare professionals, allowing for safe surgical planning and correct analysis of imaging

exams. Therefore, this work presents significant contributions to the field, as it provides data on the most common variations, with an emphasis in the regional aspect.

Keywords: anatomy, arteries, anatomical variations, upper limb

Introdução

O suprimento arterial para o ombro, braço e cotovelo humano se dá por ramos colaterais das artérias axilar (AA) e braquial (AB). Embora amplamente descrita, a anatomia desses vasos é bastante variável, com prevalência de padrões atípicos entre 12 e 77%, reforçando a importância do conhecimento de diferentes padrões arteriais por docentes e profissionais da saúde.

Metodologia

50 membros superiores – isolados, fixados em formalina e pré-dissecados - do Laboratório de Anatomia Humana da UFRN tiveram suas dissecações melhoradas. A anatomia das AA, AB e seus ramos foram descritas e catalogadas.

Resultados e Discussões

Do total de membros analisados, 31 (62%) apresentaram anatomia como tipicamente descrita nos livros de anatomia humana e 19 (38%) apresentaram algum tipo de alteração no padrão arterial, perfazendo um total de 34 variações anatômicas. As variações encontradas foram classificadas em (1) ausência do vaso, (2) formação de tronco comum (TC), quando dois ou mais ramos que deveriam sair independentemente se unem e saem do mesmo vaso, ou (3) variação de posição de nascimento do ramo. As variações de posição foram divididas em 2 subtipos: (a) surgimento ectópico do ramo, que é a variação de nível da saída do ramo; e (b) ramo do ramo, que é quando uma artéria que deveria nascer de AA ou de AB, surge de um de seus ramos. Dentre as 34 variações analisadas, 2 casos (5,9%) foram de ausência do vaso (a. circunflexa anterior do úmero e a. braquial profunda); 18 casos (52,9%) de formação de TC e 14 (41,2%) variações de posição. Dos casos de formação de TC, 11 (61,1%) foram formados pela saída conjunta das aa. circunflexas do úmero, sendo a variante mais comum na categoria. Quanto as variações de posição, 7 casos (50%) foram surgimentos ectópicos de ramos, por exemplo, a bifurcação superior da AB e presença de uma AB superficial, e 7 casos (50%) foram ramo do ramo, por exemplo, o nascimento da a. circunflexa posterior do úmero a partir da a. subescapular.

Conclusão

O conhecimento das variações na irrigação do membro superior é de extrema importância para profissionais da saúde, permitindo um planejamento cirúrgico seguro e análise correta de exames de imagem. Portanto esse trabalho apresenta contribuições significativas na área, uma vez que apresenta dados acerca das variações mais comuns, com enfoque regional.

Referências

CHAKRAVARTHI, K. K. et al. Anatomical variations of brachial artery - Its morphology, embryogenesis and clinical implications. Journal of Clinical and Diagnostic Research, v. 8, n. 12, 2014.

GLIN, M. et al. Morphological variations of the brachial artery and their clinical significance: a systematic review. Surgical and Radiologic Anatomy, v. 45, n. 9, 2023.

HUELKE, D. F. Variation in the origins of the branches of the axillary artery. The Anatomical Record, v. 135, n. 1, 1959.

KONARIK, M. et al. Upper limb principal arteries variations: A cadaveric study with terminological implication. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, v. 20, n. 4, 2020.

RODRÍGUEZ-NIEDENFÜHR, M. et al. Variations of the arterial pattern in the upper limb revisited: A morphological and statistical study, with a review of the literature. Journal of Anatomy, v. 199, n. 5, 2001.

SAEED, M. et al. Variations in the subclavian-axillary arterial system. Saudi Medical Journal, v. 23, n. 2, 2002.

SOPHIA, L. et al. Upper limb arterial pattern: Clinical correlation and embryological perspective. Jornal Vascular Brasileiro, v. 20, 2021.

CÓDIGO: SB0730

AUTOR: ANNA LYVIA AZEVEDO CAVALCANTE

ORIENTADOR: JANINE INEZ ROSSATO

TÍTULO: Como a nociceptina afeta a memória de reconhecimento?

Resumo

A nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) é um peptídeo envolvido na modulação de funções cognitivas, incluindo a memória. A N/OFQ atua no receptor NOP, acoplado à proteína G, promovendo efeitos inibitórios que reduzem a neurotransmissão e inibem o disparo neuronal. O sistema N/OFQ–NOP possui ampla distribuição cerebral, mas seu papel na memória de reconhecimento ainda não está completamente esclarecido. Este estudo avaliou o efeito da N/OFQ na memória de reconhecimento de ratos Wistar adultos utilizando a Tarefa de Reconhecimento de Objeto Novo (TRON). Esses animais receberam infusão intra-hipocampal de veículo ou N/OFQ (0.1; 0.3; 1.0 nmol/lado) antes do treino, imediatamente após o treino ou antes do teste de memória, permitindo avaliar aquisição, consolidação e evocação. Os resultados mostraram que a infusão pré-treino de N/OFQ prejudicou a aquisição da memória de forma dose-dependente, com maior déficit na dose de 1 nmol/lado, evidenciado pela redução do índice de discriminação. Em contraste, a administração pós-treino ou pré-teste não alterou a consolidação e a evocação da memória avaliada. Concluímos que a N/OFQ interfere especificamente na codificação inicial da memória de reconhecimento, sugerindo seu potencial papel em processos cognitivos e em distúrbios da memória.

Palavras-chave: Nociceptina. Receptor NOP. Memória de reconhecimento de objetos.

TITLE: How does nociceptin affect the recognition memory?

Abstract

The nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is a peptide involved in the modulation of cognitive functions, including the memory. The N/OFQ acts in the NOP receptor, coupled by G protein, promoting inhibitory effects which reduce the neurotransmission and inhibit the neuronal firing. The N/OFQ–NOP system has a widespread cerebral distribution, but its role in recognition memory remains unclear. This study evaluated the effect of N/OFQ on recognition memory in adult Wistar rats using the Novel Object Recognition Task (NORT). These animals received intrahippocampal infusion of vehicle or N/OFQ (0.1, 0.3, or 1.0 nmol/side) before training, immediately after training, or before memory testing, allowing for assessment of acquisition, consolidation and, recall. The results showed that pre-training infusion of N/OFQ impaired memory acquisition in a dose-dependent manner, with a greater deficit at the 1 nmol/side dose, evidenced by a reduction in the discrimination index. In contrast, post-training or pre-test administration did not significantly alter consolidation or

recall. We conclude that N/OFQ specifically interferes with the initial encoding of recognition memory, suggesting its potential role in cognitive processes and memory disorders.

Keywords: Nociceptin. NOP receptor. Object recognition memory.

Introdução

A nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) é um peptídeo de 17 aminoácidos que foi isolado em 1995 em cérebros de ratos e porcos. Meunier e colaboradores (1995), denominaram o composto como nociceptina, devido ao efeito hiperalgésico evocado. Já, Reinscheid e colaboradores (1995) denominaram o composto de orfanina FQ, devido ao fato de que o peptídeo se liga a um receptor anteriormente órfão. A nociceptina se liga ao receptor NOP, que é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) do tipo Gi/o e, sendo assim, a sua ativação ocasiona a redução da formação de AMPc, bloqueia canais de Ca²⁺ e estimula a condutância do K⁺, induz efeitos inibitórios, causando redução da neurotransmissão e/ou inibição do disparo neuronal (VAUGHAN e CHRISTIE, 1996; SCHLICKER e MORARI, 2000; HEINRICHER, 2003).

O sistema N/OFQ - NOP apresenta uma distribuição tão ampla no cérebro que seus efeitos sobre a memória são provavelmente mediados por uma multiplicidade de mecanismos envolvendo muitas regiões como o hipocampo, a amígdala, o córtex pré-frontal e núcleos aminérgicos (GAVIOLI e CALO, 2013; MOLLEREAU e MOULEDOUS, 2000; WITKIN et al., 2014). Os primeiros estudos de memória envolvendo esse sistema foram realizados em ratos, focando na memória espacial, e mostraram que a administração hipocampal de 10 nmol/lado do peptídeo N/OFQ bloqueia a aquisição dessa memória (MAMIYA et al., 1998; SANDIN et al., 1997). No entanto, estudos posteriores mostraram que essa dose prejudica o comportamento motor, o que pode ser considerado um confundidor em relação à interpretação correta dos dados (DEVINE et al., 1996; NOBLE e ROQUES, 1997; REINSCHIED et al., 1995). Outros tipos de memória, como a memória de medo condicionado ao contexto, são afetadas pela administração intracerebral ou intracerebroventricular do peptídeo N/OFQ (FORNARI et al., 2008; GOELDNER et al., 2009). Mesmo com a multiplicidade de trabalhos, na maioria dos estudos executados, os tratamentos com agonistas NOP são realizados antes do aprendizado, dificultando o entendimento sobre qual das fases do processamento mnemônico está sendo afetada. Mais ainda, paradigmas comportamentais, como o labirinto aquático de Morris, envolvem múltiplos dias de treino, criando mais confundidores (SANDIN et al., 2004; FORNARI et al., 2008; KUZMIN et al., 2009; MAMIYA et al., 2003; REDROBE et al., 2000; ROOZENDAAL et al., 2007).

A memória de reconhecimento permite a discriminação entre itens familiares e novos, e, um teste comportamental para seu estudo em roedores é a tarefa de reconhecimento do objeto novo (TRON). A TRON baseia-se na tendência natural dos roedores em explorar por mais tempo objetos inéditos quando apresentados simultaneamente a objetos familiares (ANTUNES e BIALA, 2012). Experimentos na TRON demonstram que a integridade funcional do lobo temporal é essencial para codificar, armazenar e expressar as memórias de reconhecimento (KESNER e HOPKIN, 1994; REGER et al., 2009; CRUZ-SANCHEZ et al., 2021). Em particular, estudos farmacológicos e neuroanatômicos têm demonstrado que o hipocampo é necessário para a aquisição e armazenamento deste tipo de memória

(BALDERAS et al., 2008; SMITH e BULKIN, 2014; FUHS e TOURETZKY, 2007).

Contudo, o papel do sistema nociceptina - receptor NOP hipocampal no processamento da memória de reconhecimento não é compreendido.

Investigaremos o papel do sistema nociceptina - receptor NOP hipocampal no processamento da memória de reconhecimento. Para isso, faremos infusões bilaterais de diferentes doses de nociceptina na região CA1 do hipocampo dorsal em ratos Wistar machos em diferentes momentos da TRON. Dessa maneira, poderemos entender como o sistema nociceptina - receptor NOP pode estar envolvido em cada etapa mnemônica da memória de reconhecimento: aquisição, consolidação, evocação, atualização e esquecimento.

Metodologia

Animais experimentais e cálculo amostral

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar. Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas da Memória do Instituto do Cérebro (ICe), na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), localizado em Natal, Rio Grande do Norte. Para esses animais foram fornecidos ração e água ad libitum, além de permanecerem em um ciclo de 12h claro/escuro com a temperatura controlada (21°C). Os animais foram mantidos em suas caixas moradia, sendo 5 animais em cada caixa. O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes da Lei AROUCA (Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), que estabelece procedimentos para uso científico de animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN (Certificado 354.038-2023). O aluno de iniciação científica envolvido no trabalho realizou o curso de manejo de animais (Figura 1).

Para o cálculo do tamanho da amostra foram considerados estudos prévios de nosso laboratório e outros laboratórios que utilizaram metodologia semelhante. (SHAHVEISI et al., 2020; ROSSATO et al., 2023; FURINI et al., 2020).

Procedimentos cirúrgicos

Para os procedimentos cirúrgicos de implantação de cânulas, os animais foram anestesiados por administração ip. de cloridrato de ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Posteriormente, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal (AP - 4,2; ML $\pm$ 3,0; DV - 2,0), coordenadas estereotáxicas em mm (PAXINOS e WATSON, 2006). A associação de ketamina com a xilazina possui efeito anestésico de leve a moderado. As cirurgias para implantação de cânulas no hipocampo duram em média 25-30 min, o que possibilita o uso dessa combinação anestésica. Os animais foram mantidos nas suas gaiolas moradia originais após o procedimento cirúrgico. Todos os animais receberam meloxicam (2 mg/kg, s.c.), como analgésico, imediatamente antes da cirurgia e nos três dias subsequentes. Os experimentos devem começar de 7 a 10 dias após a cirurgia.

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. Foi utilizada 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. Nesta sessão os animais foram colocados individualmente no campo aberto para que o explorem livremente. Na sessão de treino, os animais foram colocados no campo aberto na presença de dois objetos iguais. A sessão de teste consiste na re-exposição dos animais ao campo aberto com a presença de um objeto familiar (apresentado na sessão de treino) junto a um objeto novo. Durante a sessão de treino e/ou teste os animais puderam explorar livremente o campo aberto com objetos por cinco minutos. (ROSSATO et al., 2022).

Infusão de drogas

Nos experimentos farmacológicos/comportamentais, os animais receberam microinjeções bilaterais através de cânulas posicionadas na região CA1 do hipocampo dorsal ou do córtex pré-frontal mediante cirurgia estereotáxica. Os fármacos foram administrados no volume de 1 µL/lado. Foram utilizados os seguintes fármacos:

- Peptídeo nociceptina/orfanina (N/OFQ; 0.1; 0.3; e 1 nmol/lado) ou veículo (solução NaCl 0.9%).

Análise estatística dos dados

A análise estatística dos resultados foi realizada concomitante à execução dos experimentos, usando os programas 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, e para comparações entre três ou mais grupos, foi empregada ANOVA de uma ou duas vias seguidas de teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussões

A nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) é um neuropeptídeo envolvido na modulação de diferentes funções do sistema nervoso central, incluindo a memória. Entretanto, seu papel específico na memória de reconhecimento ainda não é totalmente compreendido.

As memórias de reconhecimento podem ser classificadas em função do tempo como de curto ou longo prazo. As de curto prazo retém informações por um período limitado, enquanto as de longo prazo permitem o armazenamento mais estável. Para que uma memória de longa duração seja estabelecida e posteriormente lembrada, são necessárias etapas como a aquisição (ou codificação), a consolidação e a evocação. Na aquisição, as informações são

codificadas em correlatos neurais; na consolidação, as memórias de curto prazo estabelecem-se em memórias de longo prazo. Por fim, na evocação, as memórias previamente formadas são recuperadas.

Avaliamos primeiramente o efeito da N/OFQ na fase de aquisição da memória. Para isso, ratos Wistar machos adultos implantados com cânulas na região CA1 do hipocampo foram habituados ao aparato experimental. Vinte e quatro horas após a última sessão de habituação, receberam infusão bilateral de VEH ou N/OFQ (0.1; 0.3 ou 1.0 nmol/lado). Vinte minutos após a infusão, os animais foram submetidos à sessão de treino na TRON, explorando dois objetos idênticos (A e A'). A retenção da memória foi testada 24h após o treino, no teste, quando foi apresentado um objeto familiar (A) e um novo (B).

Observamos que houve redução no índice de discriminação (ID) do grupo que recebeu a infusão de N/OFQ antes do treino em relação ao do grupo controle. O gráfico evidenciou um padrão decrescente com o aumento da dose: o grupo controle apresentou maior ID, seguido pelos grupos N/OFQ 0.1, 0.3 e 1 nmol/lado. Isso indica que os animais que receberam VEH e os que receberam N/OFQ 0.1 nmol/lado foram capazes de discriminar o objeto novo. Porém, os animais que receberam a infusão de N/OFQ nas maiores doses (0.3 e 1 nmol/lado) não discriminaram o objeto novo do objeto familiar (Figura 2).

A análise estatística confirmou esse achado (TT - 24h: $F(3,39) = 8.063$, $p=0.0003$; $p<0.05$ para VEH vs 0.3, $p<0.001$ para VEH vs 1.0 e $p<0.01$ para 0.1 vs 1.0, em um teste de Bonferroni após ANOVA de uma via). Os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM do índice de discriminação durante o TESTE, sendo $n = 10-11$ animais por grupo ($\# p<0.05$ em um teste t de Student com média teórica = 0. $***p<0.001$, $**p<0.01$ e $*p<0.05$ em uma ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Para verificar se o possível prejuízo mnemônico estava restrito à fase de aquisição, ratos Wistar machos adultos, com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal, foram submetidos ao treino na TRON, conforme descrito anteriormente. Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão bilateral de VEH ou de N/OFQ (0.1; 0.3 ou 1.0 nmol/lado). A retenção da memória foi avaliada 24 horas depois, quando os animais foram reexpostos ao objeto familiar (A) juntamente com um objeto novo (B). Os resultados mostraram que a administração de N/OFQ após o treino não promoveu alterações significativas no desempenho, uma vez que os animais foram capazes de discriminar o objeto novo do familiar (Figura 3). Esses achados sugerem que a fase de consolidação da memória não foi afetada pela N/OFQ. Os dados (média $\pm$ SEM) estão apresentados como índice de discriminação durante o TESTE; $n = 8-10$ animais por grupo. $\# p<0.05$ em um teste t de Student com média teórica = 0.

Por fim, avaliamos se a infusão intra-hipocampal de N/OFQ interfere na evocação da memória. Para isso, ratos Wistar machos adultos, com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo, foram treinados na TRON e, após 24 horas, receberam infusão bilateral de VEH ou N/OFQ (0.1; 0.3 ou 1.0 nmol/lado), conforme descrito anteriormente. Vinte minutos após a administração, os animais foram submetidos ao teste de memória, sendo expostos ao objeto familiar (A) em conjunto com um objeto novo (B). Os resultados mostraram que, independentemente do tratamento, os animais foram capazes de discriminar o objeto novo do familiar (Figura 4), indicando que a fase de evocação da memória não foi comprometida pela N/OFQ. Os dados (média $\pm$ SEM) estão apresentados como índice de discriminação durante o TESTE; $n = 8-11$ animais por grupo. $\# p<0.05$ em um teste t de Student com média teórica = 0.

Estes resultados mostram que a infusão intra-hipocampal de N/OFQ antes do treino prejudicou a aquisição da memória de reconhecimento de forma dose-dependente, enquanto as administrações pós-treino ou pré-teste não alteraram consolidação nem evocação. Esses dados estão em consonância com estudos anteriores que relatam déficits de memória após a ativação de receptores NOP por via intraperitoneal ou intracerebroventricular (SANDIN et al., 1997; HIGGINS et al., 2002; FORNARI et al., 2008; GOELDNER et al., 2009). Também é verdade que a ativação dos receptores NOP, por meio da regulação da abertura dos canais iônicos da membrana celular, ocasiona um efeito inibitório na atividade eletrofisiológica dos neurônios, o que interfere no processo mnemônico.

Conclusão

Assim, o presente estudo mostra que a infusão intra-hipocampal de N/OFQ prejudica de forma dose-dependente a fase de aquisição da memória, sendo o déficit mais evidente na maior dosagem (1 nmol/lado). Em contrapartida, a administração de N/OFQ não promoveu alterações significativas nas fases de consolidação e evocação, indicando que o efeito desse neuropeptídeo é restrito ao momento inicial de codificação da informação.

Esses achados contribuem para o melhor entendimento do papel da N/OFQ na memória de reconhecimento e reforçam a necessidade de investigações futuras para explorar seu potencial envolvimento em distúrbios cognitivos e da memória.

Referências

ANTUNES, M.; BIALA, Grazyna. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, v. 13, p. 93-110, 2012.

BOOM, Alain et al. Distribution of the nociceptin and nocistatin precursor transcript in the mouse central nervous system. *Neuroscience*, v. 91, n. 3, p. 991-1007, 1999.

CONNOR, Mark; YOE, Alison; HENDERSON, Graeme. 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.

DEVINE, Darragh P. et al. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochemical research*, v. 21, p. 1387-1396, 1996.

FORNARI, Raquel V. et al. Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of contextual and tone fear conditioning in rats. *Behavioral neuroscience*, v. 122, n. 1, p. 98, 2008.

FURINI, Cristiane R G et al. Molecular Mechanisms in Hippocampus Involved on Object Recognition Memory Consolidation and Reconsolidation. *Neuroscience*, v. 435, p. 112-123, 2020.

GAVIOLI, Elaine Cristina et al. Nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists as innovative antidepressant drugs. *Pharmacology & therapeutics*, v. 140, n. 1, p. 10-25, 2013.

GOELDNER, Celia et al. Activation of nociceptin opioid peptide (NOP) receptor impairs contextual fear learning in mice through glutamatergic mechanisms. *Neurobiology of learning and memory*, v. 91, n. 4, p. 393-401, 2009.

HEINRICHER, Mary M. Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior. *Life sciences*, v. 73, n. 6, p. 813-822, 2003.

HIGGINS, Guy A. et al. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *European Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 5, p. 911-922, 2002.

HIRAMATSU, Masayuki; INOUE, Kaori. Effects of nocistatin on nociceptin-induced impairment of learning and memory in mice. *European journal of pharmacology*, v. 367, n. 2-3, p. 151-155, 1999.

KUZMIN, Alexander et al. The nociceptin system and hippocampal cognition in mice A pharmacological and genetic analysis. *Brain research*, v. 1305, p. S7-S19, 2009.

MAMIYA, T. et al. Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular psychiatry*, v. 8, n. 8, p. 752-765, 2003.

MAMIYA, Takayoshi et al. Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain research*, v. 783, n. 2, p. 236-240, 1998.

Meunier, J.-C., et al. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, 377:532-535.

MOLLEREAU, Catherine; MOULEDOUS, Lionel. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides*, v. 21, n. 7, p. 907-917, 2000.

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, n. 6, p. 501-512, 2005.

NEAL JR, Charles R. et al. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 406, n. 4, p. 503-547, 1999.

NOBLE, Florence; ROQUES, Bernard P. Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *FEBS letters*, v. 401, n. 2-3, p. 227-229, 1997.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 5 ed. Elsevier, 2006.

REDROBE, J. P. et al. [Nphe1]-Nociceptin (1-13)-NH₂, a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *British journal of pharmacology*, v. 131, n. 7, p. 1379-1384, 2000.

REED, Jonathan M.; SQUIRE, Larry R. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behavioral neuroscience*, v. 111, n. 4, p. 667, 1997.

REINSCHEID, Rainer K. et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, v. 270, n. 5237, p. 792-794, 1995.

ROOZENDAAL, Benno et al. Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation. *Learning & memory*, v. 14, n. 1-2, p. 29-35, 2007.

ROSSATO, Janine Inez et al. NMDARs control object recognition memory destabilization and reconsolidation. *Brain Res Bull.* v. 197, p. 42-48, 2023.

SANDIN, Johan; ÖGREN, Sven O.; TERENIUS, Lars. Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat. *Brain research*, v. 997, n. 2, p. 222-233, 2004.

SANDIN J, et al. Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci.* v. 9, p. 194-7, 1997.

SCHLICKER, E.; MORARI, M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides*, v. 21, n. 7, p. 1023-1029, 2000.

SHAHVEISI, Kaveh et al. Novel object recognition memory in REM sleep-deprived rats: Role of the cannabinoid CB1 receptor. *Behav Brain Res.* v. 381, p. 112311, 2020.

VAUGHAN, C. W.; CHRISTIE, M. J. Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones. *British Journal of Pharmacology*, v. 117, n. 8, p. 1609-1611, 1996.

WITKIN, Jeffrey M. et al. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence. *Pharmacology & therapeutics*, v. 141, n. 3, p. 283-299, 2014.

WU, Ya Lan et al. Molecular characterization and functional expression of opioid receptor-like1 receptor. *Cell research*, v. 7, n. 1, p. 69-77, 1997.

Anexos

Figura 1: Certificado de curso de manejo de animais.

Figura 2: Infusão de nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) antes do treino prejudica a aquisição da memória de reconhecimento de objetos.

Figura 3: Infusão de nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) após o treino não afeta a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Figura 4: Infusão de nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) antes do teste não afeta a evocação da memória de reconhecimento de objetos.

CÓDIGO: SB0740

AUTOR: KAYLANE DOS ANJOS NUNES

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Avaliação morfométrica dos caracteres sexuais dos camarões sete-barbas do Atlântico Sul.

Resumo

Os camarões peneídeos do gênero *Xiphopenaeus* apresentam grande importância econômica. Mas, existe uma imprecisão taxonômica na identificação de suas espécies devido à alta similaridade morfológica. A Morfometria Geométrica (MG) surge como uma ferramenta para discriminar espécies a partir de suas contribuições na identificação de variações morfológicas. Este estudo analisou variações morfológicas nos caracteres sexuais secundários de *Xiphopenaeus kroyeri*, *X. dincao* e *X. baueri*, a partir de espécimes coletados no litoral brasileiro. Foram utilizados 30 indivíduos, por espécie do gênero, para a captura de imagem do télco e do petasma, utilizando câmera digital. Posteriormente, foram utilizados os programas TpsUtil e TpsDig 2, para adição dos landmarks em cada foto e o MorphoJ com uma etapa prévia de: sobreposição de procrustes, definição de classificadores, análises de erro e busca de outliers, e em seguida para uma análise de variáveis canônicas (CVA) e análise discriminante (DFA). Os resultados da CVA e da DFA demonstraram diferenças significativas entre os grupos avaliados, especialmente para a espécie *X. kroyeri*, e uma sobreposição morfológica entre *X. dincao* e *X. baueri*. A alta relação entre essas duas espécies é justificada como espécies que divergiram recentemente, a partir do isolamento geográfico entre as regiões do mar de Quaternário e do Caribe. Este estudo reforça a relevância da MG na identificação de espécies crípticas e no manejo adequado desse recurso pesqueiro.

Palavras-chave: Taxonomia, Decapoda, Morfometria geométrica.

TITLE: Morphometric evaluation of sexual characteristics of seven-beard shrimp *Xiphopenaeus* spp. (Crustacea: Penaeidae) from the South Atlantic.

Abstract

Peneid shrimp of the genus *Xiphopenaeus* are economically important. However, taxonomic imprecision exists in species identification due to their high morphological similarity. Geometric Morphometry (GM) has emerged as an important tool for species discrimination based on its contributions to identifying morphological variations. This study analyzed morphological variations in the secondary sexual traits of *Xiphopenaeus kroyeri*, *X. dincao*, and *X. baueri*, from specimens collected along the Brazilian coast. Thirty individuals per species were used to capture images of the thelycum and petasma using a digital camera. Subsequently, the programs TpsUtil and TpsDig 2 were used to add landmarks to each image. MorphoJ, with a preliminary step of Procrustes superimposition, classifier definition, error analysis, and outlier search, was followed by canonical variate analysis (CVA) and discriminant analysis (DFA). The CVA and DFA results demonstrated significant differences

between the groups evaluated, especially for *X. kroyeri*, and a morphological overlap between *X. dincao* and *X. baueri*. The high relationship between these two species is explained by the fact that they diverged recently, resulting from the geographic isolation between the Quaternary and Caribbean Sea regions. This study reinforces the relevance of MG in the identification of cryptic species and the appropriate management of this fishery resource.

Keywords: Taxonomy, Decapoda, Geometric morphometrics.

Introdução

Os camarões peneídeos têm grande importância econômica, sendo intensamente explorados em regiões tropicais e subtropicais, constituindo um dos recursos pesqueiros mais rentáveis do mundo (Hossain & Ohtomi, 2008; Dias-Neto & Dias, 2015). O gênero *Xiphopenaeus* Smith, 1869 se destaca como um dos mais explorados na costa americana e no litoral brasileiro (Boos et al., 2016). Dentre elas, a espécie *X. kroyeri* s.s. (Heller, 1862) se destaca representando cerca de 40% dos camarões pescados no Brasil (Carvalho-Batista et al., 2019, 2020). Entretanto, estudos recentes apontam novas espécies crípticas dentro do gênero, anteriormente incluídas sob a mesma denominação (Carvalho-Batista et al., 2019). A identificação taxonômica desses camarões é caracterizada, principalmente, pela forma dos caracteres sexuais secundários, devido à elevada similaridade anatômica e conservação morfológica (Moraes et al., 2025). Apesar de visíveis, essas estruturas podem variar ao longo do desenvolvimento ontogenético (Pérez-Farfante, 1970). Essa imprecisão se intensifica em espécies morfológicamente semelhantes que ocorrem em simpatria. É o caso das recém-descritas espécies de camarões sete-barbas do gênero *Xiphopenaeus*, *X. baueri* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto & Costa, 2019, *X. dincao* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto & Costa, 2019, além de *X. kroyeri*, que apresentam grandes áreas de sobreposição, ao longo do Atlântico Sul. A validação taxonômica do gênero foi discutida em diferentes estudos, até chegar as espécies conhecidas atualmente. Podemos destacar: Pérez-Farfante & Kensley, 1997; Gusmão et al., 2006; Piergiorgio et al., 2014; Kerkhove et al., 2019, até chegar em Carvalho-Batista et al. (2019, 2020) e Miazaki et al. (2024). Os principais caracteres utilizados incluem a forma do rosto, a conformação alongada dos últimos pares de pereópodos e os caracteres sexuais secundários (téllico e petasma). Considerando a relevância comercial dos camarões sete-barbas e a descrição recente de novas espécies no Brasil (Tavares & Gusmão, 2016; Carvalho-Batista et al., 2019), surge a necessidade de técnicas analíticas mais precisas para evitar confusões taxonômicas. A alta representatividade de *X. kroyeri* nos desembarques pesqueiros (cerca de 40%) reflete a inclusão prévia das espécies recém-descritas sob uma única denominação de sete-barbas (Carvalho-Batista et al., 2019). Nesse contexto, a Morfometria Geométrica (MG) surge como ferramenta importante, permitindo análises estatísticas sem perda da geometria estrutural (Adams et al., 2004). Em crustáceos, a rigidez do exoesqueleto favorece a definição de marcos anatômicos (Moraes et al., 2021). Estudos já demonstraram sua eficácia na distinção de espécies semelhantes, como em *Litopenaeus* (Moraes et al., 2021) e *Xiphopenaeus* (Miazaki et al., 2024), por meio da análise da forma do cefalotórax e do téllico. Dessa forma, a aplicação da MG tem ganhado relevância na diferenciação de espécies crípticas do gênero *Xiphopenaeus*, especialmente diante da ausência de caracteres morfológicos diagnósticos claros. Assim, este estudo busca avaliar a variação morfológica nos caracteres sexuais secundários (téllico e petasma) entre as espécies de camarões sete-

barbas do Atlântico Sul, ampliando o conhecimento morfológico existente e subsidiando práticas de manejo mais adequadas para este recurso pesqueiro de grande importância.

Metodologia

Amostragem e coleta de dados

Espécimes do gênero *Xiphopenaeus* (*X. kroyeri*, *X. dincao* e *X. baueri*) foram coletados por meio de compra em portos pesqueiros, nos Estados do Rio Grande do Norte e Pará, nos quais foram coletados a partir da pesca de arrasto em ambas localidades. Os indivíduos foram armazenados em caixas de gelo e enviados para o Laboratório de Ecologia e Evolução de Crustáceos (LABEEC), do Departamento de Botânica e Zoologia do Centro de Biociências (DBZ/CB), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). A identificação do material biológico foi realizada a partir das descrições morfológicas de Carvalho-Batista et al., 2019; Carvalho-Batista et al., 2020, e sexados com base na presença de petasma (masculino) ou télico (fêmea). O comprimento da carapaça (CL) foi medido com um paquímetro digital (precisão de 0,01 mm) para padronizar os indivíduos a partir do tamanho de 25,30 mm para machos e 26,20 mm para as fêmeas de CL, com base em Moraes et al. (2018). Todas as amostras foram preservadas em etanol a 70%.

Morfometria Geométrica

Ao todo, 30 fotos dos caracteres sexuais secundários de cada espécie foram realizadas por um único pesquisador. Foi necessário retirar o petasma do animal para melhor captura das imagens, como também padronizar apenas um lado da estrutura para garantir uma menor margem de erro, no qual foi realizado por uma câmera Kaisi HD4K. Para a obtenção das imagens do télico foi utilizado uma lupa com uma câmera Mega-Idea cx4 cmos (48 megapixels). Ambas as câmeras foram fixadas e niveladas em uma base com monitor acoplado, usando posição e distância padronizadas do objeto. O software tpsDig 2.26 (Rohlf, 2006) foi utilizado para digitalizar 1 marco anatômico verdadeiro (Landmark) no télico, e em seguida, 48 semi-marcos anatômicos (Semilandmarks) foram digitalizados na região perimetral do télico para que fosse analisado todo o contorno de sua estrutura (Figura 1). Para o petasma, 5 landmarks e 30 semilandmarks foram digitalizados, respectivamente (Figura 2). Tais critérios de marcos anatômicos foram feitos com base em critérios de homologia morfométrica de acordo com Bookstein (1982). Os semi-marcos anatômicos foram digitalizados para representar curvas homólogas entre as espécies com possíveis variações, utilizando uma ferramenta de curvas do tpsDig 2.26 (Rohlf, 2006), e em seguida utilizado o critério de equidistância entre os pontos. Todo o protocolo relacionado à demarcação dos semi-marcos anatômicos e outros detalhes foram baseados em Miazaki (2024).

As coordenadas dos pontos de referência foram submetidas a uma sobreposição generalizada da Análise dos Procrustes (GPA) (Rohlf & Slice, 1990), no software Morphoj 1.06 D® (Klingenberg, 2011), para corrigir efeitos de posicionamento dos espécimes durante a captura de imagem.

Uma regressão multivariada das coordenadas de Procrustes (forma) no tamanho do centroide (tamanho) foi realizada para analisar a variação da forma pelo efeito alométrico (Drake & Klingenberg, 2008). Correções dos efeitos estáticos e alométricos foram efetuadas, conforme proposto por Alencar et al. (2014). Neste caso, os resíduos da regressão multivariada foram

utilizados para as análises estatísticas em seguida e as avaliações de variação da forma. Uma análise de variações canônicas (CVA) foi realizada, usando os fatores de agrupamento 'Indivíduos' por 'espécies', para investigar os graus de diferença entre as formas do corpo dentro do espaço de todos os dados obtidos. No agrupamento espécie das fêmeas, ficaram definidos *X. kroyeri*, *X. dincao* e um agrupamento de fêmeas "Não identificados" (NI), podendo ser da espécie *X. baueri*. Esse procedimento busca confirmar suspeitas com a aplicação da MG, visto que as fêmeas dessa espécie ainda não foram claramente distinguidas. Em seguida, uma análise de função discriminante (DFA) foi aplicada para avaliar quais variações na forma poderiam discriminar com segurança as espécies. Os valores de probabilidade foram calculados com teste de permutação ($n = 1.000$) com base nas distâncias de Procrustes nas comparações realizadas na CVA e na DFA. Por fim, foram obtidas porcentagens da matriz de validação cruzada obtidas nas comparações do DFA. Os procedimentos de superimposição generalizada de procrustes, correção alométrica e as análises multivariadas foram realizados no software MorphoJ 1.07a (Klingenberg, 2011). Os gráficos "wireframe" comparativos foram gerados a partir dos scores obtidos na DFA e CVA.

Resultados e Discussões

Ao observar o caráter sexual das fêmeas, a CVA demonstrou uma visualização do morfoespaço dos grupos *X. kroyeri*, *X. dincao* e o grupo "Não identificado" (NI), com o componente 1 representando 62,55% e o componente 2 representando 36,44% da variação morfológica no télico (Figura 3). As variações exibidas no gráfico demonstram uma separação entre esses grupos, no qual segue as hipóteses do grupo NI estar representando a espécie de *X. baueri*, ou, essa diferença estar relacionada com uma variação de morfotipo devido a localidade desse grupo ser diferente das outras suas espécies. A DFA (Figura 4) reafirma os resultados da CVA, apresentando uma diferença estatística na morfologia entre os grupos. Para a comparação entre NI e *X. dincao*, os resultados estatísticos foram significativos (distância de procrustes=0,039; $P < 0,0001$), e para essa mesma relação foi obtido 94,87% de sinalização correta da matriz de validação cruzada para NI e 93,1% para *X. dincao*. Na comparação entre NI e *X. kroyeri*, a DFA revelou uma distância de procrustes=0,060; $P < 0,0001$ com 84,61% para NI e 86,2% para *X. kroyeri*. Por fim, a comparação entre os grupos já conhecidos na literatura com variação morfológica, *X. dincao* e *X. kroyeri*, com distância de procrustes=0,088; $P 0,0003$ e uma matriz de validação cruzada com 75,86% para *X. dincao* e 29,31% para *X. kroyeri*. A forma do télico de NI, que foi estabelecida por conta da incerteza de *X. baueri*, apresenta uma maior semelhança quando comparada a *X. dincao*, porém, essa variação pode também ser interpretada como uma população de morfótipos diferentes, dada pelas regiões diferentes dos espécimes. A forma do télico de *X. kroyeri*, considerada a mais discriminante entre os grupos aqui avaliados, continua a apresentar sua forma mais "achatada", diferente dos outros dois grupos que apresentam uma forma mais arredondada. A complexidade para identificação das fêmeas levou Carvalho-Batista et al. (2019) a não definirem caracteres para diferenciação das fêmeas dessas espécies, só apresentando caracteres para identificação dos machos. Miazaki et al. (2024) apresentaram uma característica diagnóstica para diferenciação entre *X. kroyeri* e *X. dincao*, usando a técnica de morfometria geométrica na avaliação da forma dos télicos, porém, sem definir variações para a nova espécie *X. baueri*. Nos machos, as amostras de petasma para as espécies *X. dincao* e *X. kroyeri* foram realizadas de 30 indivíduos, enquanto a espécie *X. baueri* somente 5 indivíduos foram amostrados por

conta da reduzida disponibilidade de indivíduos. A CVA demonstrou uma visualização do morfoespaço com o componente 1 representando 97,2% e o componente 2 2,8% de variação na estrutura analisada para essas espécies (Figura 5). Como ocorrido nas fêmeas, a DFA (Figura 6) mostrou a espécie *X. kroyeri* como a mais discriminante entre as espécies, com uma taxa de acerto (matr) de 100% quando comparada com *X. baueri* (distância de procrustes 0,096; P 0,4513) e 88% quando comparado com *X. dincao* (distância de procrustes 0,088; P 0,4661). A maior sobreposição ocorreu entre *X. dincao* e *X. baueri*, que apresentaram grande sobreposição em sua classificação, com 60% na matriz de validação cruzada para *X. baueri*, relatando uma distinção entre essas duas espécies menos robustas. A alta relação entre essas duas espécies é sugerida em Miazaki et al. (2024) como espécies que divergiram recentemente, justificada pelo isolamento geográfico entre as regiões do mar de Quaternário e do Caribe (Ludt & Rocha, 2015).

Conclusão

A técnica de morfometria geométrica está sendo considerada uma ferramenta-chave para diferenciar e descrever espécies de camarões que são muito semelhantes morfológicamente (Moraes et al. 2021). Assim, os caracteres sexuais secundários podem ser considerados uma estrutura diagnóstica confiável principalmente para diferenciar machos e fêmeas de *X. kroyeri*, o que confirma a utilidade dessa ferramenta na solução de problemas taxonômicos e filogenéticos. Dessa forma, ressaltamos a importância de estudos morfométricos, que possibilitem uma identificação precisa dos camarões sete-barbas, servindo de base para futuras medidas de manejo pesqueiro.

Referências

- Adams, DC.; Rohlf, F.J. & Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5–16.
- Alencar, C.E.R.D.; Lima-Filho, P. A.; Molina, W.F. & Freire, F.A.M. 2014. Sexual shape dimorphism of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda, Ucidae) accessed through geometric morphometric. *The Scientific World Journal*, 2014: 1–8.
- Boos, H.; Costa, R.C.; Santos, R.A.F.; Dias-Neto, J.; Severino-Rodrigues, E.; Rodrigues, L.F.; D'Incao, F.; Ivo, C.T.C. & Coelho, P.A. 2016. Avaliação dos camarões peneídeos (Decapoda: Penaeidae). Cap. 23: p. 300-317. In: Pinheiro, M., Boos, H. (Eds.), *Livro Vermelho Dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014*. Sociedade Brasileira de Carcinologia – SBC, Porto Alegre, RS, 466 p.
- Bookstein, F.L. 1982. Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 451–470.
- Carvalho-Batista, A.; Terossi, M.; Zara, F.J.; Mantelatto, F.L. & Costa, R.C. 2019. A multigene and morphological analysis expands the diversity of the seabed shrimp *Xiphopenaeus* Smith, 1869 (Decapoda: Penaeidae), with descriptions of two new species. *Scientific reports*, 9(1): 1–19.
- Carvalho-Batista, A.; Terossi, M.; Zara, F.J.; Mantelatto, F.L. & Costa, R.C. 2020. Validation of *Xiphopenaeus dincao* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto & Costa and *Xiphopenaeus baueri* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto & Costa (Decapoda: Penaeidae) from western Atlantic. *Zootaxa*, 4772(3): 597–599.

- Dias-Neto, J. & J. De F. O. Dias. 2015. Uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca. Brasília: IBAMA, 288 p.
- Dias-Neto, J. & J. De F. O. Dias. 2015. Uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca. Brasília: IBAMA, 288 p.
- Drake, A.G. & Klingenberg, C.P. 2008. The pace of morphological change: historical transformation of skull shape in St Bernard dogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1630): 71–76.
- Gusmão, J., Lazoski, C., Monteiro, F. A. & Solé-Cava, A. M. 2006. Cryptic species and population structuring of the Atlantic and Pacific seabob shrimp species, *Xiphopenaeus kroyeri* and *Xiphopenaeus rivetii*. *Marine Biology*, 149: 491–502.
- Hossain, M. Y. & J. Ohtomi. 2008. Reproductive biology of the southern rough shrimp *Trachysalambria curvirostris* (Penaeidae) in Kagoshima Bay, southern Japan. *Journal of Crustacean Biology*, 28: 607–612. <https://doi.org/10.1651/07-2970.1>
- Kerkhove, T. R. H. et al. 2019. Multilocus data reveal cryptic species in the Atlantic seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea:Decapoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, 127: 847–862.
- Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2): 353–357.
- LUDET, William B.; ROCHA, Luiz A. Shifting seas: The impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, v. 42, n. 1, p. 25-38, 2015.
- Miazaki, L. F., França, N. F., Nogueira, C. S., Mantelatto, F. L., & Costa, R. C. (2024). Advancing into the morphology of female differentiation in the seabob shrimps *Xiphopenaeus dincao* and *X. kroyeri*: Insights into the taxonomy. *Regional Studies in Marine Science*, 73, 103443.
- Moraes, A.B.; Moraes, D.; Alencar, C.E.R.D. & Freire, F.A. 2021. Native and non-native species of *Litopenaeus Pérez-Farfante, 1969* (Crustacea: Penaeidae) from the East Atlantic: Geometric morphometrics as a tool for taxonomic discrimination. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93: e20200107.
- Moraes, A. B., de Moraes, D. C. S., Pinheiro, A. P., & de Moraes Freire, F. A. (2025). Ontogenetic characterization of the secondary sexual characters of *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 and *Penaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda: Penaeidae). *Zoologischer Anzeiger*.
- Moraes, S. A. S. N., Alencar, C. E. R. D., Fransozo, A., Costa, R. C., Castilho, A. L., & Freire, F. A. M. (2018). Sexual and ontogenetic morphometric variation in *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): a new approach with linear and angular morphometric data. *Invertebrate Reproduction & Development*, 62(3), 143-153.
- Pérez-Farfante, I. 1970. Diagnostic characters of juveniles of the shrimps *Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, and *P. brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). In: Hacker, R.L., Fukuyama,

M.S. (Eds.), Special Scientific Report – Fisheries No. 599. United States Department of the Interior, U.S. Fish and Wildlife Service. Bureau of Commercial Fisheries, Washington, 36 p.

Pérez-Farfante, I. & Kensley, B. 1997. Penaeids and Sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Mémoires du Museum National D'Histoire Naturelle*, 175: 233 p.

Piergiorgio, R. M., Pontes, M. N., Duarte, A. V. B. & Gusmão, J. 2014. Haplotype-specific singlelocus multiplex PCR assay for molecular identification of sea-bob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862), cryptic species from the Southwest Atlantic using a DNA pooling strategy for simultaneous identification of multiple samples. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54: 348–353.

Rohlf, F.J. 2006. TpsDig version 2.1.0. Ecology and Evolution. SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Rohlf, F.J. & Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic biology*, 39(1): 40–59.

Tavares, C. & Gusmão, J. 2016. Description of a new Penaeidae (Decapoda: Dendrobranchiata) species, *Farfantepenaeus isabelae* sp. nov. *Zootaxa*, 4171(3): 505–516.

Anexos

Figura 1 - Demonstração dos locais de marcação de Landmarks e Semilandmarks no petasma.

Figura 2 - Demonstração dos locais de marcação de Landmarks e Semilandmarks no téglico.

Figura4-Comparação de wireframe da forma e das frequências dos escores da DFA. Os desvios entre os marcos anatômicos correspondentes entre os grupos de análise representam o deslocamento do vetor. Vermelho=X. dincao e NI; Preto=X. kroyeri; Branco=sobreposi

Figura3- Análise de variáveis canônicas dos fatores "indivíduo" vs. "espécie" como fatores de agrupamento e as grades de deformação e wireframes da forma para cada componente máximo nos eixo X e Y.

Figura 5 - Análise de variáveis canônicas dos fatores "indivíduo" vs. "espécie" como fatores de agrupamento e as grades de deformação e wireframes da forma para cada componente máximo nos eixos X e Y.

Figura 6-Comparação da forma do petasma e das frequências dos escores da DFA. Os desvios entre os marcos anatômicos correspondentes entre os grupos de análise representam o deslocamento do vetor. Vermelho=X. baueri, X.dincao; Preto=X.kroyeri; Branco=sobrepo

CÓDIGO: SB0741

AUTOR: ISABELA SOARES DE SOUSA CARNEIRO

ORIENTADOR: RAQUEL CORDEIRO THEODORO

TÍTULO: DELETANDO O INTEIN PRP8 DO GENOMA DE CRYPTOCOCCUS

Resumo

Inteins são elementos genéticos inseridos em genes codificadores que realizam splicing proteico autocatalítico após a tradução, permitindo que a proteína hospedeira funcione corretamente. Por estarem ausentes no genoma humano e presentes em diversos patógenos, incluindo *Cryptococcus neoformans*, esses elementos representam alvos terapêuticos promissores. O *C. neoformans* é um fungo oportunista causador de criptococose, doença sistêmica grave em indivíduos imunocomprometidos, cujo gene Prp8 abriga o *intein* Prp8, essencial para a atividade do spliceossomo e maturação de mRNAs. Neste projeto, propusemos utilizar CRISPR/Cas9 para remover especificamente o Prp8int, investigando seu papel na patogenicidade e seu potencial como alvo terapêutico. O plano de trabalho envolveu PCRs, clonagens, transformações, minipreps, sequenciamento, digestões enzimáticas e subclonagens. Foram realizados os PCRs restantes, clonagens dos moldes para recombinação homóloga, sequenciamento e digestões enzimáticas para montagem do plasmídeo. Entretanto, a finalização do projeto não foi possível devido a dificuldades na subclonagem no plasmídeo pGKB, sendo prevista a conclusão em um futuro plano de trabalho.

Palavras-chave: inteins. *Cryptococcus neoformans*. Prp8. CRISPR/Cas9. spliceossomo.

TITLE: DELETING THE PRP8 INTEIN FROM THE CRYPTOCOCCUS GENOME

Abstract

Inteins are genetic elements inserted into coding genes that perform autocatalytic protein splicing after translation, allowing the host protein to function properly. Being absent in the human genome but present in several pathogens, including *Cryptococcus neoformans*, these elements represent promising therapeutic targets. *C. neoformans* is an opportunistic fungus responsible for cryptococcosis, a severe systemic disease in immunocompromised individuals, whose Prp8 gene harbors the Prp8 intein, essential for spliceosome activity and mRNA maturation. In this project, we proposed using CRISPR/Cas9 to specifically remove Prp8int, investigating its role in pathogenicity and its potential as a therapeutic target. The work plan involved PCRs, cloning, transformations, minipreps, sequencing, enzymatic digestions, and subcloning. PCRs and gRNA cloning, construction of homologous recombination templates, partial sequencing, and enzymatic digestions for plasmid assembly were completed. However, project completion was not possible due to difficulties in subcloning into the pGKB plasmid, with a plan to finalize these experiments in future work.

Keywords: inteins. *Cryptococcus neoformans*. Prp8. CRISPR/Cas9. spliceosome. gene

Introdução

Internal Proteins (inteins), constituem elementos genéticos móveis que se inserem em genes do hospedeiro e catalisam um splicing proteico autocatalítico pós-traducional sem a necessidade de energia externa ou cofatores (Tharappel, Anil Mathew et al., 2025). Esse mecanismo resulta na excisão do intein e na ligação covalente das regiões flangeadoras N- e C-terminais (exteins) por uma ligação peptídica nativa, restaurando a conformação funcional da proteína hospedeira (Wood et al., 2023). Por não estarem presentes no genoma humano, mas estarem em genes essenciais de diversos patógenos, como aqueles envolvidos na replicação do DNA e na transcrição do RNA mensageiro (Pavankumar, et al., 2018), os inteins têm sido investigados como potenciais alvos terapêuticos, uma vez que a inibição de seu splicing pode comprometer a função da proteína hospedeira e, assim, impedir a viabilidade do microrganismo (Fernandes et al., 2022).

Um dos patógenos que possuem intein é o *Cryptococcus neoformans*, um fungo leveduriforme encapsulado e oportunista, causador da criptococose — micose sistêmica que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos (Maziarz et al., 2016). Em 2022, a Organização Mundial da Saúde classificou esse fungo como de prioridade crítica, evidenciando que, apesar de ser uma doença negligenciada, possui grande importância clínica, destacando a necessidade de fortalecer a vigilância da resistência antifúngica, de investir em pesquisa e inovação, e ampliar intervenções em saúde pública. Embora a infecção geralmente se inicie no trato respiratório, fungos do gênero *Cryptococcus* demonstram forte tropismo pelo sistema nervoso central, podendo levar à meningoencefalite criptocócica (Chen et al., 2022) e levando a centenas de milhares de mortes em todo o mundo a cada ano. No ano de 2020, houve cerca de 152.000 novos casos da doença registrados entre pessoas vivendo com HIV, apresentando uma taxa de mortalidade em torno de 70% (Rajasingham et al., 2022).

Os principais antifúngicos utilizados atualmente — como poliênicos, flucitosina, equinocandinas e azóis — são essenciais no tratamento de infecções fúngicas como a criptococose (Zhao et al., 2023). Contudo, sua citotoxicidade, decorrente da semelhança entre células fúngicas e humanas, e o crescente número de casos de resistência comprometem sua eficácia. Diante disso, destaca-se a necessidade de investir em novos alvos terapêuticos mais específicos, como os inteins, que podem ser inibidos seletivamente sem prejudicar as células do hospedeiro. Como demonstrado por Li et al. (2021), algumas pequenas moléculas já são capazes de inibir o splicing de intein Prp8 em *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, representando uma possibilidade promissora de novos agentes antifúngicos.

O gene Prp8 do *Cryptococcus neoformans* abriga um intein chamado Prp8, que é removido por splicing pós-traducional, permitindo que a proteína Prp8 atue corretamente como componente central do spliceossomo — complexo responsável pelo splicing de pré-mRNAs, para a geração de mRNAs maduros em eucariotos (Green et al., 2019). O projeto busca deletar o intein Prp8 (Prp8int) do genoma de *Cryptococcus neoformans*, preservando a função da proteína Prp8, por meio do sistema CRISPR/Cas9 associado ao reparo por

homologia (HDR). O objetivo é investigar como a ausência do intein afeta o metabolismo do fungo e avaliar seu potencial como alvo terapêutico, já que não está presente em humanos. O CRISPR/Cas9 utiliza um RNA guia (gRNA) que direciona a enzima Cas9 para clivar o DNA na sequência-alvo, possibilitando a inserção ou deleção de sequências específicas durante o reparo celular (Misganaw et al., 2021).

Tomando como base as informações anteriores, o atual plano de trabalho objetiva, portanto, a continuação do trabalho anterior, visando a construção de plasmídeos pGKB-CRISPR/Cas9 que tenham a capacidade de realizar o nocaute da sequência que codifica o Prp8int do genoma do *C. neoformans* sem que ocorra prejuízo à proteína PRP8.

Metodologia

Manutenção da cepa

O presente estudo utilizou o DNA da cepa de referência FC2 do *C. neoformans* cedida pela FioCruz extraído seguindo o protocolo do Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit da empresa Norgen Biotek Corp. Esse isolado é mantido em ágar YPD a 37°C no Laboratório de Micologia Médica (LAMIM) do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT/RN).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

No plano de trabalho anterior, foram realizados os PCRs para a amplificação de todos os RNAs guias (gRNAs), do gene Cas9 e das regiões promotoras. No atual plano, por sua vez, foi realizado o PCR do molde PRP8 sem o intein (PRP8Δint) e do molde ADE2mut, que contém as mutações sinônimas T614C e T617C no gene ADEwt. Todas as reações de PCR foram executadas com a enzima Phusion DNA Polymerase High Fidelity, segundo instruções do fabricante.

Purificação dos amplicons

Os produtos de PCR foram purificados com o kit GFX PCR DNA da GEHealthcare conforme instruções do fabricante. Posteriormente os amplicons foram quantificados por eletroforese no gel de agarose 1% utilizando o tampão de corrida Low Mass DNA Ladder (Invitrogen®).

Clonagem no plasmídeo de amplificação

Para a ligação dos insertos no plasmídeo utilizou-se o CloneJET PCR Cloning Kit da Thermo Fisher para ligar os produtos de PCR ao plasmídeo pJET1.2 blunt, de 2.974 pb que contém um gene de resistência à ampicilina.

A clonagem seguiu as instruções do fabricante, a qual utilizou o produto de PCR do molde PRP8Δint.

Recircularização do Ade2mut

Após a PCR de mutagênese sítio-dirigida, foi realizada a recircularização do plasmídeo pJET, que passou a conter o gene ADE2mut, utilizando o protocolo de ligação com T4 DNA ligase (Thermo Fisher). A mutação em ADE2wt tem como objetivo funcionar como marcador fenotípico, já que o ADE2mut leva à mudança de cor das colônias, garantindo a verificação da ocorrência da edição genética.

Digestão enzimática

Para confirmar a transformação e preparar as subclonagens, os minipreps do pJET foram digeridos enzimaticamente conforme o protocolo do Anza Restriction Enzyme Cloning System. As enzimas utilizadas variaram conforme o miniprep, com os detalhes das digestões e fragmentos obtidos apresentados no anexo 01. Os insertos de interesse geraram pontas coesivas compatíveis com o plasmídeo pGKB digerido, utilizado na construção do plasmídeo pGKB-CRISPR contendo o bloco de expressão ACT1+Cas9 e os gRNAs. Para a construção do pGKB base para todos os outros plasmídeos, foi utilizado inicialmente a digestão de ACT1, Cas9 e pGKB (sítio do cassete Act1+Cas9).

Subclonagem no plasmídeo de expressão

A subclonagem consiste em transferir o inserto do plasmídeo de amplificação (pJET) para o plasmídeo de expressão pGKB (Addgene Plasmid #85077), que contém o gene de resistência à canamicina (KanR) sob o promotor TEF1 e um promotor bacteriano sintético, conferindo resistência à canamicina e ao G418 (anexo 02).

O plasmídeo pGKB/CRISPR final inclui o bloco de expressão da Cas9 sob o promotor ACT1, os diferentes gRNAs e o molde Prp8 sem o intein, sendo essencial para a construção das cinco cepas mutantes de *Cryptococcus neoformans* (anexo 02). Para criar o plasmídeo base, os fragmentos digeridos do promotor ACT1, Cas9 e pGKB foram ligados em uma reação tripla seguindo o protocolo da T4 DNA ligase da Thermo Fisher, obedecendo a proporção inserto:vetor de 3:1.

Produção de células *E.coli* DH5a ultracompetentes

Para a obtenção das células competentes utilizadas nos experimentos de transformação, a cepa *Escherichia coli* DH5a, disponibilizada pelo Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), foi preparada de acordo com o protocolo de geração de células ultracompetentes empregando solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) e tampão PIPES (pH 7,0). Inicialmente, uma colônia foi inoculada em meio LB e incubada overnight a 37 °C sob agitação. No dia subsequente, o cultivo foi diluído em meio LB fresco e incubado até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de aproximadamente 0,3. A cultura foi então resfriada, centrifugada e submetida a lavagens sucessivas com solução gelada de CaCl₂. Após nova centrifugação, as células foram

ressuspensas, mantidas no gelo e aliqüotadas (250 µL) em microtubos, sendo posteriormente armazenadas no freezer de -80°C até o momento do uso.

Transformação bacteriana

As transformações foram realizadas em *Escherichia coli* DH5α competente, produzida no laboratório, utilizando o método de choque térmico conforme as instruções do kit Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells. Como controle positivo, empregou-se o plasmídeo pGKB não linearizado. Os experimentos envolveram a transformação da ligação tripla (ACT1 + Cas9 + pGKB), a recircularização do plasmídeo pJET contendo o ADE2mut, além das transformações com o plasmídeo pJET com o inserto OL-PRP8. A seleção dos transformantes foi realizada em ágar LB suplementado com canamicina para as construções com pGKB e em ágar LB contendo ampicilina (50 µg/mL) para as construções baseadas no pJET.

Extração de plasmídeos - Miniprep

Após o crescimento das bactérias transformadas foi realizada a extração dos plasmídeos de interesse das bactérias a partir do protocolo do GeneJET Plasmid Miniprep Kit da Thermo Fisher Scientific, seguidos de PCR e eletroforese para a confirmação.

Sequenciamento

O miniprep contendo pJET + ADE2mut foi encaminhado à UNESP para realização do sequenciamento por método de Sanger, com o objetivo de confirmar a mutação sítio-dirigida. Para a realização, foram utilizados os primers do sítio de clonagem do pJET fornecidos no kit comercial, a amostra obteve o sequenciamento da fita senso e da anti-senso.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todos os PCRs (molde PRP8Δint e Ade2mut) funcionaram. No anexo 03 é possível analisar a eletroforese dos PCRs realizados. O molde PRP8Δint possui 1303bp e o pJET + Ade2mut 3881bp.

Clonagem e transformação em DH5 alfa

Nessa etapa, somente houve crescimento bacteriano na placa de ágar LB + ampicilina denominada Ade2mut. Na da ligação tripla (ACT1 + Cas9 + pGKB) e do molde PRP8Δint (OL-Prp8) não houve crescimento.

Miniprep dos plasmídeos em bactérias transformadas

A única placa que houve crescimento bacteriano foi a pJ.Ade2mut. A extração dos plasmídeos foi realizada a partir do GeneJET Plasmid Miniprep Kit da Thermo Fisher Scientific. O miniprep foi enviado para o sequenciamento para a confirmação da mutação sinônima.

Digestão Enzimática

Como algumas digestões dos minipreps já haviam sido feitos no plano de trabalho anterior, as digestões enzimáticas necessárias para a criação do plasmídeo base pGKB-CRISPR foram realizadas (anexo 04 A) e os insertos foram purificados para a realização da ligação tripla a fim de realizar a construção do plasmídeo pGKB-CRISPR, como indica no anexo 04 B.

Subclonagem de ACT1 + Cas9 no pGKB e transformação em *E.coli*

As bactérias competentes da Invitrogen utilizadas em planos de trabalhos anteriores, apresentaram perda de eficiência, indicando redução significativa em sua competência para transformação. Como alternativa, nesse plano de trabalho, adotamos um protocolo para a produção de bactérias ultracompetentes, utilizando tampão PIPES e solução de CaCl₂ com o objetivo de melhorar a taxa de transformação. No controle, observamos crescimento, como está indicado no anexo 05 (A), no entanto, mesmo com essas novas células, não obtivemos sucesso na ligação tripla (B). Considerando a possibilidade de que o problema estivesse relacionado à ligação entre os fragmentos de DNA (ACT1 + Cas9 + pGKB). Pretende-se ajustar a proporção da reação para 5:1 (inserto/vetor) e repetir o procedimento de transformação posteriormente.

Sequenciamento

As sequências das amostras senso e anti-senso do pJET contendo o Ade2mut que foram sequenciadas, foram analisadas utilizando o software Bioedit e o Mega para alinhamento e confirmadas utilizando o BLAST.

DISCUSSÃO

A pesquisa de *inteins* como promissores alvos terapêuticos vem sendo estudado em diferentes microrganismos. Liman *et al.* (2024) demonstraram que o intein presente na recombinase RadA da arqueia *Thermococcus kodakarensis* exerce um papel regulatório essencial. A

inibição do *splicing* desse *intein* reduziu os níveis da proteína RadA funcional, causando efeitos fisiológicos importantes, como diminuição do crescimento celular, maior sensibilidade a danos no DNA e mudança no modo de replicação, que passou de dependente de recombinação (RDR) para dependente da origem de replicação (ODR). Como observado nesse estudo, o *splicing* de *inteins* pode funcionar como um mecanismo natural de regulação pós-tradução, modulando atividades proteicas críticas e a adaptação do organismo.

Em paralelo a isso, nossa hipótese é que o *intein* Prp8 presente em *Cryptococcus neoformans* também possa desempenhar uma função regulatória. A Prp8 é uma proteína essencial do spliceossomo, responsável pelo processamento do pré-mRNA, portanto, a eficiência do *splicing* do seu *intein* pode influenciar diretamente a formação de mRNAs maduros, afetando a expressão gênica e o metabolismo do fungo. Assim, o controle do *splicing* do Prp8int poderia representar um mecanismo pelo qual *C. neoformans* regula sua adaptação e virulência, destacando seu potencial como alvo terapêutico específico, sobretudo por estar ausente no genoma humano.

Os *inteins*, como o Prp8int, localizados em um genes essenciais do *Cryptococcus neoformans*, podem influenciar vias de sinalização importantes para a virulência do fungo (Mahmood *et al.*, 2024). Dessa forma, a utilização do sistema CRISPR/Cas9 para remover especificamente o Prp8int permite investigar como a ausência deste *intein* afeta o metabolismo e a patogenicidade da levedura, abrindo perspectivas para novos alvos terapêuticos.

Os três métodos mais utilizados para edição genética em eucariotos, baseados na clivagem da dupla fita de DNA por nucleases, são as Zinc Finger Nucleases (ZFNs), as Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) e o sistema CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9) (Shamshirgaran *et al.*, 2022). Enquanto as ZFNs e TALENs são técnicas mais antigas, complexas e trabalhosas, o CRISPR/Cas9 se destaca por sua simplicidade, eficiência e menor custo. Isso se deve ao mecanismo de reconhecimento mediado por gRNA, que permite que uma única proteína Cas9 funcione com diferentes gRNAs, possibilitando a edição de múltiplos loci do genoma simultaneamente. Dessa forma, o CRISPR/Cas9 reduz custos e tempo de experimentação, além de minimizar efeitos fora do alvo frequentemente observados nas técnicas ZFNs e TALENs (Tschaharganeh *et al.*, 2016).

Em um estudo anterior, Green *et al.* (2019) desenvolveram uma cepa de *C. neoformans* sem o *intein* Prp8, utilizando um gene sintético PRP8 Δ int clonado no vetor Cne Safe Haven pSDMA25.79. Contudo, esse gene foi inserido em uma região diferente do genoma, distinta da original onde o PRP8wt foi nocauteado, o que pode ter alterado a expressão de genes vizinhos e, consequentemente, influenciado o metabolismo da cepa independentemente da ausência do *intein*.

Apesar de ser mais simples em comparação com as outras técnicas, durante a execução desse projeto enfrentamos algumas dificuldades. Na etapa das transformações bacterianas dos moldes OL-PRP8 e da ligação tripla (ACT1 + Cas9 + pGKB) não houve crescimento das bactérias, o que nos levou a sugerir que as bactérias competentes poderiam ter perdido sua eficiência, comprometendo o experimento. Para solucionar isso, fizemos nossas próprias bactérias *E. coli* DH5a competentes no laboratório seguindo o método de transformação química por solução de cloreto de sódio. No entanto, mesmo com essas novas bactérias, infelizmente não houve transformação dos produtos de ligação acima mencionados, nos levando a sugerir que pudesse ser um problema na ligação, uma vez que houve transformação do controle positivo formado por um plasmídeo pGKB fechado.

O andamento do projeto está representado no anexo 06. Para os próximos passos, serão refeitas tentativas de transformação do molde PRP8 sem o *intein* e da ligação tripla. Tais procedimentos serão realizados em um próximo plano de trabalho a fim de criar as diferentes cepas do pGKB/CRISPR e realizar a deleção do *intein* PRP8 do isolado FC2 do *Cryptococcus neoformans*.

Conclusão

Não foi possível concluir este plano de trabalho devido a algumas intercorrências e dificuldades encontradas durante o desenvolvimento do projeto, conforme detalhado na seção de discussão. Pretende-se finalizar a construção dos cassetes e as subclonagens no pGKB em um próximo plano de trabalho. O plasmídeo pGKB/CRISPR, contendo a Cas9 e o promotor ACT1 será utilizado para a construção dos 5 plasmídeos pGKBs com os diferentes cassetes de gRNAs a fim de realizar as modificações necessárias para a correta deleção do *intein* Prp8 na cepa fúngica do *Cryptococcus neoformans*. Tais plasmídeos serão transfectados por meio de eletroporação e, posteriormente, serão realizadas análises entre as cepas mutantes e selvagens a fim de identificar uma possível relação entre a presença do *intein* Prp8 e a influência desse elemento no metabolismo e na patogenicidade do *Cryptococcus neoformans*.

Referências

- CHEN, Y.; SHI, Z. W.; STRICKLAND, A. B.; SHI, M. *Cryptococcus neoformans* infection in the central nervous system: the battle between host and pathogen. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 10, p. 1069, 12 out. 2022. DOI: 10.3390/jof8101069.
- FISHER, M. C.; DENNING, D. W. A lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS como um divisor de águas. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, p. 211–212, 2023. DOI: 10.1038/s41579-023-00861-x.
- GREEN, C. M.; et al. Spliceosomal Prp8 *intein* at the crossroads of protein and RNA splicing. *PLOS Biology*, v. 17, n. 10, p. e3000104, 10 out. 2019.

LI, Z.; THARAPPEL, A. M.; XU, J.; et al. Small-molecule inhibitors for the Prp8 intein as antifungal agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 2, e2008815118, 2021. DOI: 10.1073/pnas.2008815118.

LIMAN, G. L. S.; LENNON, C. W.; MANDLEY, J. L.; et al. Intein splicing efficiency and RadA levels can control the mode of archaeal DNA replication. *Science Advances*, v. 10, n. 38, eadp4995, 2024. DOI: 10.1126/sciadv.adp4995.

LOURENÇO, A.; et al. *Cryptococcus neoformans* Prp8 intein: an in vivo target-based drug screening system in *Saccharomyces cerevisiae* to identify protein splicing inhibitors and explore its dynamics. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 8, p. 846, 12 ago. 2022.

MAHMOOD, F.; et al. Roles of different signaling pathways in *Cryptococcus neoformans* virulence. *Journal of Fungi*, v. 10, n. 11, p. 786, 13 nov. 2024. DOI: 10.3390/jof10110786.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.006.

PAVANKUMAR, T. L. Inteins: localized distribution, gene regulation, and protein engineering for biological applications. *Microorganisms*, v. 6, n. 1, p. 19, 28 fev. 2018. DOI: 10.3390/microorganisms6010019.

RAJASINGHAM, R.; 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.

WOOD, D. W.; BELFORT, M.; LENNON, C. W. Inteins—mechanism of protein splicing, emerging regulatory roles, and applications in protein engineering. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 8 nov. 2023.

Anexos

Digestões enzimáticas dos minipreps

Construção dos plasmídeos pGKB. (A) Esquema geral do plasmídeo pGKB-CRISPR, mostrando a organização do bloco de expressão contendo os cassetes do ACT1+Cas9 e dos gRNAs. (B) Detalhamento dos gRNAs específicos das cinco cepas planejadas. (c) Modificações fe

Eletroforese. (A) Eletroforese dos PCRs realizados para os moldes PRP8 Δ int e Ade2mut (3881 bp), todos com amplificação bem-sucedida. (B) Marcador utilizado na eletroforese: Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder.

Digestão enzimática para ligação tripla. Digestões enzimáticas dos fragmentos do plasmídeo base pGKB-CRISPR (A) e purificação dos insertos para a ligação tripla (B).

Avaliação da competência bacteriana. Controle (A) e tentativa de ligação tripla (B) utilizando células ultracompetentes DH5a sem crescimento.

Andamento do projeto. Os "sim" indicam os experimentos que foram concluídos, os "não" referem-se aos experimentos que ainda não foram realizados.

CÓDIGO: SB0757

AUTOR: MARIA JORDANA PEGADO QUEIROZ DE CASTRO

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Estudo da associação entre adipócitos e macrófagos na orquestração do microambiente tumoral do câncer de mama após tratamento com nanosistemas de liberação de fármacos.

Resumo

Neste estudo, foi avaliada a associação entre macrófagos e adipócitos no microambiente tumoral do câncer de mama, após o tratamento com exossomos derivados de macrófagos M1 (Exo M1) isolados ou associados a nanopartículas de PLGA carregadas com Poly I:C (Exo M1 + NP115). Amostras tumorais foram processadas, coradas por H&E e submetidas à uma análise histopatológica semiquantitativa de fibrose, infiltrado inflamatório, necrose e adipócitos. Os resultados mostraram que o tratamento com Exo M1 reduziu significativamente a quantidade de adipócitos em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), sugerindo possível modulação da interação entre macrófagos e tecido adiposo no microambiente tumoral. Além disso, grupos tratados com Exo M1 e Exo M1 + NP115 apresentaram redução significativa da fibrose ($p < 0,0001$), parâmetro constantemente associado à rigidez da matriz extracelular e resistência terapêutica. Esses resultados mostram o potencial de estratégias terapêuticas que ajudam a modular o microambiente tumoral.

Palavras-chave: Câncer de mama, Tecido adiposo, Macrófagos, Exossomos, Microambiente

TITLE: Study of the association between adipocytes and macrophages in the orchestration of the tumor microenvironment in breast cancer after treatment with drug delivery nanosystems.

Abstract

In this study, the association between macrophages and adipocytes in the breast cancer tumor microenvironment was evaluated following treatment with exosomes derived from M1 macrophages (Exo M1), either alone or in combination with PLGA nanoparticles loaded with Poly I:C (Exo M1 + NP115). Tumor samples were processed, stained with H&E, and subjected to a semiquantitative histopathological analysis of fibrosis, inflammatory infiltrate, necrosis, and adipocytes. The results showed that treatment with Exo M1 significantly reduced the number of adipocytes compared to the control group ($p < 0.05$), suggesting a possible modulation of the interaction between macrophages and adipose tissue in the tumor microenvironment. In addition, groups treated with Exo M1 and Exo M1 + NP115 exhibited a significant reduction in fibrosis ($p < 0.0001$), a parameter consistently associated with extracellular matrix stiffness and therapeutic resistance. These findings highlight the potential of therapeutic strategies that modulate the tumor microenvironment.

Keywords: Breast cancer, Adipose tissue, Macrophages, Exosomes, Microenvironment

Introdução

O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado e uma das principais causas de morte relacionada ao câncer em mulheres em todo o mundo [1]. A obesidade é um fator de risco bem estabelecido e um determinante negativo no prognóstico do CM, estando associada a um risco aumentado de formas mais agressivas da doença e a uma redução na sobrevida das pacientes [1-3]. O tecido adiposo (TA), antes considerado apenas uma reserva energética, é atualmente reconhecido como um órgão endócrino e inflamatório, capaz de secretar uma ampla gama de moléculas bioativas que desempenham papéis importantes na fisiologia do organismo e que podem influenciar diretamente no câncer de mama [3,4]. Durante o ganho de peso, alterações como hipertrofia dos adipócitos, condições hipóxicas, inflamação crônica de baixo grau e mudanças na composição da matriz extracelular (MEC) são comuns no TA [5-7]. Esse conjunto de modificações contribui para a formação de um microambiente inflamatório que favorece a tumorigênese [4]. Neste contexto, o sistema imune desempenha um papel de extrema importância no microambiente tumoral, pois o tecido adiposo, quando hipertrofiado e metabolicamente alterado, libera citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6), as quais irão atrair e polarizar células imunológicas em proximidade ao tumor [8,9]. E essa inflamação crônica desequilibra a resposta do sistema imunológico, tornando o ambiente ao redor do tumor mais favorável à manutenção da doença [10]. Entre as células mais importantes nesse processo inflamatório, estão os macrófagos associados ao tumor (MATs), que podem apresentar fenótipos diferentes: M1, o qual possui um perfil pró-inflamatório e anti-tumoral, e M2, o qual possui um perfil imunossupressor e de favorecimento à angiogênese [11]. Quando há uma presença predominante de MATs M2 no microambiente tumoral, o tumor tende a ser mais resistente ao tratamento, mais invasivo e com pior prognóstico [12]. Além disso, a interação entre citocinas pró-inflamatórias, adipócitos e células do sistema imune, cria um ambiente que mantém a inflamação crônica e dificulta a ação de respostas imunes contra o tumor, representando um obstáculo para tratamentos convencionais e imunoterapias [13]. Em vista disso, terapias que modulam o microambiente tumoral têm se destacado, em particular, aquelas capazes de reverter a imunossupressão e estimular respostas imunes contra o tumor [14,15]. Como exossomos, ou vesículas extracelulares de macrófagos M1, que são capazes de ativar o sistema imune e reduzir a progressão do tumor e que, ao serem associados ao Poly I:C (agonista do receptor tipo toll 3), amplificam a resposta imunológica, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutando células efetoras [16]. Cabe salientar que, perfis pró-inflamatórios tendem a favorecer a eficácia das imunoterapias, ao passo que perfis anti-inflamatórios favorecem a evasão tumoral e a resistência terapêutica [17]. Dessa forma, este estudo tem como objetivo, analisar a associação entre macrófagos e adipócitos no microambiente inflamatório e tumoral do câncer de mama, após tratamento com nanossistemas de liberação de fármacos, por meio da avaliação histopatológica comparativa do efeito dessas nanoformulações no tecido adiposo tumoral.

Metodologia

Metodologia Blocos de parafina contendo tumores de câncer de mama foram obtidos do repositório do Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação da UFRN (LAICI-

DMOR/UFRN) [16]. A partir desses blocos, confeccionaram-se lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina (H&E). Os grupos avaliados foram: Salina (grupo controle), Exo M1 (exossomos derivados de macrófagos M1), Exo M1 + NP115 (exossomos de macrófagos M1 associados a nanopartículas contendo Poly I:C). Análise histopatológica As lâminas foram submetidas à análise morfológica, e as imagens adquiridas por meio de microscópio de luz LED Nikon E200 (Minato), acoplado a uma câmera digital (Moticam). Durante a avaliação histopatológica, foram atribuídos escores quantitativos para a análise de fibrose, infiltrado inflamatório e necrose tumoral adaptados de estudos anteriores [18]. Os escores, para cada parâmetro foram categorizados como 1: ausentes; 2: presença leve; 3: presença moderada e 4: presença severa. As lâminas foram analisadas no aumento de 100x para a obtenção de campos representativos para a avaliação histológica. Para a avaliação do tecido adiposo, foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), que possibilitou a quantificação dos adipócitos por campo, seguindo a metodologia previamente descrita [19]. Análise Estatística A análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism, versão 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para a comparação entre os grupos, foi utilizada a análise de variância não paramétrica (ANOVA), seguida pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando-se estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Resultados e Discussões

A análise histopatológica mostrou alterações relevantes na análise do tecido adiposo, com o grupo Exo M1 apresentando redução significativa na quantidade de adipócitos em comparação ao grupo controle (Salina) ($p < 0,05$) (Figura 1), enquanto não foram verificadas diferenças entre os grupos Salina e Exo M1 + NP115. Esse resultado pode estar relacionado ao papel dos macrófagos do tipo M1 no microambiente tumoral, já que a interação entre adipócitos e macrófagos é um importante fator no tecido adiposo no câncer de mama, pois favorecem a formação de um microambiente tumoral pró-tumorigênico [20]. Nesse contexto, a hipertrofia dos adipócitos no tecido tumoral contribui para a liberação de adipocinas e ácidos graxos livres, que passam a ser utilizados como fonte de energia e substratos metabólicos pelas células neoplásicas, favorecendo sua sobrevivência e proliferação [21]. Além disso, estudos indicam que a obesidade favorece um ambiente inflamatório crônico, caracterizado também por hipóxia e maior recrutamento de macrófagos, condições que, em conjunto, favorecem o crescimento, invasão e progressão do microambiente tumoral [22]. Assim, essa redução na presença de adipócitos, sugere que os exossomos derivados de macrófagos M1, podem atuar nesse processo inflamatório, ajudando a diminuir alterações prejudiciais no tecido adiposo associado ao tumor. Já a fibrose foi o parâmetro que mostrou maior diferença entre os grupos, com os grupos Exo M1 e Exo M1 + NP115 mostrando redução significativa da presença de fibrose quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 1). A fibrose no microambiente tumoral, está constantemente ligada à rigidez da Matriz Extracelular (MEC), o que favorece a progressão tumoral e muitas vezes a resistência terapêutica. Na obesidade, mudanças na dinâmica da MEC foram descritas como um dos principais mecanismos de promoção da tumorigênese mamária [23,24]. Por fim, nos parâmetros de presença de infiltrado inflamatório e necrose tumoral não foi constatada diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p > 0,05$) (Figura 1).

Conclusão

Este estudo demonstrou que o tecido adiposo desempenha papel fundamental na modulação do microambiente tumoral do câncer de mama, contribuindo para a manutenção de um ambiente inflamatório crônico que favorece a progressão tumoral. Além disso, foi visto que exossomos derivados de macrófagos M1 modulam significativamente esse microambiente, reduzindo a quantidade de adipócitos e a fibrose do tecido adiposo, fatores associados à progressão tumoral e à resistência terapêutica. Embora não tenham sido observadas alterações significativas no infiltrado inflamatório e na necrose, os achados destacam o potencial de estratégias de imunoterapias que promovem a reprogramação imunológica e a modulação do microambiente do tecido adiposo.

Referências

Ritter A, Kreis NN, Roth S, Friemel A, Safdar BK, Hooock SC, Wildner JM, Allert R, Louwen F, Solbach C, Yuan J. Cancer-educated mammary adipose tissue-derived stromal/stem cells in obesity and breast cancer: spatial regulation and function. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023 Jan 30;42(1):35. doi: 10.1186/s13046-022-02592-y. PMID: 36710348; PMCID: PMC9885659. Vaysse C, Lømo J, Garred Ø, Fjeldheim F, Lofteroed T, Schlichting E, McTiernan A, Frydenberg H, Husøy A, Lundgren S, Fagerland MW, Richardsen E, Wist EA, Muller C, Thune I. Inflammation of mammary adipose tissue occurs in overweight and obese patients exhibiting early-stage breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2017 May 3;3:19. doi: 10.1038/s41523-017-0015-9. Erratum in: *NPJ Breast Cancer.* 2017 Sep 5;3:35. doi: 10.1038/s41523-017-0030-x. PMID: 28649659; PMCID: PMC5460134. Kothari C, Diorio C, Durocher F. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 11;21(16):5760. doi: 10.3390/ijms21165760. PMID: 32796696; PMCID: PMC7460846. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2011 Apr 1;71(7):2455-65. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3323. PMID: 21459803. Flori L, Piragine E, Spezzini J, Citi V, Calderone V, Martelli A. Influence of Polyphenols on Adipose Tissue: Sirtuins as Pivotal Players in the Browning Process. *Int J Mol Sci.* 2023 May 25;24(11):9276. doi: 10.3390/ijms24119276. PMID: 37298226; PMCID: PMC10253356. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Miele C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci.* 2019 May 13;20(9):2358. doi: 10.3390/ijms20092358. PMID: 31085992; PMCID: PMC6539070. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest.* 2018 Sep;48(9):e12997. doi: 10.1111/eci.12997. Epub 2018 Aug 3. PMID: 29995306. Habanjar O, Bingula R, Decombat C, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 16;24(4):4002. doi: 10.3390/ijms24044002. PMID: 36835413; PMCID: PMC9964711. Vera MJ, Guajardo F, Urrea FA, Tobar N, Martínez J. TNF-Alpha Promotes an Inflammatory Mammary Microenvironment That Favors Macrophage and Epithelial Migration in a CCL2- and Mitochondrial-ROS-Dependent Manner. *Antioxidants (Basel).* 2023 Mar 27;12(4):813. doi: 10.3390/antiox12040813. PMID: 37107188; PMCID: PMC10135343. Sana Hibino, T. Kawazoe, H. Kasahara, S. Itoh, T. Ishimoto, M. Sakata-Yanagimoto and K. Taniguchi. "Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22115421>. Tower H, Ruppert M, Britt K. The Immune

Microenvironment of Breast Cancer Progression. *Cancers* (Basel). 2019 Sep 16;11(9):1375. doi: 10.3390/cancers11091375. PMID: 31527531; PMCID: PMC6769749. Kundu M, Butti R, Panda VK, Malhotra D, Das S, Mitra T, Kapse P, Gosavi SW, Kundu GC. Modulation of the tumor microenvironment and mechanism of immunotherapy-based drug resistance in breast cancer. *Mol Cancer*. 2024 May 7;23(1):92. doi: 10.1186/s12943-024-01990-4. PMID: 38715072; PMCID: PMC11075356. Wen Y, Zhu Y, Zhang C, Yang X, Gao Y, Li M, Yang H, Liu T, Tang H. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Front Pharmacol*. 2022 Oct 14;13:1040163. doi: 10.3389/fphar.2022.1040163. PMID: 36313280; PMCID: PMC9614255. He Y, de Araújo Júnior RF, Cavalcante RS, Yu Z, Schomann T, Gu Z, Eich C, Cruz LJ. Effective breast cancer therapy based on palmitic acid-loaded PLGA nanoparticles. *Biomater Adv*. 2023 Feb;145:213270. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.213270. Epub 2022 Dec 26. PMID: 36603405. de Carvalho TG, Lara P, Jorquera-Cordero C, Aragão CFS, de Santana Oliveira A, Garcia VB, de Paiva Souza SV, Schomann T, Soares LAL, da Matta Guedes PM, de Araújo Júnior RF. Inhibition of murine colorectal cancer metastasis by targeting M2-TAM through STAT3/NF- κ B/AKT signaling using macrophage 1-derived extracellular vesicles loaded with oxaliplatin, retinoic acid, and Libidibia ferrea. *Biomed Pharmacother*. 2023 Dec;168:115663. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115663. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37832408. Souza SVP, Aguiar ACV, Albuquerque ECS, Eich C, Cruz LJ, Lara P, Jorquera-Cordero C, Gomes RF, Paula RCM, Freire RS, de Araújo Júnior AJRF. M1 Macrophage Extracellular Vesicles and TLR3 Agonist Nanoparticles Down-Regulate Immunosuppression and Metastasis via AKT/TAM in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Carcinog*. 2025 Sep;64(9):1450-1461. doi: 10.1002/mc.70003. Epub 2025 Jun 24. PMID: 40553053; PMCID: PMC12370002. Hou J, Karin M, Sun B. Targeting cancer-promoting inflammation - have anti-inflammatory therapies come of age? *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 May;18(5):261-279. doi: 10.1038/s41571-020-00459-9. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33469195; PMCID: PMC8978805. Guo Q, Yaron JR, Wallen JW 3rd, Browder KF, Boyd R, Olson TL, Burgin M, Ulrich P, Aliskevich E, Schutz LN, Fromme P, Zhang L, Lucas AR. PEGylated Serp-1 Markedly Reduces Pristane-Induced Experimental Diffuse Alveolar Hemorrhage, Altering uPAR Distribution, and Macrophage Invasion. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Feb 16;8:633212. doi: 10.3389/fcvm.2021.633212. PMID: 33665212; PMCID: PMC7921738. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542. Engin AB, Engin A, Gonul II. The effect of adipocyte-macrophage crosstalk in obesity-related breast cancer. *J Mol Endocrinol*. 2019 Apr 1;62(3):R201-R222. doi: 10.1530/JME-18-0252. PMID: 30620711. Blücher C, Stadler SC. Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Front Endocrinol* (Lausanne). 2017 Oct 30;8:293. doi: 10.3389/fendo.2017.00293. PMID: 29163362; PMCID: PMC5670108. Seo BR, Bhardwaj P, Choi S, Gonzalez J, Andresen Eguiluz RC, Wang K, Mohanan S, Morris PG, Du B, Zhou XK, Vahdat LT, Verma A, Elemento O, Hudis CA, Williams RM, Gourdon D, Dannenberg AJ, Fischbach C. Obesity-dependent changes in interstitial ECM mechanics promote breast tumorigenesis. *Sci Transl Med*. 2015 Aug 19;7(301):301ra130. doi: 10.1126/scitranslmed.3010467. PMID: 26290412; PMCID: PMC4837896. Li J, Xu R. Obesity-Associated ECM Remodeling in Cancer Progression. *Cancers* (Basel). 2022 Nov 19;14(22):5684. doi: 10.3390/cancers14225684. PMID: 36428776; PMCID: PMC9688387. Zhang M, Zhang B. Extracellular matrix stiffness: mechanisms in tumor progression and therapeutic potential in cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2025 Apr 10;14(1):54. doi: 10.1186/s40164-025-00647-2. PMID: 40211368; PMCID: PMC11984264.

Anexos

Figura 1- Análise estatística do tecido tumoral. (A) Adipócitos. (B) Fibrose. (C) Necrose. (D) Infiltrado inflamatório. Os gráficos apresentam os grupos Salina, Exo M1 + NP115 e Exo M1, com valores expressos em score.i

CÓDIGO: SB0774

AUTOR: LIHEBE FREIRE MAIA

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Padronização do Fucoidan como controle positivo em ensaios antiobesidade usando larvas de *Tenebrio molitor* como modelo in vivo

Resumo

A obesidade se estabeleceu como um dos mais complexos desafios da saúde pública do século XXI. Atuando como catalisador para diversas doenças crônicas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de fármacos antiobesidade evoluiu consideravelmente; contudo, muitos desses produtos foram removidos do mercado, devido a preocupações com seus efeitos colaterais. Diante disso, tornam-se essenciais pesquisas para o desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes para o tratamento da doença. Pensando nisso, em trabalhos passados, nosso grupo já relatou o efeito antiobesidade de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados (PS) da alga marinha *Caulerpa sertularioides* em modelos in vitro, mas ainda não há estudo em um modelo in vivo. Nesse sentido e seguindo a política dos 3Rs em pesquisas com animais, a larva de *Tenebrio molitor* apresenta-se como modelo potencial para estudar os efeitos antiobesidade, pois possui 34,5% de percentual de gordura. Neste estudo realizou-se uma padronização utilizando a larva de *T. molitor* como um novo modelo in vivo para testes antiobesidade. Os resultados, embora preliminares, indicam que as larvas de *T. molitor* mantidas em uma dieta hipercalórica (substrato+glicose 15%) tiveram um aumento significativo no seu percentual de gordura em relação aos animais que foram mantidos em dieta normal, indicando que as larvas de *T. molitor* poderão ser utilizadas para desenvolver um modelo in vivo para estudar efeitos antiobesidade de compostos, como o caso dos PS de algas

Palavras-chave: Obesidade. modelos in vivo, acúmulo de gordura.

TITLE: Standardization of Fucoidan as a positive control in anti-obesity assays using *Tenebrio molitor* larvae as an in vivo model.

Abstract

Obesity has established itself as one of the most complex public health challenges of the 21st century, acting as a catalyst for several chronic diseases. In recent years, the development of anti-obesity drugs has advanced considerably; however, many of these products have been withdrawn from the market due to concerns about their side effects. Therefore, research into the development of safe and effective drugs for treating the disease is essential. With this in mind, in previous work, our group has reported the anti-obesity effect of sulfated polysaccharide (SP)-rich samples from the marine algae *Caulerpa sertularioides* in in vitro models, but there are still no studies in an in vivo model. In this sense, and following the 3Rs

policy in animal research, the *Tenebrio molitor* larva presents a potential model for studying anti-obesity effects, as it has a 34.5% body fat percentage. In this study, standardization was performed using the *T. molitor* larva as a new *in vivo* model for anti-obesity testing. The results, although preliminary, indicate that *T. molitor* larvae maintained on a high-calorie diet (substrate + 15% glucose) had a significant increase in their fat percentage compared to animals maintained on a normal diet, indicating that *T. molitor* larvae could be used to develop an *in vivo* model to study the anti-obesity effects of compounds, such as seaweed PS.

Keywords: Obesity, *in vivo* models, fat accumulation.

Introdução

A obesidade consolidou-se como um dos mais urgentes e complexos desafios no cenário da saúde pública mundial. Longe de ser uma preocupação isolada, ela também atua como um catalisador para uma série de doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (GJERMENI et al., 2025). Além disso, essa condição causada pelo acúmulo anormal de gordura vem ganhando cada vez mais espaço na sociedade atual. Em 2022, os casos de obesidade ultrapassaram a marca de 1 bilhão, atingindo cerca de 879 milhões de adultos e 159 milhões de crianças e adolescentes (entre 5 e 19 anos), o que reflete um avanço preocupante, já que o número de casos duplicou em adultos e quadruplicou em jovens desde o ano de 1990 (FACTOR et al., 2024).

Uma das principais causas dessa epidemia que vem se perpetuando nos dias atuais é o desequilíbrio energético de longo prazo, que é causado quando o consumo de calorias supera o gasto energético. O tratamento contra a obesidade acontece de forma individual, já que alguns conseguem bons resultados apenas com uma reeducação alimentar, enquanto outros precisam recorrer a fármacos ou cirurgias. Nos últimos cinco anos, o número de fármacos cresceu de forma notável com medicamentos realmente eficientes (ARONNE et al., 2025). No entanto, alguns fármacos tiveram que ser retirados do mercado por conta de preocupações com efeitos colaterais, pois a longo prazo, havia indicativos de aumento de doenças cardíacas, efeitos psiquiátricos e aumento no risco de câncer (CHAO et al., 2020). Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de mais pesquisas para o desenvolvimento de fármacos com resultados eficientes a longo prazo.

Sob esse contexto, foi observado em trabalhos anteriores o efeito anti-adipogênico de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados (PS) da alga marinha *Caulerpa prolifera*, usando pré-adipócitos 3T3-L1 e o nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Neste trabalho, foi observado que as amostras ricas em PS diminuem de forma significativa os níveis de expressão de marcadores adipogênicos e de marcadores lipogênicos (CHAVES FILHO et al., 2020). Além disso, nosso grupo realizou trabalhos anteriores que mostraram o efeito antiobesidade de amostras ricas em PS extraídas da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides*. Essas amostras foram fracionadas em 3 frações ricas em SPS, entre as amostras apenas a F0,9 apresentou efeito significativo em células 3T3-L1 (CHAVES FILHO et al., 2022). Já outros trabalhos mostraram que o Fucoidan, que é uma classe de PS ricos em fucose, isolados de algas marinhas marrons, apresenta atividade anti-adipogênica em camundongos com uma dieta rica em gordura (LEE et al., 2022), indicando, portanto, o potencial dos PS para aplicações no desenvolvimento de estratégias antiobesidade.

De acordo com os princípios éticos para o uso de animais em pesquisas que seguem a política dos 3 Rs (BURCH, 1995), devemos priorizar o uso de animais invertebrados ao invés dos vertebrados, pois são mais vantajosos por serem seres com vida mais curta, baixo custo e fácil manuseio (CORREA et al., 2023). Dessa forma, a larva de *Tenébrio molitor* apresenta-se como modelo potencial para estudar os efeitos antiobesidade de amostras ricas em PS, pois, além de ser rica em proteínas, possui um percentual de gordura de 34,5% (HACHERO-CRUZADO et al. 2024). Mesmo que esses organismos sejam muito utilizados como alimento na pecuária (MORUZZO et al., 2021), não há registros de trabalhos que abordem a sua aplicação como modelo *in vivo* para estudos de antiobesidade. Dessa forma, antes de testar o efeito do Fucoïdan e das amostras ricas em PS de algas na larva de *T. molitor*, foi necessário uma padronização para estabelecer um protocolo de estudo.

Assim, esse trabalho teve como objetivo realizar uma padronização das condições experimentais para estabelecer um protocolo de estudo do efeito da dieta hipercalórica nas larvas de *T. molitor*, avaliando assim seu potencial para uso em estudos de antiobesidade.

Metodologia

1- Manutenção das larvas de *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 15%. Além disso, os grupos analisados também foram utilizados para observar o comportamento das larvas de acordo com cada dieta em que elas foram submetidas. Os estudos foram realizados em placas de 6 poços, colocando uma larva em cada poço, com o peso inicial entre 20 e 30 mg para cada condição. 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.

2- Obtenção do corpo gorduroso

Ao final do experimento, as larvas foram dissecadas com o objetivo de obter o 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 fosfato salina (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 guardadas a -20°C.

3- Quantificação de triglicerídeos das larvas do *Tenebrio molitor*

A quantificação dos triglicerídeos foi realizada utilizando um kit comercial seguindo as recomendações do fabricante, Labtest (Triglicérides Liquiform). Resumidamente, as amostras

depois de sonicadas e submetidas à inativação das lipases, foram colocadas (2,5 µL) em uma placa de 96 poços e adicionado o reagente (250 µL). Foi utilizado o padrão da curva fornecido no kit, adaptando para volumes menores. O ensaio foi realizado em triplicata. A placa foi levada para a incubadora por 10 min e a absorbância foi lida a 505 nm.

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 por poço. A curva padrão foi construída utilizando diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA). Água ultra pura 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 no final a 562 nm.

5- Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos a análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. Para cada grupo experimental (Dieta padrão e glicose 15%) 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 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 forma de média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e apresentados em gráficos. (figura 3.)

Resultados e Discussões

Ao final do experimento, foi observado que os dois grupos apresentaram aumento de peso corporal. (figura 1) Porém, nota-se uma tendência maior ganho de massa nas larvas de *Tenebrio molitor* que foram mantidas em dieta hipercalórica, pois no grupo controle mantido em dieta padrão apresentaram pesos finais em torno de 30 a 35 mg. No grupo mantido em dieta suplementada com glicose 15% os valores dos pesos finais das larvas variaram entre 30 e 50 mg. Dessa forma, os resultados mostram que a suplementação com glicose teve impacto no aumento de peso larval.

Na quantificação de triglicerídeos, o grupo mantido com dieta padrão apresentou valores médios em torno de 2,4 a 2,5 mg, enquanto o grupo submetido a dieta com 15% glicose apresentou valores mais elevados 2,8 a 3,0 mg. (figura 2.) Levando em consideração a variação individual de cada animal, a mediana mais alta do grupo mantido com glicose a 15%, demonstra que a suplementação contribuiu para um maior acúmulo lipídico no corpo gorduroso das larvas. Quando o valor extremo do grupo experimentado em substrato padrão foi removido, a diferença entre os grupos ficou ainda mais evidente, reforçando que a dieta hipercalórica foi capaz de estimular o aumento de triglicerídeos. (figura 2)

Na análise da razão entre triglicerídeos e proteínas, que reflete o acúmulo relativo da gordura em relação à massa celular, também foi possível observar um padrão semelhante. O grupo

mantido em dieta padrão apresentou mediana próxima a 20, com variações entre 17 e 25 mg/mL. O grupo mantido com a suplementação de glicose a 15% apresentou valores mais elevados, com mediana em torno de 23 e variações entre 19 e 26 mg/mL. Esses resultados, indicam que proporcionalmente, as larvas submetidas a dieta hipercalórica acumularam mais gordura em relação a quantidade de proteína, caracterizando então um perfil semelhante ao da obesidade. (figura 3)

Diante do exposto, os resultados obtidos através de análises estatísticas, utilizando o teste t de student, demonstram que a suplementação de glicose a 15% na dieta das larvas de *T. molitor* resultou em um aumento de peso corporal, maior acúmulo de triglicerídeos e elevação na razão entre triglicerídeos e proteínas, sendo o $p > 0,05$. (figura 3.) Essas diferenças estatísticas confirmam que as larvas respondem a modificações alimentares, o que reforça seu possível potencial para modelo in vivo em testes antiobesidade. Entretanto, estudos adicionais ainda são necessários para a confirmação definitiva, mas os dados iniciais são promissores quanto ao potencial das larvas como um novo modelo *in vivo*.

Conclusão

Neste estudo, se avançou na padronização de um protocolo para o uso das larvas de *Tenébrio molitor* como modelo in vivo para testes relacionados ao combate à obesidade. Os resultados indicaram que a suplementação da dieta com glicose a 15% foi capaz de promover alterações no aumento do peso corporal, menor acúmulo de triglicerídeos e na elevação da razão entre triglicerídeos e proteínas em comparação ao grupo experimentado com substrato basal. No entanto, ainda precisa ser validado um controle positivo, ou seja, usar um composto que inibe o acúmulo de triglicerídeos quando as larvas foram submetidas à dieta hipercalórica.

Apesar disso, esses resultados demonstram que as larvas respondem a alterações alimentares, evidenciando assim seu potencial como modelo para estudos antiobesidade, alinhado aos princípios dos 3Rs, apresentando uma alternativa ética, invertebrada e de baixo custo.

Dessa forma, a padronização realizada neste trabalho é um avanço metodológico importante para os estudos antiobesidade com modelos in vivo. Ressalta-se, entretanto, a necessidade de estudos adicionais utilizando a larva de *Tenébrio molitor*, especialmente com maior replicação no uso de bioativos, como as amostras ricas em polissacarídeos sulfatados extraídas da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* e o Fucoidan que tem atividade anti adipogênica descrita.

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.; SENYUCCEL, 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](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 cardiometabolic 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>.

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>.

Anexos

Figura 1- Peso das larvas de *T. molitor* mantidas em dieta padrão ou em dieta enriquecida com 15 % de glicose, durante 15 dias . Barra branca representa dieta padrão e barra cinza representa a dieta hipercalórica.

Figura 2- Quantificação de triglicerídeos no corpo gorduroso de *T. molitor*. A) Todos os valores obtidos. B) Com exclusão de valor extremo no grupo dieta padrão. As barras cinzas representam a dieta padrão e as barras brancas dieta hipercalórica.

Figura 3 Quantificação dos triglicerídeos normalizados pela proteína. A) Todos os valores obtidos B) Sem o valor extremo da dieta padrão. Grupo suplementado possui valores estatísticos ($p > 0,05$) elevados. Barras brancas padrão e barras cinzas hipercalórica

CÓDIGO: SB0777

AUTOR: DANTE AMSTALDEN VON ZUBEN

COAUTOR: HINDIAEL AERAF BELCHIOR

COAUTOR: ALAN MICHEL BEZERRA FURTUNATO

ORIENTADOR: BRUNO LOBAO SOARES

TÍTULO: ANÁLISE DA FORMA DE ONDA THETA HIPOCAMPAL DURANTE CORRIDAS EM ESTEIRA COM VELOCIDADE CONTROLADA

Resumo

Os ritmos theta (6–12 Hz) são cruciais para a sincronização da atividade dos neurônios no circuito trissináptico do hipocampo. Durante o deslocamento no espaço, tais ritmos se correlacionam fortemente com a velocidade do movimento, o que sugere sua participação na integração sensorio-motora ajustada pela velocidade. Contudo, estudos recentes divergem sobre se as oscilações theta são mais influenciadas pela aceleração ou pela velocidade de corrida momentânea. Além disso, o papel exato desses ritmos na integração sensorio-motora no hipocampo continua sendo um tema de debate. Neste trabalho, nosso objetivo é investigar como o movimento em velocidades constantes e aceleradas impacta a forma de onda das oscilações theta no hipocampo, utilizando uma análise ciclo a ciclo desses ritmos.

Palavras-chave: hipocampo; ritmo theta; onda cerebral; simetria de onda; corrida; exe

TITLE: HIPPOCAMPAL THETA WAVEFORM ANALYSIS DURING CONTROLLED
TREADMILL RUNNING

Abstract

Theta oscillations (6–12 Hz) play a key role in coordinating neural activity within the hippocampal trisynaptic circuit. During spatial navigation, these oscillations show a robust correlation with locomotion speed, highlighting their potential involvement in speed-dependent sensorimotor integration. However, recent research presents conflicting views on whether theta rhythms are primarily influenced by the magnitude of acceleration or instantaneous running speed, while the precise role of hippocampal theta oscillations in sensorimotor integration remains debated. Here, we sought to investigate how locomotion at constant and accelerated speeds affects the waveform shape of hippocampal theta oscillations. To achieve our aim, we employed a cycle-by-cycle analysis of the hippocampal theta oscillations.

Keywords: hippocampus; theta rhythm; brain wave; wave symmetry; running; exercis

Introdução

As oscilações dos potenciais locais de campo (LFPs) fornecem pistas cruciais para o entendimento da dinâmica de grandes populações de neurônios (Buzsáki 2012). No hipocampo, uma das oscilações mais proeminentes no estudo dos ritmos cerebrais ocorre na frequência do Theta (6–12 Hz), que vem sendo constantemente associado à memória de trabalho, busca de objetivos e navegação (Buzsáki 2005). Tais oscilações também têm sido correlacionadas à percepção do ambiente; capacidades cognitivas e sono, especificamente ao período do sono onde ocorre o movimento rápido ocular (REM), em um processo que é considerado crucial para o aprendizado e consolidação de memórias (Buzsáki 1985). Em roedores o movimento, que pode ser linear, circular ou em mesmo pulos (Hanslmayr et al. 2007; Klimesch 1999), é um dos principais fatores moduladores do theta hipocampal. Tipicamente a informação contida nos LFPs é decodificada através de técnicas no domínio da frequência, que requerem uma regulação entre diversos ciclos de oscilação. Tais métodos são capazes de fornecer informações significativas sobre ondas cerebrais, tanto em estádios fisiológicos normais quanto em estados patológicos, onde podem ser detectadas aberrações nas análises das oscilações (Cunningham et al. 2006)

No entanto, as técnicas predominantes no estudo destas oscilações são baseadas principalmente nas análises de Fourier e de Hilbert, que assumem sinais cerebrais como sendo compostos por uma soma de ondas sinusoidais estacionárias

muito embora alguns ritmos sejam definidos como não-sinusóides por natureza, especialmente o theta hipocampal (Buzsáki et al. 1985), podendo variar em frequência, amplitude e forma da onda. Portanto, análises usuais, apesar de representarem um conjunto ferramental imprescindível no estudo de ritmos cerebrais e de sua relação com estados comportamentais, ficam sujeitas a resultados artefactuais, como a detecção de pareamento cross-frequency onde não há interações presentes entre as frequências (Cole et al. 2017). Sabendo que informações relativas a estados fisiológicos basais ou patológicos codificados nas oscilações não-sinusóides podem não ser estimados nas análises mais habituais (Bartz 2019), faz-se necessário a utilização de um método de quantificação das características da onda no domínio do tempo.

Metodologia

2.1 Animais

Utilizamos cinco ratos Wistar machos adultos (3 meses de idade; 350-450 g) fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Após a implantação dos eletrodos, os ratos foram alojados individualmente em caixas transparentes de Plexiglass (19 x 12 x 7 cm) e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes acesas às 6h), com comida e água ad libitum. Os experimentos foram realizados entre 16h e 20h. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRN, licença nº 52/2016) e estavam em conformidade com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition (National Research Council, 2011).

2.3 Eletrodos

Sinais eletrofisiológicos das áreas CA1, CA3 e DG do hipocampo dorsal foram registrados usando arranjos de 16 microeletrodos. Esses arranjos foram construídos como dois feixes de 1x8, com uma separação de profundidade intereletrodo de 200 μ m, e foram projetados para

atingir bilateralmente o hipocampo dorsal nas coordenadas estereotáxicas $-3,6$ mm AP e $\pm 3,0$ mm ML (Paxinos e Watson, 2009). Os métodos detalhados para fabricação e implantação desses arranjos de microeletrodos são fornecidos em Neves et al. (2022).

2.4 Protocolo Experimental

Utilizamos uma esteira elétrica (AVS Projetos, 40 x 13,5 cm) equipada com uma grade metálica traseira capaz de aplicar choques elétricos leves (0,1 - 0,7 mA a 60 Hz, por até 1 segundo) para evitar que os animais saíssem da esteira durante a habituação e o treinamento. A operação da esteira foi controlada por um Arduino Uno, e sua saída foi registrada como entradas TTL (transistor-transistor logic).

Os animais foram inicialmente habituados ao manuseio pelo pesquisador e ao aparelho da esteira por 3 dias. No primeiro dia, os ratos foram colocados na esteira por 30 minutos com a função de choque elétrico e a esteira desativadas. Em seguida, no segundo dia, a função de choque elétrico foi ativada e a esteira permaneceu desligada. No terceiro dia, os ratos caminharam na esteira em baixa velocidade (< 10 cm/s) por 5 minutos após 30 minutos de habituação. O experimento foi projetado para que os ratos corressem na esteira com acelerações controladas ($A1 = 1$ cm/s², $A2 = 1,5$ cm/s², $A3 = 2$ cm/s²) ou velocidades constantes ($S1 = 20$ cm/s, $S2 = 30$ cm/s, $S3 = 40$ cm/s) na seguinte sequência: A1, A2, A3, S1, S2, S3. A sequência de 6 tipos de tentativas foi então repetida 8 vezes. As tentativas de corrida duraram 20 segundos e foram intercaladas por intervalos de descanso de 5 segundos. O Rato 1 realizou uma sessão, enquanto os Ratos 2, 3, 4 e 5 executaram quatro sessões de gravação cada, totalizando 17 sessões. Assim, cada tentativa (três de aceleração fixa e três de velocidade constante) foi registrado um total de 136 vezes.

2.5 Coleta de dados Análise

Como variações inter-hemisféricas podem indicar a especialização funcional de áreas cerebrais, em nossas análises, apenas diferenças significativas observadas em ambos os hemisférios de uma dada região foram consideradas.

A atividade eletrofisiológica intracraniana contínua foi registrada usando um pré-amplificador headstage acoplado por fio, conectado a um sistema multicanal (RHA2116, Intan Technologies). Sinais brutos passaram por amplificação de 200x, filtragem bandpass (0,02 Hz - 20 kHz) e amostragem de 30 kHz. Essas gravações eletrofisiológicas foram sincronizadas com as entradas TTL da esteira e armazenadas para análise posterior. Uma câmera digital de alta definição (Logitech C920, 1080 x 720 pixels a 30 quadros/s), posicionada perpendicularmente à esteira, capturou o vídeo do Rato 1.

A análise da simetria da forma de onda das oscilações theta hipocampais foi realizada em Python usando a toolbox ByCycle (Cole e Voytek, 2019). Essa abordagem no domínio do tempo consistiu nas seguintes etapas: Primeiro, obtivemos os picos, vales e as fases de ascensão e decaimento de ciclos theta individuais, determinando os cruzamentos de zero a partir de um sinal LFP (potencial de campo local) filtrado na banda theta (6-12 Hz). Em seguida, o máximo e o mínimo locais entre cruzamentos de zero adjacentes foram obtidos de um sinal LFP filtrado

Resultados e Discussões

Ao contrastar corridas em velocidades constantes, notamos que o ciclo theta se encurtava (diminuindo seu período) conforme a velocidade aumentava. Em contrapartida, a duração do ciclo não foi afetada por diferentes níveis de aceleração em testes de velocidade crescente.

Em velocidade constante, a assimetria pico-vale aumentou nas regiões DG e CA1, o que correspondeu a uma fase de pico mais curta em DG e a uma fase de vale mais breve em CA1. Adicionalmente, a assimetria ascensão-decaimento no CA1 também se elevou com o aumento da velocidade, devido a uma fase de ascensão mais rápida.

Resultados parecidos surgiram nos ensaios com aceleração. A assimetria pico-vale aumentou tanto em DG quanto em CA1, explicada por uma redução no tempo de pico (DG) e no tempo de vale (CA1). No entanto, diferentemente da velocidade constante, o aumento na assimetria ascensão-decaimento durante a aceleração foi significativo apenas no CA1 direito, sendo que essa alteração também se relacionou a uma fase de ascensão mais curta nesta região.

Conclusão

Aumentos na velocidade de corrida, bem como na aceleração da corrida, levam a aumentos na assimetria pico-vale e ascensão-decaimento nas áreas DG e CA1 quando comparados entre os ensaios de corrida. Nossa correlação mostrou que a assimetria pico-vale e ascensão-decaimento reduz ao longo do tempo de corrida na área CA3. Esses achados destacam que a simetria da forma de onda theta exibe diferenças específicas de acordo com as subáreas hipocâmpais e conforme a dinâmica temporal da atividade de corrida.

Esses resultados são consistentes com relatos anteriores na literatura, visto que um encurtamento do período indica um aumento na frequência theta, o que era esperado para a comparação entre diferentes velocidades constantes. Esperamos que pesquisas futuras possam elucidar os efeitos da aceleração na forma da onda theta.

Referências

BARTZ, S. et al. Analyzing the waveshape of brain oscillations with bicoherence. *NeuroImage*, v. 188, p. 145–160, mar. 2019.

BUZSÁKI, G. Theta rhythm of navigation: Link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*, v. 15, n. 7, p. 827–840, 2005.

BUZSÁKI, G.; MOSER, E. I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience*, v. 16, n. 2, p. 130–138, 28 jan. 2013.

BUZSÁKI, G.; RAPPELSBERGER, P.; KELLÉNYI, L. Depth profiles of hippocampal rhythmic slow activity (“theta rhythm”) depend on behaviour. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, v. 61, n. 1, p. 77–88, jul. 1985.

COLE, S. R. et al. Nonsinusoidal Beta Oscillations Reflect Cortical Pathophysiology in Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 18, p. 4830–4840, 17 abr. 2017.

COLE, S. R.; VOYTEK, B. Brain Oscillations and the Importance of Waveform Shape. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 21, n. 2, p. 137–149, fev. 2017.

COLE, S.; VOYTEK, B. Cycle-by-cycle analysis of neural oscillations. *Journal of Neurophysiology*, v. 122, n. 2, p. 849–861, 1 ago. 2019.

GERBER, E. M. et al. Non-Sinusoidal Activity Can Produce Cross-Frequency Coupling in Cortical Signals in the Absence of Functional Interaction between Neural Sources. *PLoS ONE*, v. 11, n. 12, p. e0167351–e0167351, 12 dez. 2016.

HANSLMAYR, S. et al. Prestimulus oscillations predict visual perception performance between and within subjects. *NeuroImage*, v. 37, n. 4, p. 1465–1473, out. 2007.

KENNEDY, J. P. et al. A Direct Comparison of Theta Power and Frequency to Speed and Acceleration. *Journal of Neuroscience*, v. 42, n. 21, p. 4326–4341, 25 maio 2022.

KLIMESCH, W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Research Reviews*, v. 29, n. 2-3, p. 169–195, abr. 1999.

KROPFF, E. et al. Frequency of theta rhythm is controlled by acceleration, but not speed, in running rats. *Neuron*, v. 109, n. 6, p. 1029–1039.e8, mar. 2021.

NEVES, L. et al. Theta and gamma oscillations in the rat hippocampus support the discrimination of object displacement in a recognition memory task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 21 dez. 2022.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam ; Boston ; London: Elsevier/Academic, 2009.

UHLHAAS, P. J.; SINGER, W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 11, n. 2, p. 100–113, fev. 2010.

CÓDIGO: SB0782

AUTOR: GABRIELLE SOUSA FERNANDES

ORIENTADOR: VIVIANE SOUZA DO AMARAL

TÍTULO: Avaliação da susceptibilidade genética às doenças respiratórias crônicas malignas e não-malignas na população de Lajes Pintadas

Resumo

O radônio, um elemento radioativo extremamente tóxico, deriva do decaimento de outros dois elementos que são o urânio e o tório. Alguns estudos recentes e evidências catalogadas de hospitais, apresentaram que um município no interior do Rio Grande do Norte, apresenta um alto nível de radiação proveniente de grandes concentrações rochosas que contém os dois elementos precursores do radônio. Seu grande aumento apresentou uma alta taxa de câncer de pulmão neste município, quando comparado com cidades mais distantes e com maiores população se obteve um número espantoso de diferença presente. Outras doenças não cancerígenas apresentaram um grau de aparecimento nesse município, como por exemplo a DPOC. Portanto o objetivo deste trabalho é analisar as influências do radônio em outras doenças respiratórias além do câncer de pulmão, observando sua ação em metilação de genes relacionados com problemas inflamatórios no pulmão.

Palavras-chave: radônio; câncer de pulmão; DPOC; epigenética; saúde pública

TITLE: Assessment of genetic susceptibility to malignant and non-malignant chronic respiratory diseases in the population of Lajes Pintadas

Abstract

Radon, an extremely toxic radioactive element, derives from the decay of two other elements, uranium and thorium. Some recent studies and catalogued evidence from hospitals have shown that a municipality in the interior of Rio Grande do Norte has high levels of radiation from large rock concentrations containing the two precursor elements of radon. Its significant increase has led to a high rate of lung cancer in this municipality, and when compared to more distant cities with larger populations, the difference in numbers is staggering. Other non-cancerous diseases have also appeared in this municipality, such as COPD. Therefore, the objective of this study is to analyze the influence of radon on other respiratory diseases besides lung cancer, observing its action in the methylation of genes related to inflammatory problems in the lungs.

Keywords: radon; lung cancer; COPD; epigenetics; public health

Introdução

A radiação é um tipo de energia que é propagada na forma de ondas eletromagnéticas ou partículas. A luz visível, um exemplo, juntamente com o micro-ondas, sinais de transmissão

para a televisão e até mesmo rádio são alguns exemplos desse tipo de radiação, porém eles não possuem uma capacidade suficiente de interagir com a matéria a nível atômico. Um exemplo de radiação que pode realizar esse processo é a radiação ionizante, que apresenta em sua composição uma frequência e comprimento de onda menor onde a mesma apresenta a capacidade de ejetar elétrons de átomos que são alvos quando passam a interagir com a matéria transformando-os em íons (WNA,2016). A exposição do ser humano a radiação é algo inerente a nossa existência, já que ela vem de exames, aparelhos eletrônicos, entre outros. A maior fonte de radiação a qual o ser humano é exposto é ao meio ambiente, cerca de 50% é proveniente dela, em segunda lugar observamos a exposição a procedimentos médicos que aumentaram nas últimas décadas com o avanço da ciência (NCRP,2017).

No nordeste brasileiro no estado do RN (Rio grande do norte) possui um município chamado de Lajes Pintada que vem atraindo muito a atenção de pesquisadores que envolvem a geologia do local. Esse município ele se envolveu ao longo dos anos em uma região geologicamente muito antiga que se localiza na microrregião da borborema potiguar que está formada por rochas da era pré-cambriana como por exemplo granito, migmatitos, pegmatitos, entre outros, e nesse tipo de rocha observamos a presença de traços do urânio e tório na constituição das mesmas nas formações rochosas da região (CPRM, 2006). Além disso, em algumas pesquisas se verificou que as concentrações de radônio interior nessa cidade ultrapassam os limites estabelecidos pela OMS que é de 100 Bq/m³ (CAMPOS et al., 2013; OMS, 2009).

A doença pulmonar obstrutiva crônica se caracteriza como uma doença pulmonar inflamatória que é muito importante para a saúde pública. A DPOC é uma doença que tem caráter genético ambiental, e pode ser influenciada por diversos fatores, se apresentando como uma doença heterogênea. A grande maioria dos casos de DPOC são atribuídos ao tabagismo, porém recentemente foi descoberto que outros fatores ambientais podem influenciar no aparecimento e agravamento dessa doença. Como se trata de uma doença genética ambiental, podemos subentender que partículas que sejam possíveis agentes desencadeadores dessa doença no ar influenciam no desenvolvimento dela. Dessa forma, a pesquisa sobre a liberação de níveis altos de radônio interno pode ser um princípio de aparecimento dessas doenças em pessoas não tabagistas (Guimarães et al, 2024).

O presente trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento científico sobre os efeitos da radiação natural e investigar suas possíveis implicações na saúde humana, considerando tanto os mecanismos celulares e moleculares envolvidos quanto os impactos epidemiológicos

Metodologia

Para que a medição de radônio seja realizada no município de estudo serão feitas utilizando detectores do tipo elétrico de curto e longo período da RADELEC INC. Os participantes serão a população urbana e rural do município, como também iremos adicionar pessoas que têm o diagnóstico de DPOC, e indivíduos de Natal/RN que serão utilizados como grupo controle. Serão excluídos da pesquisa indivíduos que são fumantes ou que tenham sido expostos a radiação por meio de exames médicos nos últimos 12 meses a partir da realização dessa pesquisa. Para o perfil demográfico da pesquisa, todos os participantes passaram por um questionário que iriam abordar principais perguntas que são vistas em questionários bases de pesquisa como: estilo de vida, histórico médico e habitação (tipo de residência e material de construção).

Para que seja descoberto quais susceptibilidades genéticas tendem a desenvolver doenças respiratórias crônicas pela presente exposição ao radônio serão estudados o polimorfismo dos seguintes genes: XRC3, EGFR, NSCLS, e GST. O DNA genômico dos indivíduos usados será obtido por meio de coleta de sangue periférico e acondicionado em tubos contendo EDTA, utilizando o kit QIAmp DNA Blood Mini (Qiagen). Após a coleta dessas amostras será feita uma eletroforese gel de agarose a 0,8% em TBE pH 8,0, corado com o corante GelRed (Biotium) e foto-documentadas pelo sistema Gel DocTM XR+ (BioRad) com o software de captura de imagem Image LabTM Software versão 5.1. A quantificação do DNA será realizada por espectrofotometria a 260 nm e a pureza do DNA determinada pela relação A260/A280 utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo). Testes estatísticos como qui-quadrado, Mann-Whitney foram utilizados para comparar as amostras e correlacionar os fenótipos, e serão levados em conta apenas os resultados cujos níveis descritivos (valores de P) forem inferiores a 0,05.

Após o tratamento das amostras serão realizados experimentos in vitro para ver o processo de metilação e a alteração na expressão gênica de microRNAs. No cultivo celular foram utilizadas fibroblastos do pulmão humano obtidos do repositório Genético de Células do Instituto Coriell para Pesquisas Médicas (Camden, Nova Jersey, Estados Unidos). As células, na passagem 13, serão cultivadas em meio essencial mínimo alfa (MEM α), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de antibióticos (mistura de 100 U/mL de penicilina mais 100 μ g/mL de estreptomicina). As culturas serão mantidas em incubadoras a 37°C com 5% CO₂, e após atingirem uma quantidade suficiente serão coletadas por meio de tripsina diluídas em meio de cultura e semeadas em placas de aço inoxidável personalizadas, possuindo diâmetro interno de 36 mm, cujo fundo é formado por uma camada substituível de polietileno tereftalato – conhecida como “Mylar” – a qual possui 1,5 μ m de espessura. Elas ficaram nessas placas por um total de 11 dias.

O processo de radiação será conduzida em uma câmara personalizada mantida a 37°C com atmosfera de 5% CO₂, onde abriga o irradiador que consiste nos principais componentes: discos de Am-241, a fonte emissora das partículas α ; sistema de rotação; colimador; delimitador do feixe de radiação e janela de saída; sistema eletrônico de obturador e uma película de Mylar para suportar a cultura de células (NETI et al., 2004). O processo de irradiação vai ocorrer pelo baixo das placas de cultivo e quando as partículas alfa atingirem uma energia média de 3,7 MeV (TLE de 109 keV/ μ m), as células irão receber uma taxa de dose absorvida média de 2 cGy/min em 3 doses diferentes de 0,25, 0,5 e 1 Gy e para cada será utilizada 3 placas triplicatas de células.

No processo de metilação global da sequência LINE-1 serão realizadas extração de DNA dos sedimentos após irradiação, modificação do DNA genômico por bissulfito; reação em cadeia da polimerase para a região específica de interesse, no caso o promotor de L1, e por fim, o pirosequenciamento. Já para a análise do programa será obtido a %CM em 4 posições diferentes na região promotora de LINE-1, como também será realizada uma ANOVA para saber se houve variação nas distintas doses absorvidas. Para os lisados celulares que seriam obtidos no final de cada tempo de irradiação serão usadas colunas de separação de RNA totais do kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante, e as concentrações de qualidade serão obtidas por meio de um espectrofotometria.

A integridade e quantificação do material genético obtido serão avaliadas por espectrofotometria a 230, 260 e 280 nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A260/A280 e A260/230 utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo). A reação de metilação realizada pela polimerase será avaliada por meio do perfil de metilação presente na região promotora dos genes TSLC1, EGFR, MGMT e CDKN2A. já que os mesmos estão presentes em situações agravantes de células pulmonares. Para análise e comparação dos resultados do grupo controle e o grupo de estudo será por meio do teste ANOVA. Os protocolos seguidos para realização das atividades supracitadas serão: os protocolos descrito por (a) Jansen et al. (2002), para a avaliação da metilação no gene TSLC1; (b) Nakamura et al. (2001) para o gene MGMT; (c) Scartozzi et al. (2011) para o gene EGFR e (d) To et al. (2002) para o gene CDKN2A. Controles positivos (Human EpiTect Control DNA).

Resultados e Discussões

A radiação natural ou ionizante ela se transmite por meio de elementos químicos que existem no solo, água, ar e que apresentem um núcleo atômico pesado e instável, dessa maneira para que consiga atingir a estabilidade é necessária liberação de energia, a qual presente em elementos como urânio, rádio, polônio e outros, dessa forma esses elementos foram denominados elementos radioativos ou radionuclídeos, e essa característica de liberar energia na forma de radiação de chama de radioatividade (L'ANNUZIATA, 2026).

Quando o elemento radioativo passa a emitir radiação ocorre uma variação no número de prótons no núcleo, onde conseqüentemente acaba transformando ele em outro elemento que possui propriedade distinta, esse processo de transformação é conhecido como decaimento radioativo e costuma acontecer com frequência para cada elemento. Para acompanhar a presente sanção de cada subproduto que é gerado com decaimentos sucessivos determinou o padrão de meia-vida de cada elemento. Já para saber a atividade de um material radioativo podemos expressar pela razão entre o número médio de transformações nucleares espontâneas e o intervalo de tempo decorrido, onde o mesmo acaba sendo medido pela unidade de Becquerel (Bq) (TAUHATA et al., 2014).

Existem 3 tipos de radiação ionizante (RI), temos as partículas alfa, beta e gama, a partícula alfa se caracteriza por ser carregada positivamente, e quando comparada com outras RI ela possui uma maior energia porém um baixo poder de penetração na matéria. já a radiação beta ela costuma aparecer com teor núcleo com excesso de nêutrons e o mesmo transforma em neutro em um próton e um elétron ou quando o núcleo apresenta excesso de cargas positivas e transforma um próton em um neutro onde o mesmo emite um pósitron. Por último os raios gama que são ondas eletromagnéticas excedentes que são liberadas pelo núcleo quando o mesmo ainda se encontra em seu estado excitado mesmo quando passa por um processo de decaimento alfa e precisou voltar para seu estado fundamental (L'ANNUNZIATA, 2016).

Quando as partículas RI elas liberam energia, essa energia nem sempre é absorvida, pois depende muito do tipo de matéria ao qual essas partículas estão sendo direcionadas e a maneira como elas estão interagindo. Já quando estamos falando de energia absorvida pelas células do corpo é capaz de agir diretamente quebrando ligações químicas das moléculas. Essa interação com as células do corpo também podem vir de maneira indireta por meio da radiólise da água, onde quando ingerida ela pode oxidar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Com isso essas ações em conjunto acabam provocando alterações bioquímicas que

iniciam uma serie de cascaastas de sinalização moleucar onde tem como principal função remediar o dano causado a célula, ou no pior dos casos levava-lá a morte celular (AZZAM et al., 2012; REISZ et al., 2014).

Quando se analisa de forma local a energia liberada por um meio por meio de uma partícula radioativa ao longo de uma determinada distância, tem-se uma propriedade chamada e transferência linear de energia (TLE). desta maneira, ao observar uma relação onde uma radiação que possui uma certa energia e um curto alcance em um meio vai gerar elevados valores de TLE quando comparada com uma radiação da mesma energia porém com um espaço maior de alcance, estando no mesmo meio. Com isso a radiação ao percorrer a matéria alvo acaba deixando uma espécie de rastro. (L'ANNUNZIATA, 2016;ZHANG et al., 2012).

Dessa forma radiações que possuem uma alta TLE elas possuem a capacidade de depositar maiores quantidade de energia a cada unidade de comprimento da matéria, além de apresentarem uma maior probabilidade de ocasionar múltiplas lesões que se apresentam densamente agrupadas (ZHANG et al., 2012; MOORE; STANLEY; GOODARZI, 2014).

Durante muitos anos os efeitos que o RI, que seriam lesão no tecido e danos aos DNA, foram amplamente aceitos, desde que as células fossem atingidas no núcleo por essa radiação, dessa forma o dano no DNA ocorre logo depois dele sofrer a ação dessa radiação. porém no final do século XX, alguns dados importantes acabaram sendo descoberto, la alvo tabpem passaram a apresentar alterações ioquimicas, e essas alterações, esses feitos receberam o nome de efeitos não direcionados. esses efeitos ocorrem por meio das junções celulares e por meio também liberação de fatores solúveis no meio em que as células foram atingidas, esse sinais enviados e transmitidos geram importantes alterações no metabolismo oxidativo nessas células vizinhas afetadas, como por exemplo o aumento de espécies reativas de oxigênio, como também a presença de instabilidade genômica como quebras no DNA, trocas de cromátides, formação de micronúcleos e outros. essas alterações além de serem vistas nas células atingidas e em suas vizinhas, também foram observadas em suas células filhas, de ambas as situações (JIANG et al., 2014; YIN et al., 2015; FLUNKERT et al., 2018; HEERAN et al., 2020).

Outra maneira de se ter uma mudança na expressão gênica é por meio da epigenética, pode não apresenta dano ao DNA, onde se tem uma relação entre genotipo e fenotipo que configura a mudança do cenário final de um locus ou cromossomo sem ter que haver mudança no DNA. (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). Essas alterações no genoma podem passar por 3 categorias: modificações pós-traducionais em histonas, atuação de RNA não-codificantes e metilação do DNA, sendo este último o alvo do presente estudo.

O processo de metilação do DNA é a marca principal da epigenética mais amplamente estudada, onde se tem o envolvimento da transferência covalente de um grupo metil para o carbono 5' das citocinas. Essa metilação de citosinas ocorre na sua grande maioria nas regiões do genoma chamadas de ilhas CfG, as quais representam dinucleotídeos de citosina ligada à guanina pela ligação fosfodiéster. Essas ilhas estão presentes em promotores gênicos, e sua hipermetilação causa uma diminuição da expressão gênica e sua hipometilação está relacionada diretamente com a expressão aumentada de genes (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

O perfil de metilação do DNA é herdado, porém ele pode ser alterado de acordo com a exposição ambiental do indivíduo como também pelo seu estilo de vida. Ainda seguindo a

epigenética existem alguns elementos nucleares longos e interestaços 1 chamados de L1 que são utilizados como marcadores de metilação global, já que apresentam cerca de 17% do genoma com aproximadamente 500 mil cópias, essas sequências elas são repetitivas e transponíveis no enormes e se denominam de retrotransposons e a sequência L1 é o único elemento repetitivo autônomo e ativo nos seres humanos (YANG et al., 2004; BECK et al., 2011;(ARDELJAN et al., 2017). essas sequências em sua maioria se apresentam silenciadas no genoma por meio dos mecanismos epigenéticos, especialmente por um número grande de ilhas CfG da RNT-5', e essa configuração ocorre aparece justamente para que não ocorra a retrotransposição dessas sequências para outros gene e regiões regulatórias importantes pois pode ocorrer uma instabilidade genômica ou até uma transformação para um fenótipo cancerígeno como também pode resultar em outras doenças (MIOUSSE; KOTURBASH, 2015; XIAO-JIE et al., 2016; LANGE et al., 2012; BECK et al., 2011).

Essa relação do radônio com causas de câncer foram observadas inicialmente em trabalhadores de minas de extração de urânio há alguns séculos atrás, onde a concentração de radônio costumavam ser bem mais elevados. na década de 50 alguns pesquisadores passaram a perceber que esses mineiros não eram os únicos prejudica espelho radônio, onde posteriormente em pesquisas na américa do norte e europa conseguiram comprar e estabelecer uma relação entre a exposição do rádio interior aumentava em 10% o risco de desenvolver câncer de pulmão. A EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana), estima que a exposição a radônio interior é a principal, causa de câncer de pulmão, ficando atrás apenas de pessoas fontes, mas para não fumantes se coloca como primeira causa (APKIN, 2014; SAMET, 2011;DARBY et al., 2005; KREWSKI et al., 2005;EPA, 2019).

Por causa desse valor alto de câncer de pulmão a sua exposição, muitos países tratam como uma preocupação de saúde básica e muitos países têm colocado medidas de controle de mitigação de exposição a este gas, além de disponibilizarem informações sobre ele para a população como também os devidos cuidados (EPA, 2019).No brasil nao se existem medidas concretas sobre o controle para a esse gás, porém certos esforços têm sido feitos para caracterizar o risco da alta exposição e futuramente criar um mapa que mostre de níveis do radônio no brasil. (DANTAS et al. 2019; SILVA et al., 2014).

No nordeste basiliro no estado do RN (Rio grande do norte) possui um município chamado de Lajes Pintada que vem atraindo muito a atenção de pesquisadores que envolvem a geologia do local. O município de Lajes Pintada só foi reconhecido oficialmente como um município em 31 de dezembro de 1958, ele se situa na mesma região agreste potiguar onde está localizado a 136 km da capital Natka. Possui limites com os municípios de São Tomé, Santa Cruz e Campo Redondo. Apresenta uma área de 130 Km² e conta com uma população de 4.787 habitantes segundo o último censo de 2022 (IBGE,2022).

Esse município ele se envolveu ao longo dos anos em uma região geologicamente muito anitta que se localiza na microrregião da borborema potiguar que está formada por rochas da era pré-cambriana como por exemplo granito, migmatitos, pegmatitos, entre outros, e nesse tipo de rocha observamos a presença de traços do urânio e tório na constituição das mesmas nas formações rochosas da região (CPRM, 2006). Além disso, em algumas pesquisas se verificou que as concentrações de radônio interior nessa cidade ultrapassam os limites estabelecidos pela OMS que é de 100 Bq/m³ (CAMPOS et al., 2013; OMS, 2009).

De acordo com dados do INCA, lajes pintada possui uma taxa de 9,72 para mortalidade por câncer de pulmão ajustada a 100 mil habitante em relação à população brasileira, e quando comparada com Natal (capital do estado) que chega às 12,22, com isso observamos que a taxa é muito alta em lajes pintada já que sua população é quase 100 vezes menor que a da capital natal (INCA, 2019).

Por causa das características geológicas do município ele pode ser considerada um local de alta taxas de mortalidade de câncer pulmonar, como foi observada nas últimas décadas, e foram investigadas o efeito de RI natural na presença demora utilidade e reprodução de micro crustáceos, como também o possível efeito genotóxico em *D. melanogaster*. aproveitou o momento de pesquisa e também foram averiguar outros municípios que estão próximos e foi verificado no município de Lucrécia que em açudes subterrâneos apresentavam níveis bem altos de radioatividade de partículas alfa e beta, foram encontrados tbm metais pesado e cianobactérias em comparação com a cidade de Natal. Em células dos peixes do açude foram visto micronúcleos como algumas alterações nucleares, e essas alterações foram vistas também em células da mucosa bucal de humanos e em linfócitos cultivados em in vitro em moradores do município. Esses achados também foram achados na mesma situação quando analisadas no município de Parelhas (DANTAS et al., 2013; VERÇOSA et al., 2017; MARCON et al. 2010; GARCIA et al. 2011; MARCON et al. 2017; CHAVES et al. 2016).

Conclusão

Dessa forma, observamos que a conclusão desse trabalho não é algo concreto nem retilíneo, por é necessário anos e anos de estudo e pesquisa nessa região para garantir que tenhamos uma abordagem concreta e firmada para se obter definitivamente a resposta de como esse elemento afeta de maneira significativa outras doenças respiratórias, e não apenas relacionado ao câncer.

Referências

- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 8, p. 487–500, 27 jun. 2016.
- APKIN, R. Social Security and Public Health: is Radiation a Threat or a Benefit?. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, v. 149, p. 59-64, 2014.
- ARDELJAN, D. et al. The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clinical Chemistry*, v. 63, n. 4, p. 816–822, 1 abr. 2017.
- AZZAM, E. I.; JAY-GERIN, J.-P.; PAIN, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*, v. 327, n. 1-2, p. 48–60, dez. 2012.
- BAKER, J. E.; MOULDER, J. E.; HOPEWELL, J. W. Radiation as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 7, p. 1945–1956, out. 2011.
- BECK, C. R. et al. LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 12, n. 1, p. 187–215, 2011.
- CAMPOS, T. F. C. et al. O gás radônio e a radiação natural em terrenos metagraníticos e pegmatíticos: o caso do município de Lages Pintadas (Rio Grande do Norte, Brasil). *Revista de Geologia*, v. 26, n. 2, p. 45-52, 2013.
- CHAVES, L. C. C. et al. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic

- ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 7572-7581, 2016.
- COLLIGNAN, B.; LE PONNER, E.; MANDIN, C. Relationships between indoor radon concentrations, thermal retrofit and dwelling characteristics. *Journal of Environmental Radioactivity*, v. 165, p. 124–130, dez. 2016.
- DANTAS, R. C. et al. Natural radioactivity in Brazil: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 143-157, 2020.
- DANTAS, S. R. C. et al. Uso da Ecotoxicologia na Investigação da Toxicidade Associada à Radiação Natural no Açude Riacho da Cachoeira, Região do Semiárido/Brasil. *Revista de Geologia*, v. 26, n. 2, p. 109-119, 2013.
- DARBY, S. et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*, v. 330, n. 7485, p. 223, 2004.
- FLUNKERT, J. et al. Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, v. 370, n. 2, p. 322–332, 2018.
- GARCIA, A. C. F. S. et al. Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 13, p. 3329-3335, 2011.
- GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 635–638, 2007.
- GRUBER, V. et al. The European map of the geogenic radon potential. *Journal of Radiological Protection*, v. 33, p. 51-60, 2013.
- HAMZA, V. Z. et al. A simple method to irradiate blood cells in vitro with radon gas. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 130, n. 3, p. 343–350, 2008.
- HEERAN, A. B. et al. Radiation-induced Bystander Effect (RIBE) alters mitochondrial metabolism using a human rectal cancer ex vivo explant model. *Translational Oncology*, v. 14, n. 1, p. 100882, 2021.
- Instituto Nacional de Câncer. Atlas On-line de Mortalidade. Disponível em <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo06/consultar.xhtml>> Acessado em novembro de 2024.
- JIANG, Y. et al. The role of TGF- β 1–miR-21–ROS pathway in bystander responses induced by irradiated non-small-cell lung cancer cells. *British Journal of Cancer*, v. 111, n. 4, p. 772–780, 2014.
- KOTURBASH, I. et al. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v. 66, n. 2, p. 327-330, 2006.
- KREWSKI, D. et al. Residential Radon and Risk of Lung Cancer: A Combined Analysis of 7 North American Case-Control Studies. *Epidemiology*, v. 16, n. 2, p. 137- 145, 2005.
- L'ANNUNZIATA, M. F. Radioactivity - Introduction and History, From the Quantum to Quarks. 2a edição. Elsevier, 2016.
- LANGE, N. E. et al. Alu and LINE-1 methylation and lung function in the normative ageing study. *BMJ Open*, v. 2, n. 5, p. e001231, 2012.
- LENG, S. et al. Genetic variation in SIRT1 affects susceptibility of lung squamous cell carcinomas in former uranium miners from the Colorado plateau. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 5, p. 1044–1050, 2013.
- LITTLE, M. P. et al. Review and meta-analysis of epidemiological associations between low/moderate doses of ionizing radiation and circulatory disease risks, and their possible mechanisms. *Radiation and Environmental Biophysics*, v. 49, n. 2, p. 139–153, 2010.
- MARCON, A. E. et al. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of

cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere*, v. 81, n. 6, p.773-780, 2010.

MARCON, A. E. et al. Mutagenic potential assessment associated with human exposure to natural radioactivity. *Chemosphere*, v. 167, p. 36-43, 2017.

MARTIN, E. M.; FRY, R. C. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annual Review of Public Health*, v. 39, n. 1, p. 309–333, 2018.

MIOUSSE, I. R.; KOTURBASH, I. The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–8, 2015.

MOORE, S.; STANLEY, F. K. T.; GOODARZI, A. A. The repair of environmentally relevant DNA double strand breaks caused by high linear energy transfer irradiation – No simple task. *DNA Repair*, v. 17, p. 64–73, 2014.

NETI, P. V. S. V. et al. A Multi-port Low-Fluence Alpha-Particle Irradiator: Fabrication, Testing and Benchmark Radiobiological Studies. *Radiation Research*, v.161, p. 732-738, 2004.

NEUGEBAUER, T. et al. Radon emission rate and analysis of its influencing parameters. *Nukleonika*, v. 61, n. 3, p. 337-342, 2016.

Organização Mundial de Saúde (OMS). WHO handbook on indoor radon: a public health perspective. WHO Press, 2009.

REISZ, J. A. et al. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 21, n. 2, p. 260–292, 2014.

SILVA, N. C. et al. Towards a Brazilian radon map: consortium radon Brazil. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 160, n. 1-3, p. 226-230, 2014.

TAUHATA, L. et al. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Rio de Janeiro: 2014.

UK Health Security Agency. UK maps of radon. Disponível em: <<https://www.ukradon.org/information/ukmaps>>. Acessado em janeiro de 2018.

United States Environmental Protection Agency. Publications about Radon. Disponível em: <<https://www.epa.gov/radon/publications-about-radon>>. Acessado em outubro de 2024.

United States Environmental Protection Agency. Radionuclide Basics: Radon. Disponível em: <<https://www.epa.gov/radiation/radionuclide-basics-radon>> Acessado em dezembro de 2024.

United States Environmental Protection Agency. State Maps of Radon Zones. Disponível em: <https://www.epa.gov/radon/state-maps-radon-zones> Acessado em dezembro de 2024.

VAN LOON, B.; MARKKANEN, E.; HÜBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair*, v. 9, n. 6, p. 604–616, jun. 2010.

VERÇOSA, C. J. et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 141, p. 148-153, 2017.

Guimarães, Amanda, et al. DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC). 3 Mar. 2024, pp. 241-247, <https://doi.org/10.59290/978-65-6029-089-1.42>. Acessado em 28 de novembro de 2024

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rn/lajes-pintadas.html> . Acesso em: 28 jan. 2025.

CÓDIGO: SB0785

AUTOR: HANNA GABRIELA BEZERRA DE MACEDO TINOCO

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Impacto do efeito adjunto do Mindfulness no Manejo da Ruminação em Pacientes com Depressão Maior: Uma Avaliação Integrada de um Ensaio Clínico Aberto

Resumo

Introdução: O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é prevalente e incapacitante, frequentemente acompanhado pela ruminação, que agrava sintomas e dificulta a recuperação. Estratégias complementares, como o mindfulness, vêm sendo investigadas como adjuvantes à farmacoterapia. Métodos: Este estudo constituiu uma análise secundária de ensaio clínico aberto, randomizado e controlado, realizado com 88 participantes com TDM. Os grupos foram: farmacoterapia exclusiva (GC), farmacoterapia associada a exercício físico (GE) e farmacoterapia associada ao mindfulness (GM). O tratamento durou 12 semanas, sendo a ruminação avaliada pela Escala de Resposta Ruminativa – versão reduzida (RRS-VR). Resultados e discussão: Todos os grupos apresentaram redução significativa da ruminação ao longo do tempo ($p < 0,001$). O maior efeito foi observado no GM ($d = 1,30$), seguido de GC ($d = 0,96$) e GE ($d = 0,68$). Os achados reforçam a literatura que aponta o mindfulness como estratégia eficaz na modulação de padrões cognitivos disfuncionais, favorecendo resiliência cognitiva e emocional. Conclusão: A associação entre farmacoterapia e mindfulness mostrou impacto superior na redução da ruminação, representando uma abordagem promissora e integrativa no manejo do TDM, com potencial para ampliar desfechos clínicos.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior. Ruminação. Mindfulness. Farmacoterapia.

TITLE: Impact of the Adjuvant Effect of Mindfulness on Rumination Management in Patients with Major Depression: An Integrated Evaluation of an Open-Label Clinical Trial

Abstract

Introduction: Major depressive disorder (MDD) is prevalent and debilitating, often accompanied by rumination, which aggravates symptoms and hinders recovery. Complementary strategies, such as mindfulness, have been investigated as adjuncts to pharmacotherapy. Methods: This study was a secondary analysis of an open-label, randomized, controlled clinical trial conducted with 88 participants with MDD. The groups were: pharmacotherapy alone (CG), pharmacotherapy combined with physical exercise (EG), and pharmacotherapy combined with mindfulness (MG). The treatment lasted 12 weeks, with

rumination assessed using the Ruminative Response Scale – reduced version (RRS-VR). Results and discussion: All groups showed a significant reduction in rumination over time ($p < 0.001$). The greatest effect was observed in the MG ($d = 1.30$), followed by CG ($d = 0.96$) and EG ($d = 0.68$). The findings reinforce the literature that points to mindfulness as an effective strategy in modulating dysfunctional cognitive patterns, favoring cognitive and emotional resilience. Conclusion: The combination of pharmacotherapy and mindfulness showed a greater impact on reducing rumination, representing a promising and integrative approach to the management of MDD, with the potential to improve clinical outcomes.

Keywords: Major Depressive Disorder. Rumination. Mindfulness. Pharmacotherapy.

Introdução

A resiliência foi descrita como um processo multifatorial, envolvendo mecanismos biológicos, psicossociais e ambientais [c.f. (Ungar & Theron, 2020)], definido pela Associação Americana de Psicologia como “o processo e o resultado da adaptação bem-sucedida a experiências de vida difíceis ou desafiadoras, especialmente por meio da flexibilidade mental, emocional e comportamental e do ajuste às demandas externas e internas”. No modelo proposto por Tabibnia (2020), a resiliência pôde ser induzida atuando em três eixos: promoção da afetividade positiva e bem-estar, estimulando o sistema de recompensa; redução da afetividade negativa, tamponando os sistemas de resposta ao estresse e da amígdala; e transcendência do self, alcançada pelo engajamento com o momento presente e o desapego do devaneio e da ruminação, reduzindo a ativação da rede cerebral padrão.

A resiliência configurou-se, assim, como um processo dinâmico e ativo, resultante da interação entre fatores de risco e de proteção, importante para a promoção de saúde (Babić et al., 2020) e para o enfrentamento de transtornos psicopatológicos, como o transtorno depressivo maior (TDM) (Galvão-Coelho et al., 2015). O TDM representou uma condição altamente prevalente e incapacitante, associada a morbidade grave e maior risco de mortalidade [1].

Entre os aspectos psicológicos do TDM, a ruminação depressiva mereceu destaque por trazer dificuldades adicionais ao tratamento [2]. Ela se caracterizou por pensamentos repetitivos, negativos e prolongados sobre experiências passadas, presentes ou futuras [3–6]. Embora muitos pacientes acreditassem estar buscando soluções para seus problemas [7], a ruminação reduziu a resiliência, aumentou a vulnerabilidade, favoreceu o pessimismo e comprometeu a capacidade de resolução de desafios [8]. Quando presente, esse padrão cognitivo exacerbou a psicopatologia do TDM, prolongando estados emocionais negativos [9] e impactando a funcionalidade cotidiana [3,10], bem como relações interpessoais, associando-se a dependência, agressividade e busca por vingança [9].

O tratamento farmacológico foi considerado padrão-ouro no manejo do TDM, embora não fosse direcionado especificamente ao sintoma da ruminação. Nesse contexto, os programas baseados em mindfulness (MBPs) ganharam espaço como prática complementar. O mindfulness foi definido como a atenção plena, intencional e sem julgamento, às experiências do momento presente [11]. Evidências demonstraram sua eficácia na redução de sintomas de ansiedade, depressão e estresse [12], possivelmente por favorecer uma mudança de perspectiva diante do adoecimento, reduzindo reatividade emocional [13, 14]. Além disso,

essa prática foi reconhecida como promotora de resiliência [15], especialmente por seu papel na transcendência do self e no enfraquecimento de devaneios mal adaptativos.

Apesar disso, existiu uma lacuna na literatura quanto à avaliação dos efeitos do mindfulness sobre a ruminação, em comparação ao tratamento farmacológico exclusivo. Nesse sentido, este estudo clínico aberto, controlado e randomizado avaliou a resposta ruminativa de indivíduos com TDM submetidos ao uso de escitalopram isolado ou associado ao mindfulness, durante 12 semanas. A hipótese foi de que ambos os grupos reduziriam sintomas ruminativos, com impacto superior no grupo que recebeu a intervenção combinada.

Objetivo geral:

Verificar a eficácia das terapias farmacológica exclusiva e farmacológica associada ao mindfulness na redução da ruminação em pacientes com TDM.

Objetivos específicos:

Analisar o impacto na ruminação obtido por meio da terapia farmacológica exclusiva e da farmacoterapia associada ao mindfulness;

Comparar a resposta ruminativa entre os grupos antes e após o tratamento;

Identificar qual intervenção promoveu maior impacto na redução dos sintomas ruminativos.

Metodologia

Desenho do estudo e participantes

Este estudo constituiu uma análise secundária de um ensaio clínico aberto, controlado, randomizado e longitudinal, realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em parceria com a UPSaúde, entre 2022 e 2023. O protocolo seguiu a Declaração de Helsinque, com aprovação do comitê de ética (#40046320.9.0000.5537, Emenda 5.442.945) e registro no ReBEC (RBR-4pgd3ct).

Os participantes foram estudantes e servidores adultos da UFRN, de ambos os sexos, diagnosticados com TDM. O recrutamento ocorreu por mídias sociais institucionais e aplicativos da universidade. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos indivíduos: a) com episódio depressivo atual do TDM; b) idade ≥ 18 anos; c) vínculo com a UFRN; d) acesso à internet.

Foram excluídos: a) diagnóstico de outros transtornos mentais; b) uso de medicamentos neurológicos ou psicotrópicos além dos antidepressivos fornecidos pelo estudo; c) gestantes e lactantes; d) limitações físicas ou cognitivas impeditivas para a intervenção.

Triagem e alocação

A elegibilidade foi verificada por triagem online, com aplicação do PHQ-2 (Kroenke et al., 2003). Aqueles com escore ≥ 3 foram encaminhados à consulta psiquiátrica via telemedicina

no HUOL/UFRN. O diagnóstico foi confirmado pela Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional (MINI) [16], e a gravidade avaliada pela Escala de Depressão de Montgomery e Åsberg (MADRS) (1979). Também foi aplicado questionário sociodemográfico.

Após a triagem, os participantes foram randomizados em dois grupos: Grupo Controle (GC) – tratamento farmacológico exclusivo, e Grupo Mindfulness (GM) – tratamento farmacológico associado ao mindfulness.

Intervenções

O GC recebeu escitalopram por 12 semanas (10–20 mg/dia, ajustado conforme necessidade). O GM recebeu escitalopram associado a protocolo baseado em Mindfulness-Based Cognitive Therapy (MBCT), adaptado para intervenções virtuais.

A intervenção em mindfulness teve duração de 12 semanas, incluindo encontros virtuais síncronos semanais de 1h e atividades assíncronas de 20 minutos em três dias da semana, totalizando cerca de 2h de prática semanal. Os módulos foram estruturados em blocos temáticos quinzenais: piloto automático; vivendo na mente; modos de viver; reconhecendo a aversão; permitir e deixar ir; pensamentos não são fatos.

Desfechos

O desfecho primário foi a variação da pontuação da Escala de Resposta Ruminativa – versão reduzida (RRS-VR) [Treynor et al., 2003], composta por 10 itens. As avaliações foram realizadas no baseline (S0) e ao final de 12 semanas (S12).

Análise estatística

As variáveis contínuas foram descritas como média $\pm$ erro padrão, e as categóricas em frequência relativa. A análise principal utilizou modelos lineares generalizados de efeitos mistos (GLMM) com distribuição inversa gaussiana, considerando grupo e tempo como fatores fixos, e participantes como efeito aleatório. Sexo, idade e dose do medicamento foram inseridos como covariáveis.

Adicionalmente, os participantes foram categorizados em baixo (<17 pontos) e alto ($\geq$ 17 pontos) escore ruminativo basal, permitindo análise exploratória de subgrupos. As análises seguiram o princípio de intenção de tratar (ITT). A significância foi fixada em $p < 0,05$. O tamanho de efeito foi calculado pelo d de Cohen (IC95%).

Resultados e Discussões

Ao todo, 88 participantes foram alocados para um dos três braços de tratamento:

grupo controle com uso exclusivo de antidepressivo (GC, $n=33$), grupo exercício físico

associado à farmacoterapia (GE, $n=26$) e grupo mindfulness associado à farmacoterapia (GM, $n=29$). No grupo GC, 2 voluntários foram excluídos por motivos de falha no uso da

medicação, e 4 foram excluídos por receberem diagnóstico diferente da depressão maior. No GE, 4 voluntários foram descontinuados do tratamento por falharem no uso da medicação

(n=3) ou por não se adaptarem à prática de exercício físico (n=1). No GM, 5 participantes foram descontinuados por falharem no uso da medicação (n=2) ou por não se adaptarem à rotina da prática do mindfulness (n=3). Os participantes tinham em média $27,6 \pm 3,59$ anos, sendo a maior parte mulheres (n=66, 75%).

Efeito da intervenção no escore total de ruminação

Todos os grupos apresentaram redução no nível de ruminação entre o início e o final do tratamento (Grupo*semana $F(2;138) = 6,697$, $p=0,002$; post-hoc $p<0,001$ para todos os grupos), com maior tamanho de efeito para o grupo mindfulness (GM: $d=1,30$; GE: $d=0,68$; GC: $d=0,96$) (Tabela S1, Figura 3A, painel esquerdo). Os grupos não apresentaram diferença entre si nem antes nem após o tratamento (Tabela S2, Figura 3A, painel esquerdo).

Para o grupo de participantes com baixo nível de ruminação basal, apenas o grupo controle reduziu os níveis de ruminação em resposta à intervenção (Grupo*semana $F(5;140) = 4,919$, $p<0,0001$; post-hoc $p=0,001$, $d=0,82$). Os demais grupos não apresentaram variações significativas aos tratamentos, assim como não houve diferença entre os grupos antes ou após o tratamento (Tabela S1, Figura 3A, painel central).

Quanto aos participantes com alto nível basal de ruminação, todos os grupos apresentaram redução no nível de ruminação entre o início e o final do tratamento, com maior tamanho de efeito para o grupo mindfulness (Grupo*semana $F(5;140) = 4,919$, $p<0,0001$; post-hoc GM: $p<0,001$, $d=1,51$; GE: $p=0,001$, $d=0,88$; GC: $p=0,018$; $d=0,42$). Os grupos não apresentaram diferença entre eles no início do tratamento, mas o grupo mindfulness apresentou significativamente menores níveis de ruminação total quando comparado ao grupo exercício ($p=0,005$, $d=0,81$) e marginalmente significativo quando comparado ao grupo controle ($p=0,059$, $d=0,53$) (Tabela S2, Figura 3A, painel direito).

Discussão

O presente estudo avaliou o impacto da terapia farmacológica exclusiva, bem como das terapias combinadas com mindfulness ou exercício físico, sobre a ruminação em pacientes com Transtorno Depressivo Maior (TDM). Os resultados mostraram que todos os grupos de intervenção – farmacoterapia isolada (GC), farmacoterapia associada ao exercício físico (GE) e farmacoterapia associada ao mindfulness (GM) – apresentaram reduções significativas nos níveis totais de ruminação após 12 semanas de tratamento. No entanto, o grupo submetido ao tratamento combinado com mindfulness apresentou a maior redução, com tamanho de efeito superior em comparação aos demais grupos.

A ruminação é um processo cognitivo associado à vulnerabilidade, desenvolvimento e manutenção de diversos transtornos mentais, especialmente a depressão [17]. Trata-se de um padrão repetitivo, autorreferencial e geralmente negativo de pensamento, que prolonga estados disfóricos e prejudica a resolução de problemas. Reduzir esse padrão disfuncional é considerado um desfecho clínico relevante, com potencial para melhorar a funcionalidade e prevenir recaídas. A literatura aponta a ruminação como um possível mediador de resposta terapêutica em diferentes formas de tratamento, como a estimulação magnética transcraniana [18] e intervenções psicoterápicas, incluindo o mindfulness [19, 20].

A superioridade da combinação de mindfulness com farmacoterapia observada neste estudo está em consonância com achados prévios de ensaios clínicos randomizados, que evidenciam os benefícios do mindfulness na redução dos sintomas ruminativos de forma generalizada

[21, 22, 23]. Um estudo mostrou que a associação da Terapia Cognitiva Baseada em Mindfulness (MBCT) ao tratamento usual reduz significativamente a ruminação, em comparação ao tratamento isolado [22]. Além disso, a ruminação parece ser um dos mediadores mais relevantes na relação entre mindfulness e sintomas de depressão e ansiedade [23]. Essa efetividade pode ser explicada pela natureza do mindfulness, que trabalha diretamente a forma como os indivíduos se relacionam com pensamentos ruminativos, promovendo uma postura de não julgamento e não reatividade [24].

Estudos anteriores indicam que uma única sessão de exercício físico não é suficiente para reduzir os níveis de ruminação [20]. No entanto, a prática regular ao longo do tempo mostra-se eficaz nesse sentido [25]. Em nosso protocolo, o exercício foi aplicado longitudinalmente e mostrou-se eficaz na redução da ruminação total, ainda que com tamanho de efeito menor do que o mindfulness. O exercício físico em pacientes com TDM proporciona benefícios físicos e mentais [26, 27], podendo aumentar níveis de neurotrofinas com impacto positivo sobre a cognição [28], induzir respostas anti-inflamatórias [27] e modular neurotransmissores relacionados ao bem-estar [29]. Ainda assim, os mecanismos exatos pelos quais a atividade física afeta a ruminação permanecem incertos, provavelmente envolvendo uma interação complexa entre fatores biológicos e cognitivos [26].

Apesar das contribuições, este estudo apresenta algumas limitações. Os dados foram obtidos por meio de autorrelato, o que pode gerar vieses, como superestimação de dados positivos e subestimação de aspectos negativos, especialmente em uma amostra com TDM. Além disso, não foi possível controlar estatisticamente, de forma homogênea, a severidade inicial da ruminação. O delineamento aberto, sem mascaramento de participantes ou pesquisadores, também pode ter introduzido viés de expectativa. No entanto, os achados apresentados fornecem boas evidências de que tanto o mindfulness quanto o exercício físico têm efeitos adjuntos positivos na redução da ruminação.

Esses resultados reforçam o papel dessas intervenções como indutoras de resiliência. O uso complementar de terapias baseadas em mindfulness ou exercício físico deve ser incentivado como parte de um tratamento integrativo para o TDM – não apenas pela redução de sintomas depressivos, como demonstrado em ampla literatura [30], mas também pela diminuição de processos cognitivos disfuncionais como a ruminação. Considera-se ainda que protocolos personalizados podem ser desenvolvidos levando em conta características individuais dos pacientes, como intensidade e padrão dos sintomas ruminativos.

Futuros estudos devem continuar investigando a resposta da ruminação a diferentes abordagens terapêuticas, com atenção aos seus subcomponentes e padrões individuais dos pacientes. Investigações com amostras maiores, acompanhamentos mais longos e comparações entre diferentes combinações terapêuticas – como mindfulness versus exercício físico associados a psicoterapia – poderão ampliar o entendimento sobre os mecanismos de ação e o potencial terapêutico dessas abordagens. Além disso, é fundamental replicar os resultados encontrados em populações clínicas mais amplas e com controle para diferentes transtornos em que a ruminação esteja presente.

Em síntese, os resultados deste estudo reforçam a relevância das estratégias terapêuticas combinadas no manejo do TDM. A associação entre farmacoterapia e intervenções complementares, como mindfulness e exercício físico, mostrou-se eficaz na redução da ruminação. Tais abordagens multimodais podem ampliar o alcance terapêutico e promover maior resiliência cognitiva e emocional, representando uma via promissora na atenção integral à saúde mental.

Conclusão

Dessa forma, os resultados deste estudo reforçam o papel das terapias tradicionais e complementares na redução da ruminação em indivíduos com Transtorno Depressivo Maior (TDM). Observou-se que todas as intervenções – farmacoterapia exclusiva, exercício físico associado à farmacoterapia e mindfulness combinado à farmacoterapia – promoveram redução da ruminação total.

Esses achados sugerem que intervenções mente-corpo, como o mindfulness e o exercício físico, apresentam potencial terapêutico importante na modulação de padrões ruminativos em pacientes com TDM, especialmente quando aplicadas de forma combinada à farmacoterapia. Além disso, reforçam a relevância da adoção de protocolos terapêuticos integrativos e individualizados, que considerem as características cognitivas e emocionais dos pacientes, de modo a otimizar os desfechos clínicos.

Futuras investigações devem explorar comparações diretas entre diferentes terapias complementares, avaliando a evolução dos sintomas ao longo do tempo. A utilização de métodos alternativos de categorização da ruminação e a análise de respostas em janelas temporais menores poderão oferecer maior sensibilidade para identificar os efeitos agudos e sustentados das intervenções, ampliando a compreensão sobre seus mecanismos de ação e eficácia terapêutica.

Referências

- [1] Zimmerman, M., Morgan, T. A., & Stanton, K. (2018). The severity of psychiatric disorders. *World Psychiatry*, 17(3), 258–275. <https://doi.org/10.1002/wps.20569>
- [2] Nolen-Hoeksema, S. (1991). Responses to depression and their effects on the duration of depressive episodes. *Journal of Abnormal Psychology*, 100(4), 569–582. <https://doi.org/10.1037/0021-843X.100.4.569>
- [3] Watkins, E. R., & Roberts, H. (2020). Reflecting on rumination: Consequences, causes, mechanisms and treatment of rumination. *Behaviour Research and Therapy*, 127, 103573. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2020.103573>
- [4] Lavender, A., & Watkins, E. (2004). Rumination and future thinking in depression. *British Journal of Clinical Psychology*, 43(2), 129–142. <https://doi.org/10.1348/014466504323088015>
- [5] Lyubomirsky, S., Caldwell, N. D., & Nolen-Hoeksema, S. (1998). Effects of ruminative and distracting responses to depressed mood on retrieval of autobiographical memories. *Journal of Personality and Social Psychology*, 75(1), 166–177. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.75.1.166>
- [6] Rimes, K. A., & Watkins, E. (2005). The effects of self-focused rumination on global negative self-judgements in depression. *Behaviour Research and Therapy*, 43(12), 1673–1681. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2004.12.002>

- [7] Papageorgiou, C., & Wells, A. (2001). Metacognitive beliefs about rumination in recurrent major depression. *Cognitive and Behavioral Practice*, 8(2), 160–164. [https://doi.org/10.1016/S1077-7229\(01\)80021-3](https://doi.org/10.1016/S1077-7229(01)80021-3)
- [8] Lyubomirsky, S., Tucker, K. L., Caldwell, N. D., & Berg, K. (1999). Why ruminators are poor problem solvers: Clues from the phenomenology of dysphoric rumination. *Journal of Personality and Social Psychology*, 77(5), 1041–1060. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.77.5.1041>
- [9] Nolen-Hoeksema, S., Wisco, B. E., & Lyubomirsky, S. (2008). Rethinking rumination. *Perspectives on Psychological Science*, 3(5), 400–424. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6924.2008.00088.x>
- [10] Ward, A., Lyubomirsky, S., Sousa, L., & Nolen-Hoeksema, S. (2003). Can't quite commit: Rumination and uncertainty. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 29(1), 96–107. <https://doi.org/10.1177/0146167202238375>
- [11] Kabat-Zinn, J. (2013). *Full catastrophe living: Using the wisdom of your body and mind to face stress, pain, and illness* (Revised and updated edition). Bantam Books trade paperback.
- [12] Gotink, R. A., Chu, P., Busschbach, J. J. V., Benson, H., Fricchione, G. L., & Hunink, M. G. M. (2015). Standardised mindfulness-based interventions in healthcare: An overview of systematic reviews and meta-analyses of rcts. *PLOS ONE*, 10(4), e0124344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124344>
- [13] Levin, M. E., Luoma, J. B., & Haeger, J. A. (2015). Decoupling as a mechanism of change in mindfulness and acceptance: A literature review. *Behavior Modification*, 39(6), 870–911. <https://doi.org/10.1177/0145445515603707>
- [14] Lindsay, E. K., & Creswell, J. D. (2017). Mechanisms of mindfulness training: Monitor and acceptance theory(Mat). *Clinical Psychology Review*, 51, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2016.10.011>
- [15] Shih, V. W., Chan, W.-C., Tai, O.-K., Wong, H.-L., Cheng, C. P., & Wong, C. S. (2021). Mindfulness-based cognitive therapy for late-life depression: A randomised controlled trial. *East Asian Archives of Psychiatry*, 31(2), 27–35. <https://doi.org/10.12809/eaap2075>
- [16] Amorim, P., Guterres, T., Sheehan, B. V., & Lecrubier, Y. (1996). MINI entrevista neuropsiquiátrica internacional. Versão Portuguesa, 4(4).
- [17] Luca, M. (2019). Maladaptive rumination as a transdiagnostic mediator of vulnerability and outcome in psychopathology. *Journal of Clinical Medicine*, 8(3), 314. <https://doi.org/10.3390/jcm8030314>
- [18] Chu, S. A., Tadayonnejad, R., Corlier, J., Wilson, A. C., Citrenbaum, C., & Leuchter, A. F. (2023). Rumination symptoms in treatment-resistant major depressive disorder, and outcomes of repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (Rtms) treatment. *Translational*

Psychiatry, 13(1), 293. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02566-4>

[19] Shahar, B., Britton, W. B., Sbarra, D. A., Figueredo, A. J., & Bootzin, R. R. (2010).

Mechanisms of change in mindfulness-based cognitive therapy for depression: Preliminary evidence from a randomized controlled trial. *International Journal of Cognitive Therapy*, 3(4),

402–418. <https://doi.org/10.1521/ijct.2010.3.4.402>

[20] Schmitter, M., Vanderhasselt, M.-A., Spijker, J., Smits, J. A. J., & Vrijssen, J. N. (2023).

Working it out: Can an acute exercise bout alleviate memory bias, rumination and negative mood? *Cognitive Behaviour Therapy*, 52(3), 232–245.
<https://doi.org/10.1080/16506073.2022.2164349>

[21] Shih, V. W., Chan, W.-C., Tai, O.-K., Wong, H.-L., Cheng, C. P., & Wong, C. S. (2021).

Mindfulness-based cognitive therapy for late-life depression: A randomised controlled trial.

East Asian Archives of Psychiatry, 31(2), 27–35. <https://doi.org/10.12809/eaap2075>

[22] Cladder-Micus, M. B., Speckens, A. E. M., Vrijssen, J. N., T. Donders, A. R., Becker, E. S., & Spijker, J. (2018). Mindfulness-based cognitive therapy for patients with chronic, treatment-resistant depression: A pragmatic randomized controlled trial. *Depression and Anxiety*, 35(10), 914–924. <https://doi.org/10.1002/da.22788>

[23] Parmentier, F. B. R., García-Toro, M., García-Campayo, J., Yañez, A. M., Andrés, P., & Gili, M. (2019). Mindfulness and symptoms of depression and anxiety in the general population: The mediating roles of worry, rumination, reappraisal and suppression. *Frontiers in Psychology*, 10, 506. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00506>

[24] Creswell, J. D. (2017). Mindfulness interventions. *Annual Review of Psychology*, 68(1), 491–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-042716-051139>

[25] Craft, L. L. (2005). Exercise and clinical depression: Examining two psychological mechanisms. *Psychology of Sport and Exercise*, 6(2), 151–171.
<https://doi.org/10.1016/j.psychsport.2003.11.003>

[26] Noetel, M., Sanders, T., Gallardo-Gómez, D., Taylor, P., Del Pozo Cruz, B., Van Den Hoek, D., Smith, J. J., Mahoney, J., Spathis, J., Moresi, M., Pagano, R., Pagano, L.,

Vasconcellos, R., Arnott, H., Varley, B., Parker, P., Biddle, S., & Lonsdale, C. (2024). Effect of exercise for depression: Systematic review and network meta-analysis of randomised

controlled trials. BMJ, e075847. <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-075847>

[27] Stubbs, B., Rosenbaum, S., Vancampfort, D., Ward, P. B., & Schuch, F. B. (2016).

Exercise improves cardiorespiratory fitness in people with depression: A meta-analysis of randomized control trials. *Journal of Affective Disorders*, 190, 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.10.010>

[28] Tavares, V. D. D. O., Rossell, S. L., Schuch, F. B., Herring, M., Menezes De Sousa, G., Galvão-Coelho, N. L., & Hallgren, M. (2023). Effects of exercise on cognitive functioning in adults with serious mental illness: A meta analytic review. *Psychiatry Research*, 321, 115081. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2023.115081>

[29] Schuch, F. B., Deslandes, A. C., Stubbs, B., Gosmann, N. P., Silva, C. T. B. D., & Fleck, M. P. D. A. (2016). Neurobiological effects of exercise on major depressive disorder: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 61, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.11.012>

[30] Kennedy, S. H., Andersen, H. F., & Thase, M. E. (2009). Escitalopram in the treatment of major depressive disorder: A meta-analysis. *Current Medical Research and Opinion*, 25(1), 161–175. <https://doi.org/10.1185/03007990802622726>

Anexos

Figura 1. Diagrama CONSORT do estudo. GC = grupo controle, GE = grupo exercício, GM = grupo MINDFULNESS

Figura 3. Escore entre a amostra geral/completa (esquerda), o subgrupo Baixa RRS-VR (centro), e o subgrupo Alta RRS-VR (direita) para os escores (A) RRS-VR Total

CÓDIGO: SB0792

AUTOR: DOROTH MIRANDA ALMEIDA SILVA

ORIENTADOR: KEMAL ALI GER

TÍTULO: Resposta de copépodes neotropicais ao aumento salino promovido por diferentes tipos de sais.

Resumo

Devido ao aumento da salinização em ecossistemas dulcícolas, se faz necessário compreender como diferentes sais afetam os organismos aquáticos. Sendo assim, neste estudo avaliamos os efeitos do aumento na concentração de NaCl e KCl sobre copépodes *Notodiaptomus* através de ensaios de toxicidade aguda. Os resultados evidenciaram uma maior sensibilidade ao KCl, demonstrado pela letalidade rápida e intensa do mesmo, enquanto o NaCl apresentou uma tolerância relativamente maior. Essa discrepância informa que conhecer a composição iônica é essencial para entender melhor os efeitos ecotoxicológicos e que a condutividade elétrica não deve ser utilizada isoladamente como indicador. É necessário refazer estes experimentos utilizando uma maior diversidade de sais de maneira isolada e combinados para melhor compreender os riscos da salinização nos ecossistemas de água doce tropicais.

Palavras-chave: Água doce. Ecotoxicologia. KCl. NaCl. Salinização. Zooplâncton.

TITLE: Response of neotropical copepods to saline increase promoted by different types of salts.

Abstract

Due to increased salinization in freshwater ecosystems, it is necessary to understand how different salts affect aquatic organisms. Therefore, in this study, we evaluated the effects of increased NaCl and KCl concentrations on *Notodiaptomus* copepods through acute toxicity tests. The results showed greater sensitivity to KCl, demonstrated by its rapid and intense lethality, while NaCl showed relatively greater tolerance. This discrepancy indicates that understanding ionic composition is essential to better understand ecotoxicological effects and that electrical conductivity should not be used alone as an indicator. These experiments need to be repeated using a greater diversity of salts, both individually and in combination, to better understand the risks of salinization in tropical freshwater ecosystems.

Keywords: Ecotoxicology. Freshwater. KCl. NaCl. Salinization. Zooplankton.

Introdução

As águas continentais vêm sofrendo um processo conhecido como salinização antrópica, que consiste no rápido aumento da quantidade de sais minerais dissolvidos (Cunillera-Montcusí et al., 2022). Dentre as principais causas podemos destacar a irrigação, a urbanização, a utilização de sais de degelo, a mineração, entre outros (Hebert et al., 2015; Hintz et al., 2019; Schuler et al., 2019). Este processo já é uma preocupação global, pois os organismos que residem nestes ambientes são adaptados a tolerar baixas concentrações iônicas (Hintz et al., 2019; Venâncio et al., 2023). Essa mudança acelerada pode estimular a proliferação de espécies exóticas, provocar alterações na riqueza, na abundância e na reprodução dos organismos residentes, e assim, desencadear efeitos em cascata ao longo de todo o ecossistema (Chen et al., 2015, Jeppesen et al., 2015).

Diversos estudos apontam que os íons mais frequentes são os causadores mais comuns de toxicidade em ambientes aquáticos, principalmente quando se trata de águas superficiais (Chapman et al. 2000; Dickerson et al., 1996; Findlay e Kelly, 2011; Kennedy et al., 2003). A maior parte dessas substâncias são provenientes das atividades antrópicas citadas anteriormente (Mount et al., 2016). Grande parte dos trabalhos que visam entender os efeitos da salinização estão associados ao cloreto de sódio (NaCl), os quais se concentram fortemente no hemisfério norte (Venâncio et al., 2023).

Poucos estudos avaliaram os efeitos dos diferentes sais na biota aquática, porém, estes, identificaram que a toxicidade pode variar significativamente entre os diferentes tipos de íons e diferentes táxons (Coldsnow e Relyea, 2018; Mount et al., 1997, 2016, 2019; Venâncio et al., 2023). Apesar de não haver um consenso, na maior parte dos estudos o potássio apresentou uma toxicidade mais elevada quando comparado aos demais sais, demonstrando assim, que os efeitos da salinização nos organismos aquáticos podem estar sendo subestimados (Mount et al., 1997; Venâncio et al., 2023, Walker et al., 2023).

O zooplâncton é composto por organismos de diferentes espécies, os quais são responsáveis por intermediar a transferência de biomassa e energia entre os produtores primários e os consumidos mais acima da teia trófica (Esteves, 1998; Lomartire et al., 2021). Além disso, eles são responsáveis por regular a sobrevivência dos herbívoros, garantir a reciclagem de nutrientes, da qualidade da água e da produção pesqueira (Declerck e De Senerpont Domas, 2023; Lomartire et al., 2021). Os estudos sobre zooplâncton geralmente se concentram no gênero *Daphnia* como organismo modelo (Gianuca et al., 2016). Dessa forma, se faz necessário analisar outros táxons zooplanctônicos.

O copépode é um componente do zooplâncton que domina ambientes aquáticos em diferentes latitudes e está presente em águas continentais e marinhas, em ambos os hemisférios (De Meester et al., 2023; Kiørboe, 2011). Devido ao complexo ciclo de vida, os copépodes são excelentes organismos a serem utilizados em testes de toxicidade (Gutierrez et al., 2010). No Brasil, copépodes calanoida do gênero *Notodiaptomus* normalmente dominam ecossistemas dulcícolas e já foram utilizados em estudos anteriores para entender os efeitos das mudanças globais (Ger et al. 2016, 2016, 2019). Porém, poucos estudos avaliam os efeitos da salinização em copépodes de água doce (Walker et al, 2023) e nenhum comparou a toxicidade de diferentes sais.

Sendo assim, este trabalho possui o objetivo geral de avaliar como copépodes dominantes em regiões neotropicais respondem ao aumento salino promovido por diferentes tipos de sais. Para isso, iremos comparar a sobrevivência de organismos do gênero *Notodiaptomus* a partir

de diferentes parâmetros (concentração total do sal, concentração do cátion, concentração do ânion e condutividade), além de calcular o LC50 para o NaCl e o KCl e comparar essas concentrações letais. Temos como hipótese, que o aumento na concentração de KCl seja mais letal aos copépodos

Metodologia

Coleta e manutenção dos organismos teste

Os indivíduos utilizados no experimento são machos adultos de copépodos da ordem calanoida e gênero *Notodiaptomus*. A coleta foi realizada no Reservatório Boqueirão de Parelhas. Os indivíduos foram levados ao Laboratório de Microbiologia Aquática (LAMAQ), localizado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) - Centro de Biociências (CB), no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) situado na cidade de Natal - RN. Foram isolados e cultivados em béqueres de 2L contendo 1.8 L de meio de cultivo sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12:12 claro/escuro), aeração (5 bolhas de ar por segundo) e alimentação (500 $\mu\text{g C / L}$ de *Cryptomonas*). Semanalmente, foi realizada a troca total de água, a contagem populacional, a retirada de indivíduos mortos e de partículas suspensas como restos de alimento, excrementos sólidos, hifas de fungos e fibras com o auxílio de uma pipeta descartável. Logo após a limpeza, o alimento era adicionado aos cultivos.

Preparação da solução teste

Os sais utilizados neste trabalho para realizar os ensaios de toxicidade aguda foram: cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl). As soluções de maior concentração de cada sal foram preparadas a partir da dissolução do sal no meio de cultivo. A quantidade do sal foi previamente calculada e medida para produzir, ao final, uma solução de 1L com concentração igual a 1.6 g/L de NaCl e KCl. As demais soluções foram produzidas a partir da diluição da solução com concentração elevada mais próxima à concentração desejada. Para isso, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$C1V1=C2V2$$

Onde C1 é a concentração inicial da solução, V1 é o volume inicial da solução, C2 é a concentração final da solução e V2 é o volume final da solução. Ao final de cada diluição um volume de 0.04 L foi removido para ser utilizado no experimento e o restante diluído novamente para produção da próxima solução com menor concentração seguinte. Todas as soluções utilizadas para a realização dos ensaios de toxicidade eram frescas, produzidas até no máximo 24 horas antes do início.

Teste de toxicidade aguda e estimativa da concentração letal

Os experimentos foram realizados no LAMAQ. Todos os materiais utilizados durante os experimentos foram previamente higienizados com DETEC, enxaguados cinco vezes com água da torneira e uma última vez com água destilada. Cerca de 72 horas antes do início do

experimento, os indivíduos foram isolados dos demais. No experimento foram utilizados dois diferentes tipos de sais (NaCl e KCl) para simular o aumento da salinidade.

Para cada concentração foram feitas quatro réplicas e as salinidades foram medidas em gramas por litro (g/L). Cada réplica consistiu em um béquer de 50 mL, contendo 40 mL de solução teste e um copépode macho e adulto. Os organismos foram mantidos a 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) com aeração constante de 5 bolhas por segundo e ciclo luminoso de 12:12 horas claro/escuro por 48 horas. A sobrevivência dos indivíduos foi verificada a cada 24 horas, e então utilizada para calcular os valores de concentração letal (LC50) para cada um dos sais.

Análise estatística

Os dados foram tabulados no Excel e então importados para o software RStudio 4.3.0 (R Core Team, 2023) utilizando o pacote readxl. As variáveis resposta foram comparadas entre os tratamentos através da análise de sobrevivência, onde foi calculado o LC50 e, para isto, foi utilizado o pacote drc. Todos os gráficos foram gerados utilizando os pacotes ggplot2 e cowplot.

Resultados e Discussões

Os resultados deste experimento demonstraram que, conforme já era esperado, os organismos do gênero *Notodiaptomus* que foram expostos a um ambiente onde o aumento da salinidade foi simulado pela adição de KCl, apresentaram uma maior taxa de mortalidade, independentemente da quantidade de horas de exposição. Uma das razões para a maior toxicidade do potássio está no fato que os íons de cálcio presentes na água podem reduzir a captação dos íons de sódio pelos crustáceos, reduzindo assim a toxicidade desse sal.

Os organismos expostos ao KCl, após 24 horas, já apresentavam uma mortalidade bastante intensa, onde somente os indivíduos dos tratamentos de 0 e 0.05 g/L de KCl continuavam vivos. Em contrapartida, nesse mesmo período, os organismos expostos ao NaCl sobreviveram até a concentração de 0.8 g/L de NaCl, apresentando uma tolerância aproximadamente 16 vezes superior quando comparado ao KCl.

Após 48 horas de exposição, a sobrevivência dos indivíduos expostos ao KCl permaneceu igual, resultando num valor de LC50 de 0.07 g/L KCl. Contudo, houve uma pequena redução na proporção de sobreviventes dos organismos expostos aos tratamentos de 0.2 e 0.4 g/L de NaCl, promovendo uma redução no valor do LC50 de 0.8 g/L de NaCl para 0.621 g/L de NaCl para os períodos de 24 e 48 horas, respectivamente.

Os valores de condutividade de ambos os sais são muito similares, porém, a tolerância dos organismos difere consideravelmente entre KCl e NaCl. Esse é um resultado importante pois não há uma padronização na maneira de expressar a salinidade entre os autores, e com os nossos resultados podemos afirmar que a condutividade não é um parâmetro confiável para prever os possíveis efeitos negativos da salinização das águas continentais.

Conclusão

O presente trabalho contribui para o entendimento da ecotoxicologia da salinização ao demonstrar que a toxicidade varia de acordo com o tipo de sal. Reforçando a ideia que a salinização não deve ser tratada como um processo homogêneo simplificado, mas sim como um fenômeno que depende da composição iônica, possivelmente considerando as interações entre os diferentes tipos de sais.

A elevada sensibilidade dos copépodes ao potássio reitera a importância de aumentar a quantidade de sais testados. Se faz necessário também a padronização das metodologias utilizadas, a fim de avaliar mais precisamente os efeitos reais sobre organismos aquáticos e, assim, conseguir formular melhores planos de gestão para lidar com estes problemas.

Referências

Chapman P. M., Bailey H., Canaria E. 2000. Toxicity of total dissolved solids associated with two mine effluents to chironomid larvae and early life stages of rainbow trout. **Environ Toxicol Chem** 19:210–214.

Chen, L. et al. 2015. Changes in metabolites, antioxidant system, and gene expression in *Microcystis aeruginosa* under sodium chloride stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 126-135.

Coldsnow, K. D., & Relyea, R. A. 2018. Toxicity of various road-deicing salts to Asian clams (*Corbicula fluminea*). **Environmental toxicology and chemistry**, 37(7), 1839-1845.

Cunillera-Montcusí, D. et al. 2022. Freshwater salinisation: a research agenda for a saltier world. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 37, n. 5, p. 440-453.

Declerck, S. A. J., De Senerpont Domis, L. N. 2023. Contribution of freshwater metazooplankton to aquatic ecosystem services: an overview. **Hydrobiologia**, v. 850, n. 12, p. 2795-2810.

De Meester, L., Declerck, S. A.J., Ger, K. A. 2023. Beyond *Daphnia*: a plea for a more inclusive and unifying approach to freshwater zooplankton ecology. **Hydrobiologia**, v. 850, n. 21, p. 4693-4703.

Dickerson K. K., Hubert W. A., Bergman HL. 1996. Toxicity assessment of water from lakes and wetlands receiving irrigation drainwater. **Environ Toxicol Chem** 15:1097–1101.

Esteves, F.A. 1998. Fundamentos de Limnologia. 2 ed. **Interciência**, Rio de Janeiro.

Findlay S. E. G., Kelly V. R. 2011. Emerging indirect and long-term road salt effects on ecosystems. **Ann N Y Acad Sci** 1223:58–68.

Ger, K. A. et al. 2016. Potential mechanisms for the tropical copepod *Notodiaptomus* to tolerate *Microcystis* toxicity. **Journal of Plankton Research**, v. 38, n. 4, p. 843–854.

Ger, K. A., et al. 2016. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. **Harmful algae**, v. 54, p. 128-144.

Ger, K. A. et al. 2019. Zooplankton grazing selectivity regulates herbivory and dominance of toxic phytoplankton over multiple prey generations. **Limnology and Oceanography**, v. 64, n. 3, p. 1214–1227.

Gianuca, A. T., Pantel, J. H., De Meester, L. 2016. Disentangling the effect of body size and phylogenetic distances on zooplankton top-down control of algae. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. **Royal Society of London**, 283.

Gutierrez, M. F., Gagneten, A. M., Paggi, J. C. 2010. Copper and chromium alter life cycle variables and the equiproportional development of the freshwater copepod *Notodiaptomus conifer* (SARS). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, p. 275-286.

Herbert, E. R. et al. 2015. A global perspective on wetland salinization: ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. **Ecosphere**, v. 6, n. 10, p. 1-43.

Hintz, W. D., Jones, D. K., Relyea, R. A. 2019. Evolved tolerance to freshwater salinization in zooplankton: life-history trade-offs, cross-tolerance and reducing cascading effects. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374: 20180012.

Jeppesen, E. et al. 2015. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. **Hydrobiologia**, v. 750(1):201-227.

Kennedy A. J., Cherry D.S., Currie R.J. 2003. Field and laboratory assessment of a coal processing effluent in the Leading Creek watershed, Meigs County, Ohio. **Arch Environ Contam Toxicol** 44:324–331.

Kjørboe, T. 2011. What makes pelagic copepods so successful?. **Journal of Plankton Research**, v. 33, n. 5, p. 677-685.

Lomartire, S., Marques, J. C., Gonçalves, A. M. M. 2021. The key role of zooplankton in ecosystem services: A perspective of interaction between zooplankton and fish recruitment. **Ecological Indicators**, v. 129, p. 107867.

Mount, D. R., et al. 1997. Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (fathead minnows). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 2009-2019.

Mount, D. R., et al. 2016. The acute toxicity of major ion salts to *Ceriodaphnia dubia*: I. Influence of background water chemistry. **Environmental toxicology and chemistry**, 35(12), 3039-3057.

Mount, D. R., et al. 2019. Chronic toxicity of major ion salts and their mixtures to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 769-783.

Schuler, M. S. et al. 2019. Regulations are needed to protect freshwater ecosystems from salinization. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1764, p. 20180019.

Venâncio, C., Caon, K., Lopes, I. 2023. Cation composition influences the toxicity of salinity to freshwater biota. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, p. 1741.

Walker, R. H. et al. 2023. Global review reveals how disparate study motivations, analytical designs, and focal ions limit understanding of salinization effects on freshwater animals. **Science of the Total Environment**, v. 892, p. 164061.

Anexos

Valores de LC50 calculado

Proporção de sobreviventes após 24 horas

Proporção de sobreviventes após 48 horas

CÓDIGO: SB0795

AUTOR: PEDRO VINICIUS MEDEIROS DIAS

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Avaliação da mutagenicidade de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados da macroalga verde *Caulerpa cupressoides* a partir do teste de reversão em bactéria

Resumo

Os polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de algas têm apresentado diversas propriedades terapêuticas, incluindo imunostimulantes, antioxidantes até antilipêmicas. O desenvolvimento de novas substâncias que podem interagir diretamente com as células requer testes para avaliar possíveis efeitos mutagênicos. Para este fim, utilizou-se o teste de Kado, que é uma adaptação do teste de reversão da bactéria desenvolvido por Ames. No teste, diversas cepas de *Salmonella typhimurium* com sensibilidades a lesões diferentes no material genético são usadas para a avaliação dos efeitos mutagênicos. Em nosso laboratório, durante o procedimento de manutenção das cepas TA98, TA100 e TA102, foi observado um desvio dos valores padrão da taxa de reversão espontânea esperada, um dos parâmetros essenciais para validação do teste. Uma padronização interna dos ensaios está sendo investigada enquanto a manutenção constante e os testes de sensibilidade têm sido executados. Os resultados sugerem que a cepa TA102 está alterada e não poderá ser usada para ensaios, sendo necessária a obtenção de novos estoques e a verificação de sua qualidade. Em relação à cepa TA98, os resultados estão dentro dos valores de referência. Os resultados obtidos para a cepa TA100 apresentam diferenças em relação aos encontrados na literatura, mas têm sido consistentes, o que sugere que esta cepa poderá ser validada no nosso laboratório para futuros ensaios.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, Biomateriais, Genotoxicidade, Teste de Ames.

TITLE: Avaliação da mutagenicidade de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados da macroalga verde *Caulerpa cupressoides* a partir do teste de reversão em bactéria

Abstract

Sulfated polysaccharides (SP) extracted from seaweeds have demonstrated several therapeutic effects, including immunostimulatory, antioxidant, and even antilipidemic properties. The development of new substances that may interact directly with cells requires tests to evaluate their possible mutagenic effects. In this context, the Kado assay, an adaptation of the Revertant Bacterial Test developed by Ames, is one of the most used. In the assay, several *Salmonella typhimurium* strains with sensitivities to different types of genetic damage are used to evaluate the mutagenic effects. In our laboratory, during the maintenance of the TA98, TA100, and TA102 strains, a deviation from the standard values for the expected rate of spontaneous reversion was observed, a key parameter for validating the tests.

An internal standardization of the assays is being investigated, while constant maintenance and sensitivity tests are being performed. The results suggest that the TA102 strain is altered and not suitable for sample assays, necessitating the acquisition of new stocks and verification of their quality. Regarding the TA98 strain, the results are within the expected rate. The TA100 results deviate from the expected in the literature, although they are consistent, suggesting that this strain could be validated in our laboratory for future assays.

Keywords: Ames Test, Biocompatibility, Biomaterials, Genotoxicity.

Introdução

Diversos estudos elucidam as propriedades terapêuticas de polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de algas e têm comprovado seus efeitos imunoestimulantes, antioxidantes, hepatoprotetores, neuroprotetores, antilipêmicos, entre outros. Além disso, os PS também possuem propriedades relevantes para medicina regenerativa e vetores alternativos para entrega de medicamentos, o que, juntamente com o fato de serem acessíveis e de baixo custo, os torna extremamente promissores para o desenvolvimento de vias de tratamento alternativas mais eficientes e baratas (ZAITSEVA et al., 2022).

Atualmente, durante a pesquisa de novas substâncias para fins terapêuticos, é necessário realizar testes para garantir seu uso seguro antes de serem testadas clinicamente. Um dos testes recomendados é o Teste de Reversão de Bactérias proposto por Bruce Ames que permite avaliar o potencial efeito genotóxico e mutagênico de novas substâncias (AMES et al., 1973; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Diante do cenário do desenvolvimento de potenciais fármacos, o Teste de Reversão Bacteriana de Ames se provou o mais amplamente utilizado e aceito devido ao seu baixo custo relativo e alta eficiência (BALDRICK, 2021).

Para uma maior sensibilidade e o uso de menos quantidade de amostra, Kado, Langley e Eisenstadt propuseram uma adaptação ao ensaio de microssuspensão de *Salmonella* (KADO et al., 1983), tornando um teste de baixo custo ainda mais eficiente e sensível. Esse teste de mutagenicidade é exigido pela Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OECD) para investigações genotoxicológicas de novas substâncias, a fim de padronizar a qualidade e segurança das substâncias de produtos em desenvolvimento (OECD TG471, 2020).

O teste consiste na manutenção de cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* as quais são geneticamente modificadas para serem auxotróficas para o aminoácido histidina, tornando-as incapazes de se desenvolverem na ausência desse aminoácido no meio de cultura. O que diferencia as cepas usadas no teste são as alterações genéticas que carregam (tanto mutações diretamente no genoma quanto a inserção de plasmídeos), o que influencia o tipo de lesão e o quão sensíveis elas são. Durante a manutenção das cepas, é verificada a taxa de reversão da mutação que as torna dependentes de histidina e que permite uma contagem de crescimento de colônias revertentes, referindo-se à taxa de reversão espontânea que está incluída em um intervalo padrão para cada cepa. O ensaio consiste na comparação da quantidade de colônias revertentes induzidas por alguma amostra em relação aos padrões normais de manutenção (KADO et al., 1983; OECD TG471, 2020).

Diante do cenário global de execução do ensaio de Ames para avaliar a mutagenicidade de novas substâncias, diversos fatores internos de cada laboratório podem levar a uma alteração dos valores da taxa de reversão espontânea, cujo intervalo padrão não é regra, mas sim um valor de referência (SALVADORI et al., 2021). Atualmente, análises mais detalhadas indicam que para a avaliação de resultados positivos, devem ser considerados múltiplos critérios além do originalmente proposto, que se baseava em uma relação de 2 a 3 vezes (a depender da cepa) entre o número de colônias revertentes induzidas e espontâneas. Assim,

fatores como a presença de uma relação dose-resposta nas amostras testadas e o histórico laboratorial de manutenção das cepas também devem ser incluídos na interpretação dos resultados (LEVY et al., 2019; EGOROVA & ILYUSHINA, 2024).

Metodologia

MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Os estoques permanentes das cepas são mantidos a -80°C durante um período máximo de 6 meses a 1 ano, a partir dos quais 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 (KADO et al., 1983; CETESB L5. 241, 1991; OECD TG471, 2020).

Durante os procedimentos de renovação, preparou-se um inóculo inicial de 20 mL de caldo nutriente, com antibiótico para o qual a cepa é resistente, e 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 de 5 mL final, a bateria de testes foi realizada, inoculando a bactéria em diversas placas para testar o genótipo esperado de cada cepa.

As placas de teste de dependência de histidina e biotina foram feitas em ágar mínimo para verificar o crescimento apenas na placa que a histidina e a biotina foram adicionadas, enquanto o crescimento na placa que possuía apenas biotina não era esperado crescimento. Além disso, foram realizados os seguintes testes: 1) Avaliação da sensibilidade à mutação UVrB, que inabilita as cepas de ativarem a via de reparo por excisão de nucleotídeos corretamente e causa uma hipersensibilidade que inibe seu crescimento ao ser exposta por um breve momento; 2) a resistência a um antibiótico específico, como ampicilina (plasmídeo pKM101) para a maioria das cepas resistentes e ampicilina e tetraciclina (plasmídeo pAQ1) para a TA102; 3) a sensibilidade à mutação RFA que torna a membrana lipopolissacarídica (LPS) das bactérias mais permeável e sensível a grandes pressões osmóticas, como a induzida pelo cristal violeta, formando um halo de inibição de crescimento. Esses testes foram realizados em placas de ágar mínimo (dependência de biotina e histidina) e em placas de ágar nutriente (RFA, UVrB, presença do plasmídeo pAQ1 e pKM101) que foram incubadas por 24 horas a 37°C (SALVADORI et al., 2021).

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 e suspensas 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, é realizada a contagem de colônias isoladas e esse valor foi comparado ao intervalo padrão esperado relatado na literatura. PADRONIZAÇÃO DOS INTERVALOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A interpretação e análise dos resultados se basearam na razão de mutagenicidade (RM), representada pela Equação 1, na qual “E” se refere à soma das colônias revertentes espontâneas e às colônias revertentes induzidas (na placa teste) e “C” se refere às colônias revertentes espontâneas (no controle negativo). Um resultado positivo se caracteriza por uma relação de duas vezes, ou mais, colônias revertentes induzidas em comparação com as

colônias revertentes espontâneas, sendo feita também uma análise de regressão linear relacionando o número de colônias revertentes com a quantidade de amostra usada. Para a padronização interna dos valores da taxa de referência, se correlacionaram os intervalos padrão estabelecidos na literatura (CETESB L5. 241, 1991; SALVADORI et al., 2021) com os valores obtidos no laboratório. Consideraram-se resultados positivos com base em testes estatísticos de significância em $p < 0,05$, como o two-way Anova seguido do teste de Dunnett (LEVY et al., 2019; ZEIGER et al., 2023; EGOROVA & ILYUSHINA, 2024).

Resultados e Discussões

Durante os processos de renovação das cepas TA100 e TA98 foi verificado o genótipo das cepas, confirmando que estavam dentro dos resultados esperados. A Figura 1 exemplifica as placas de teste de genótipo realizadas durante as renovações da TA100, na qual foi verificada a sensibilidade à tetraciclina (Fig. 1A), visto que houve inibição de crescimento na estria do antibiótico ao qual essas cepas não possuem resistência, o que não foi observado na placa de teste de resistência à ampicilina (Fig. 1B) que confirma a presença do plasmídeo pKM101 que confere resistência a essas cepas. Além disso, observa-se o halo de inibição de crescimento na placa de teste da mutação RFA (Fig. 1C) que torna a membrana lipopolissacarídica das bactérias mais permeável e as sensibiliza ao corante cristal violeta (SALVADORI et al., 2021).

As placas que atestam a característica-chave das bactérias implementadas no teste de Ames comprovam a dependência de histidina das cepas (Fig. 1D e 1E) devido à ausência de crescimento na placa contendo apenas biotina e à presença de crescimento na placa suplementada com histidina e biotina.

A placa de teste da mutação UVrB (Fig. 1F) que sensibiliza as bactérias à luz, especialmente ultravioleta, confirmou o genótipo esperado para a cepa TA100, no qual se observou a inibição do crescimento na metade irradiada (por 10 segundos) da placa.

A maioria dos resultados esperados para a TA100 e TA98 também eram esperados para a TA102, com exceção das placas de teste de resistência à tetraciclina (Fig. 1A e 2A) que demonstraram que não houve inibição do crescimento da cepa TA102 (Fig. 2A) e as placas de teste da mutação UVrB (Fig. 1F e 2F), cujo esperado era um crescimento mínimo da TA102 sob a região irradiada da placa (Fig. 2F).

Além disso, foram realizados estudos com placas teste de reversão espontânea durante as renovações executadas nos últimos meses, que confirmaram o funcionamento esperado da cepa TA98, dentro dos intervalos descritos na literatura para reversão espontânea, porém, a cepa TA100 apresentou valores abaixo dos valores de referência para a taxa de reversão espontânea (CETESB L5. 241, 1991; OECD TG471, 2020; SALVADORI et al., 2021), embora tenham sido consistentes a cada renovação. Com esta consistência nos resultados na taxa de reversão espontânea e a manutenção no genótipo da cepa, poderemos considerar estes valores como padronizados internamente no nosso laboratório para validar resultados de ensaios comparados a esse valor padronizado internamente (LEVY et al., 2019; SALVADORI et al., 2021; EGOROVA & ILYUSHINA, 2024).

Nesse sentido, a cepa TA102 já apresentava crescimento muito abaixo do esperado (Tabela 1) e, após 3 tentativas de renovação sem sucesso, na qual não havia crescimento da TA102 nas placas de reversões, ou crescimento mínimo (cerca de 10% do mínimo esperado), os estudos com essa cepa serão descontinuados e serão adquiridos novos estoques para verificar a funcionalidade adequada da cepa para que novas amostras possam ser testadas, visto que essa cepa é a mais sensível devido à presença de várias cópias do gene defeituoso da histidina em seus plasmídeos pAQ1 e pode prover resultados relevantes devido à ausência da mutação

UVrB que permite avaliar genotoxicidade por dano oxidativo, além de ser sensível a mutações em pares de base diferentes das outras cepas (MORTELMANS, 2019; SALVADORI et al., 2021).

Conclusão

A cepa TA98 está padronizada para futuros ensaios de mutagenicidade com amostras, realizando o Ensaio de Kado a partir do Teste de Ames para garantir melhor eficiência no uso das amostras e maior sensibilidade. Os valores de reversão espontânea da TA100 aparentam estar em normalização, indicando que, conforme os procedimentos de renovação são executados, os estoques vão estabilizando. Caso futuras renovações mantenham esses valores em uma faixa padrão, poderão ser padronizados internamente no laboratório para validar futuros ensaios com amostras.

As renovações da cepa TA102 sugerem que ela esteja alterada e inválida para ensaios, portanto não será usada até que estoques novos sejam solicitados e seu genótipo seja testado e validado. Dessa forma, se torna essencial a manutenção e execução de renovações com as cepas, mantendo-as estáveis para que a investigação da mutagenicidade das amostras seja confiável e significativa.

Referências

- Kristien Mortelmans, Errol Zeiger, The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 455, Issues 1–2, 2000, Pages 29–60, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6).
- Oxana Olegovna Zaitseva, Marta Igorevna Sergushkina, Andrey Nikolaevich Khudyakov, Tatyana Vitalyevna Polezhaeva, Olga Nurzadinovna Solomina, Seaweed sulfated polysaccharides and their medicinal properties, Algal Research, Volume 68, 2022, 102885, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102885>.
- Zeiger, E. (2023) Determination of a positive response in the Ames Salmonella mutagenicity assay. Environmental and Molecular Mutagenesis, 64(4), 250–258. Available from: <https://doi.org/10.1002/em.22538>
- Paul Baldrick, Genotoxicity test battery – An assessment of its utility in early drug development, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volumes 868–869, 2021, 503388, ISSN 1383-5718, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503388>.
- Kado NY, Langley D, Eisenstadt E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. Mutat Res. 1983 Jul;121(1):25-32. doi: 10.1016/0165-7992(83)90082-9. PMID: 6306458.
- OECD (2020), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Norma CETESB L5.241: – Teste de Kado – Ensaio de microssuspensão com Salmonella typhimurium – Método de ensaio. São Paulo, 1991.
- Kristien Mortelmans, A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay, Mutation Research/Genetic

Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 841, 2019, Pages 14-16, ISSN 1383-5718, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.004>.

Salvadori DMF, Takahashi CS, Grisolia CK, Santos RA. Da Toxicogenética À Toxicogenômica, 1 ed., 84-112, 2021 Aug. ISBN 978-65-5586-335-2.

Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Mar;70(3):782-6. doi: 10.1073/pnas.70.3.782. PMID: 4577135; PMCID: PMC433358.

Dan D. Levy, Errol Zeiger, Patricia A. Escobar, Atsushi Hakura, Bas-jan M. van der Leede, Masayuki Kato, Martha M. Moore, Kei-ichi Sugiyama, Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test), Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 848, 2019, 403074, ISSN 1383-5718, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004>.

Egorova, Olga & Ilyushina, Nataliya. (2024). Standardization of criteria for interpreting the results of mutagenicity assessment in the Ames test. Toxicological Review. 32. 313-321. 10.47470/0869-7922-2024-32-5-313-321.

Anexos

Figura 1 Resultados de genótipo da renovação da TA 100. As placas verificam: A) presença do plasmídeo pAQ1; B) presença do plasmídeo pKM101; C) mutação RFA; D & E) dependência de histidina e F) mutação UVrB.

Figura 2 Resultados de genótipo da renovação da TA 102. As placas verificam: A) presença do plasmídeo pAQ1; B) presença do plasmídeo pKM101; C) mutação RFA; D & E) dependência de histidina e F) mutação UVrB

Tabela 1 Resultados de taxa de reversão espontânea observados durante as renovações das cepas TA98, TA100 e TA102. A, B e C se referem às placas preparadas de cada inóculo, sendo que foram preparados 2 inóculos para cada renovação de cada cepa.

Equação 1

CÓDIGO: SB0816

AUTOR: LUISA DE SOUSA FRAZAO

ORIENTADOR: ALIANDA MAIRA CORNELIO DA SILVA

TÍTULO: EXPRESSÃO DE FOS NO CORPO CALOSO: POSSÍVEL
BIOMARCADOR COMPARTILHADO ENTRE ANSIEDADE E ESCLEROSE
MÚLTIPLA

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória e neurodegenerativa que acomete o sistema nervoso central, caracterizando-se pela desmielinização axonal e perda progressiva de funções motoras, sensitivas, cognitivas e visuais. Afeta predominantemente mulheres jovens entre 20 e 40 anos, gerando impacto clínico, social e econômico significativo. O corpo caloso destaca-se entre as regiões mais vulneráveis à desmielinização, sendo sua atrofia um achado frequente. Evidências recentes sugerem que o estresse oxidativo e a ativação exacerbada de células imunes residentes, como microglia e astrócitos, contribuem para a perpetuação da neuroinflamação e para a falha nos mecanismos de reparo. Nesse processo, a proteína Fos, integrante do complexo AP-1, desempenha papel importante na regulação da resposta inflamatória e morte celular. Além disso, observa-se alta prevalência de transtornos de ansiedade em indivíduos com EM, o que reforça a hipótese de uma relação bidirecional entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, neurodegeneração e sintomas psiquiátricos. Assim, a investigação da expressão da proteína Fos em modelos experimentais de ansiedade pode fornecer subsídios para elucidar mecanismos patogênicos da EM e indicar potenciais alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Ansiedade. Estresse Oxidativo. Brasil.

TITLE: Investigation of the Effect of Phytol Nanoemulsion on the Behavior of Rats
Exposed to the Elevated Plus Maze

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, and neurodegenerative disease that affects the central nervous system, characterized by axonal demyelination and progressive loss of motor, sensory, cognitive, and visual functions. It predominantly affects young women between 20 and 40 years of age, leading to significant clinical, social, and economic impact. The corpus callosum is among the most vulnerable regions to demyelination, with its atrophy being a frequent finding. Recent evidence suggests that oxidative stress and the exacerbated activation of resident immune cells, such as microglia and astrocytes, contribute to the persistence of neuroinflammation and the failure of repair mechanisms. In this context, the Fos protein, a component of the AP-1 complex, plays an important role in regulating inflammatory responses and cell death. Furthermore, a high prevalence of anxiety disorders has been reported in MS patients, supporting the hypothesis of a bidirectional relationship between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neurodegeneration, and psychiatric symptoms. Thus, investigating Fos protein expression in experimental models of anxiety may provide insights into the pathogenic mechanisms of MS and highlight potential therapeutic targets.

Keywords: Multiple Sclerosis. Anxiety. Oxidative Stress. Brazil.

Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune crônica que acomete o sistema nervoso central (SNC), caracterizada por inflamação persistente, desmielinização axonal e consequente degeneração neural progressiva, resultando em déficits motores, sensitivos, visuais, cognitivos e esfinterianos (Multiple Sclerosis Brain]; Gokce et al., 2023). A epidemiologia da doença ainda não é totalmente compreendida; contudo, sabe-se que sua prevalência é maior em adultos jovens, especialmente mulheres entre 20 e 40 anos, gerando elevado impacto clínico, social e econômico (Ward & Goldman, 2022; Kuhlmann & Antel, 2023). Clinicamente, a EM apresenta quatro formas principais: recorrente-remitente, progressiva primária, progressiva secundária e progressiva recidivante (Ward & Goldman, 2022). Entre os sinais e sintomas mais comuns destacam-se fadiga, dor crônica, espasticidade, déficit de deambulação, além de manifestações neuropsiquiátricas (Khouzam, 2022; Ayache & Chalah, 2024).

Estudos de neuroimagem mostram que múltiplas estruturas encefálicas podem ser acometidas, com destaque para o corpo caloso, considerado uma das regiões mais vulneráveis à desmielinização inflamatória e ao dano axonal, sendo sua atrofia um achado frequente em pacientes com EM (Pozzilli et al., 1992; Bagchi et al., 2023; Gustavsen et al., 2021). Evidências recentes têm reforçado o papel do estresse oxidativo na progressão da doença, uma vez que o desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e o sistema antioxidante celular favorece a perpetuação da neuroinflamação (Voet et al., 2019; Linnerbauer et al., 2020; Tobore, 2021). Nesse contexto, a ativação exacerbada de células imunes residentes, como microglia e astrócitos, contribui para a liberação de mediadores inflamatórios e moléculas pró-oxidativas, dificultando a remielinização e promovendo a degeneração neuronal (Voet et al., 2019; Linnerbauer et al., 2020).

Entre os marcadores moleculares associados a esse processo, destaca-se a proteína Fos, produto do gene c-fos, que forma o complexo AP-1, regulador da expressão gênica em resposta a estímulos inflamatórios, fatores de crescimento e estresse celular (Thimraj et al., 2018; Zahradníčková et al., 2003; Silva et al., 2023). A superestimulação da via AP-1 está relacionada à cronicidade da inflamação, à morte celular e ao agravamento da neurodegeneração. Paralelamente, estudos apontam que a proteína Fos está envolvida em manifestações psicológicas, como os transtornos de ansiedade, frequentemente observados em indivíduos com EM (Calhoun et al., 2023; Silic et al., 2023).

A ansiedade é atualmente uma das comorbidades mais prevalentes nesses pacientes, com estimativas de até 36% dos casos, além de ser considerada fator de risco para progressão cognitiva e maior disfunção sináptica (Šilić et al., 2023; Sun et al., 2023; Zhang et al., 2023; Menculini et al., 2023). Dados epidemiológicos recentes apontam que o Brasil está entre os países com maiores taxas de prevalência de transtornos ansiosos, especialmente entre mulheres em idade produtiva, reforçando a relevância clínica e social do tema (Javaid et al., 2023). Além disso, a teoria da interação bidirecional entre ansiedade e função mitocondrial sugere que o estresse oxidativo e a inflamação contribuem para o agravamento da neurodegeneração em doenças como a EM (Filiou & Sandi, 2019).

Dessa forma, ressalta-se que há poucos estudos usando fêmeas e avaliação de comportamentos do tipo ansiosos, assim como, são poucos os estudos que os correlacionam com a EM. Desse modo, aqui foi realizado um ensaio comportamental usando ratas expostas

a um modelo de ansiedade, com dados discutidos a luz da terapêutica padrão para o manejo deste problema e associação com a EM, visando expor possíveis lacunas nas pesquisas atuais e propor uma nova visão acerca dessas patologias.

Metodologia

Aspectos Éticos:

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), sob o número de protocolo 362.047/2023, e estão em conformidade com as diretrizes internacionais para pesquisa com animais de laboratório. Todos os equipamentos utilizados foram devidamente higienizados antes e após o manejo dos animais, a fim de garantir biossegurança e reduzir riscos de contaminação.

Animais:

Foram utilizadas ratas Wistar (185–280 g), provenientes do biotério central da UFRN, mantidas em grupos de cinco animais por caixa, em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00 h), com temperatura e umidade controladas. Os animais tiveram livre acesso a água e ração padrão, exceto nos momentos de realização dos testes. As ratas foram submetidas a coleta de esfregaço vaginal durante cinco dias consecutivos antes do teste, além do dia de realização do experimento, para determinação da fase do ciclo estral. O procedimento foi conduzido de acordo com a técnica descrita por Goldman, Murr e Cooper (1986).

Procedimentos experimentais:

Os animais foram previamente manipulados por dois dias, incluindo simulação da injeção, para ambientação. No dia do teste, após pesagem, foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais ($n=7-8$) e receberam injeção por via intraperitoneal, de veículo (Tween 80 a 0,1% diluído em solução salina 0,9%) ou diazepam (2mg/kg), conforme protocolos consolidados em estudos de ansiedade experimental (Calhoun et al., 2023; Šilić et al., 2023).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE), em madeira, composto por dois braços abertos (50×10 cm) e dois braços fechados ($50 \times 10 \times 40$ cm), dispostos perpendicularmente em torno de uma plataforma central de 10×10 cm, e elevado a 50 cm do solo; foi usado como modelo para mimetizar o transtorno de ansiedade generalizado nos roedores. Esse modelo, baseado no conflito etológico entre exploração e aversão a espaços abertos, é validado e amplamente usado para estudos psicofarmacológicos (Pellow et al., 1985; Walf & Frye, 2007).

Após trinta minutos da administração do tratamento, conforme informado anteriormente, cada animal foi exposto ao LCE por 5 minutos, em ambiente controlado de luminosidade e sonoridade, sendo registrado por um sistema de câmera-computador. Noventa minutos após a sessão no LCE, os animais foram profundamente anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PBS). Os encéfalos foram removidos e crioprotetidos em sacarose 30%, posteriormente seccionados em plano coronal com criostato, em cortes de 30 μ m, para coloração de Nissl e imunohistoquímica.

Análise dos Dados:

A análise comportamental foi realizada com auxílio do software “X-Plo-Rat 2005” e Anymaze. Os parâmetros analisados foram a frequência de entradas (definida pela passagem das quatro patas) e o tempo gasto nos braços (abertos e fechados) e na plataforma central. Com esses dados, calcularam-se: a percentagem de entradas e de tempo nos braços abertos, um índice de ansiedade e a exploração total (Lee et al., 2018). Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. e analisados no IBM SPSS Statistics 24.0 e OriginLab. Após a verificação de homogeneidade pelo teste de Levene, as comparações foram realizadas por ANOVA, seguida do teste de Duncan post-hoc para dados homogêneos. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

O teste comportamental foi conduzido com 14 ratas, classificadas pelo esfregaço vaginal em fases do ciclo estral: 10 em proestro/estro (P/E) e 4 em metaestro/diestro (M/D). O tratamento com Diazepam resultou em um aumento significativo tanto na porcentagem de entradas quanto no tempo de permanência nos braços abertos, em comparação ao grupo veículo (Figura 1). Quando separados de acordo com o ciclo estral (Figura 2), o mesmo padrão de resposta ao Diazepam foi observado, independentemente da fase, sugerindo que o efeito ansiolítico pode não ser modulado pelas flutuações hormonais. Contudo, a análise estatística para o grupo M/D foi inviabilizada, pois apenas uma rata classificada nessa fase recebeu Diazepam, uma limitação decorrente da dificuldade de sincronização do ciclo estral.

O número de entradas nos braços fechados dos animais que receberam Diazepam foi inferior ao observado nas ratas do grupo veículo, com resultados independentes da fase do ciclo estral (Figura 3). Esse dado pode indicar um possível efeito sedativo, e para confirmar essa informação, foi calculado a distância total percorrida pelos animais no labirinto (Figura 4), no qual os animais que receberam Diazepam se locomoveram menos quando comparado ao grupo veículo. Esses resultados podem ser devido ao efeito do diazepam, que é um

benzodiazepínico modulador positivo dos receptores GABAA. Já veio a luz que as mulheres são mais susceptíveis aos efeitos adversos de fármacos psicotrópicos quando comparado ao sexo masculino, e um recente estudo revelou efeitos sedativos do diazepam em camundongos C57BL/6J, contudo, o efeito era independente do sexo (PÁDUA-REIS et al., 2021).

Ja um estudo de 2016 com seres humanos, indica que o ciclo ovariano influencia significativamente os efeitos agudos do diazepam em mulheres, levando a respostas que variam de sedação sem ansiólise (fase folicular) a nenhum efeito (fase lútea). No entanto, os homens apresentaram diminuição da ansiedade sem sedação após a medicação. Isso permite fazer um paralelo com nossos dados e destaca a importância de considerar o sexo e a fase do ciclo ovariano no contexto da psicofarmacologia (ALMEIDA et al., 2016).

Ademais, com base nos dados coletados, calculamos também o índice de ansiedade, como revelado na Figura 5. Apesar dos resultados que indicam um potencial sedativo, também observamos um efeito ansiolítico significativo dos animais que receberam o fármaco ansiolítico. Neste sentido, ressalta-se que ao considerar a forte associação entre a Esclerose Múltipla (EM) e o estresse oxidativo, consegue-se estabelecer um paralelo com transtornos psiquiátricos como a ansiedade (OHL; TENBROCK; KIPP, 2016). Isso, pois o estresse oxidativo e, por conseguinte, fatores de inflamação estão presentes também na ansiedade.

O efeito ansiolítico do diazepam observado neste modelo experimental, destacam-se ao associar aos sintomas de ansiedade na EM, que podem ser impulsionados por ambientes neuroinflamatórios e oxidativos. Isto pois, os sintomas neuropsiquiátricos na EM, incluindo a ansiedade, estão intimamente ligados a estados de neuroinflamação e estresse oxidativo, e em estudo prévio, demonstra-se que o diazepam confere neuroproteção contra a excitotoxicidade e o estresse oxidativo via mecanismos que envolvem a proteção mitocondrial (SARNOWSKA et al., 2009).

Ademais, os resultados observados neste estudo, sobretudo em fêmeas, também evidenciam-se devido a EM, assim como os transtornos de ansiedade, serem prevalentes em mulheres (ZHANG et al., 2023). Assim, a melhora nos parâmetros comportamentais identificadas poderem se estender a alguma modulação de processos celulares deletérios, conectando diretamente o alívio da ansiedade à atenuação de um dos aspectos fisiopatológicos centrais da EM (HANNA; STROBER, 2020).

Todavia, um recente estudo revelou o potencial possivelmente deletério do diazepam, associando-o a proteína TSPO, hiperativação da micróglia e degeneração neuronal (SHI; CUI; HERMS, 2025). Assim, os próximos passos desse estudo irão investigar a presença de moléculas inflamatórias (citocinas) e proteínas de ativação neuronal (Fos) no tecido encefálico dos animais aqui estudados, por meio de técnicas histológicas e moleculares, como citometria e imunohistoquímica. Os tecidos encefálicos estão sendo processados e realizada a colocação de Nissl, como visualizado na Figura 6.

Conclusão

Concluindo, o diazepam exibiu um efeito ansiolítico e, sedativo, nas ratas, independente do ciclo estral. Os dados observados aqui exaltam a necessidade de maior exploração do potencial do Diazepam, visto que este resultado pode estar associado a alguma promoção da neuroproteção contra o estresse oxidativo, ponto relevante para a EM, uma doença em que é comum apresentar como comorbidade a ansiedade. Assim, os dados coletados e em combinação com estudos moleculares, previstos para o futuro, auxiliaram a sanar essa lacuna presente na literatura, além de auxiliar em um novo olhar acerca da terapia farmacológica na EM associada a ansiedade.

Referências

- (1). Multiple Sclerosis Brain: Beyond Hyperintense Images. International journal of radiology and imaging technology. [s.l: s.n.].
- (2) GOKCE, Seyda Figul et al. The role of systemic immune inflammatory index in showing active lesion in patients with multiple sclerosis. BMC Neurology, v. 23, n. 1, 10 fev. 2023.
- (3) WARD, M.; GOLDMAN, M. D. Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Sclerosis. Continuum, v. 28, n. 4, p. 988–1005, 1 ago. 2022.
- (4). KUHLMANN, T.; ANTEL, J. Multiple sclerosis: 2023 update. Free neuropathology, v. 4, 2023.
- (5). KHOUZAM, H. R.; PSYCHIATRIST, MENTAL HEALTH CLINIC -VA CENTRAL CALIFORNIA HEALTH CARE SYSTEM (VACCHCS), FRESNO, CALIFORNIA, USA & HEALTH SCIENCES CLINICAL PROFESSOR OF PSYCHIATRY, UCSF- FRESNO DEPARTMENT OF PSYCHIATRY, FRESNO, CALIFORNIA, USA. The psychiatric manifestations of multiple sclerosis and their treatment. Journal of Spine Research & Reports, p. 1–6, 2022.
- (6) AYACHE, S. S.; CHALAH, M. A. Neuroimaging and neuromodulation of invisible symptoms in multiple sclerosis. Frontiers in human neuroscience, v. 18, 22 fev. 2024.

- (7) POZZILLI et al. Relationship between corpus callosum atrophy and cerebral metabolic asymmetries in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, v. 112, n. 1-2, p. 51–57, 1 out. 1992.
- (8). BAGCHI, S.; GLUCK, L.; CHRISTOPHER, L. Managing the symptoms of multiple sclerosis. *Medical research archives*, v. 11, n. 2, 2023.
- (9). GUSTAVSEN, S. et al. The association of selected multiple sclerosis symptoms with disability and quality of life: a large Danish self-report survey. *BMC neurology*, v. 21, n. 1, p. 317, 2021.
- (10) VOET, S.; PRÍNCIPE, M.; VAN LOO, G. Microglia na inflamação do sistema nervoso central e patologia da esclerose múltipla. *Tendências Mol. Med*, v. 25, p. 112–123, 2019.
- (11) LINNERBAUER, M.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron*, v. 108, n. 4, p. 608–622, 2020.
- (12) TOBORE, T. O. Oxidative/nitroxidative stress and multiple sclerosis. *Journal of molecular neuroscience: MN*, v. 71, n. 3, p. 506–514, 2021.
- (13) THIMRAJ, T. A. et al. Oxidative Signaling in Chronic Obstructive Airway Diseases. In: *Immunity and Inflammation in Health and Disease*. Elsevier eBooks, p. 79–98, 1 jan. 2018.
- (14) ZAHRADNÍČKOVÁ, E. et al. c-Fos but not v-Fos protein induces programmed cell death of v-myb-transformed monoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, n. 12, p. 2736–2748, 1 dez. 2003.
- (15) SILVA et al. Shared Molecular Signatures Across Zika Virus Infection and Multiple Sclerosis Highlight AP-1 Transcription Factor as a Potential Player in Post-ZIKV MS-Like Phenotypes. *Molecular neurobiology*, v. 60, n. 8, p. 4184–4205, 13 abr. 2023.
- (16) CALHOUN, C. A. et al. Chronic mild stress induces differential depression-like symptoms and c-Fos and 5HT1A protein levels in high-anxiety female Long Evans rats. *Behavioural brain research*, v. 438, p. 114202–114202, 1 fev. 2023.
- (17) ŠILIĆ, P.; MOTL, R. W.; DUFFECY, J. Multiple sclerosis and anxiety: Is there an untapped opportunity for exercise? *Multiple sclerosis and related disorders*, v. 73, p. 104698–104698, 1 maio 2023.
- (18) JAVAID et al. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. *Middle East Current Psychiatry*, v. 30, n. 1, 26 maio 2023.
- (19) SUN, L. et al. Anxiety adds the risk of cognitive progression and is associated with axon/synapse degeneration among cognitively unimpaired older adults. *EBioMedicine*, v. 94, p. 104703–104703, 1 ago. 2023.
- (20) ZHANG, X. et al. The prevalence and risk factors of anxiety in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in neuroscience*, v. 17, 17 abr. 2023.
- (21) MENCULINI, G. et al. Clinical correlates of state and trait anxiety in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders*, v. 69, p. 104431–104431, 1 jan. 2023.

- (22) FILIOU, M. D.; SANDI, C. Anxiety and Brain Mitochondria: A Bidirectional Crosstalk. Trends in neurosciences, v. 42, n. 9, p. 573–588, 1 set. 2019.
- (23) GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth defects research, v. 80, n. 2, p. 84–97, 6 mar. 2007.
- (24) OHL, K.; TENBROCK, K.; KIPP, M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. Experimental Neurology, v. 277, p. 58–67, mar. 2016.
- (25) HANNA, M.; STROBER, L. B. Anxiety and depression in Multiple Sclerosis (MS): Antecedents, consequences, and differential impact on well-being and quality of life. Multiple Sclerosis and Related Disorders, v. 44, p. 102261–102261, 6 jun. 2020.
- (26) ZHANG, X. et al. The prevalence and risk factors of anxiety in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. Frontiers in Neuroscience, v. 17, 17 abr. 2023.
- (27) SARNOWSKA, A. et al. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects. Neurochemistry International, v. 55, n. 1-3, p. 164–173, 1 jan. 2009.
- (28) ALMEIDA, A et al. Are Women Sensitive to the Acute Anxiolytic Effect of Diazepam? Journal of Depression and Anxiety, v. 5, n. 3, 2016.
- (29) PÁDUA-REIS, M. et al. Diazepam causes sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice. Scientific Reports, v. 11, n. 1, 29 abr. 2021.
- (30) SHI, Y.; CUI, M.; HERMS, J. BENZODIAZEPINE DIAZEPAM INDUCES COGNITIVE IMPAIRMENT VIA TRANSLOCATOR PROTEIN (18 KDA): IMPLICATIONS ON DEMENTIA. International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 28, n. Supplement_1, p. i295–i296, fev. 2025

Anexos

Figura 1 - Porcentagem de entradas (azul) e de permanência (branco) de ratas expostas ao LCE previamente tratadas com Diazepam e/ou Veículo.

Figura 2 - Porcentagem de entradas (rosa/azul) e de permanência (branco/roxo) de ratas expostas ao LCE previamente tratadas com Diazepam e/ou Veículo, separadas segundo fase do ciclo estral (M/D) (P/E).

Figura 3 - Número de entradas nos braços fechados de ratas expostas ao LCE previamente tratadas com Diazepam e/ou Veículo, separadas segundo fase do ciclo estral (branco-M/D) (rosa-P/E).

Figura 4 - Distância total percorrida pelas ratas no LCE previamente tratadas com Diazepam e/ou Veículo.

Figura 5 - Índice de ansiedade das ratas expostas ao LCE previamente tratadas com Diazepam e/ou Veículo.

Figura 6 - Corte coronal encefálico após coloração de Nissl.

CÓDIGO: SB0826

AUTOR: VITORIA LAISA AVELINO DE CARVALHO

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO GALVAO BARBOZA

TÍTULO: EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRADIAÇÃO NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE PRÉ-OSTEOBLASTOS CULTIVADOS SOB ESTRESSE NUTRICIONAL

Resumo

A fotobiomodulação (FBM) tem se destacado como uma estratégia promissora para estimular processos regenerativos em tecidos mineralizados. Este estudo avaliou o efeito de diferentes protocolos de FBM sobre a viabilidade e proliferação de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sob condição de estresse nutricional. As células foram mantidas em meio α -MEM sem soro fetal bovino e irradiadas com laser de diodo InGaAlP nos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (790 nm), em doses de 1, 4 e 6 J/cm², aplicadas de forma única ou múltipla (T0, 24h e 48h). A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas pelo ensaio Alamar Blue® nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação. Os resultados demonstraram que a irradiação única com laser infravermelho foi mais eficaz em estimular a proliferação celular, com destaque para a dose de 6 J/cm² ($p < 0,05$). Em contraste, o laser vermelho não promoveu efeitos significativos, e a aplicação de múltiplas irradiações não apresentou benefícios adicionais. Além disso, o modelo de estresse nutricional mostrou-se adequado, evidenciando maior sensibilidade celular à FBM nessas condições. Conclui-se que a eficácia da FBM depende do comprimento de onda, da dose aplicada e do número de irradiações. Estudos futuros devem investigar marcadores osteogênicos e mecanismos moleculares para aprofundar a compreensão dos efeitos da FBM e ampliar seu potencial uso terapêutico no reparo ósseo.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; Lasers de baixa intensidade; Osteoblastos

TITLE: EFFECT OF PHOTOBIMODULATION WITH DIFFERENT IRRADIATION PROTOCOLS ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF PRE-OSTEOBLASTS CULTURED UNDER NUTRITIONAL STRESS

Abstract

Photobiomodulation (PBM) has emerged as a promising strategy to stimulate regenerative processes in mineralized tissues. This study evaluated the effect of different PBM protocols on the viability and proliferation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts cultured under nutritional stress conditions. Cells were maintained in α -MEM medium without fetal bovine serum and irradiated with an InGaAlP diode laser at red (660 nm) and infrared (790 nm) wavelengths, at doses of 1, 4, and 6 J/cm², applied either once or in multiple sessions (T0, 24h, and 48h). Cell viability and proliferation were assessed using the Alamar Blue® assay at 24, 48, and 72

hours after the first irradiation. Results demonstrated that single-session infrared laser irradiation was more effective in stimulating cell proliferation, particularly at the 6 J/cm² dose ($p < 0.05$). In contrast, red laser irradiation showed no significant effects, and multiple irradiations did not provide additional benefits. Furthermore, the nutritional stress model proved to be suitable, as it highlighted an increased cellular sensitivity to PBM under these conditions. In conclusion, the efficacy of PBM depends on the wavelength, dose, and number of irradiations. Future studies should investigate osteogenic markers and molecular mechanisms to better understand PBM-induced effects and expand its therapeutic potential in bone repair.

Keywords: Photobiomodulation; Low-level laser therapy; Osteoblasts

Introdução

O aumento da expectativa de vida humana, impulsionado pelos avanços da medicina e de outras áreas da ciência, trouxe inúmeros benefícios à sociedade, mas também impôs novos desafios à saúde pública. Entre eles, destacam-se as doenças associadas ao envelhecimento, incluindo aquelas que afetam diretamente o tecido ósseo. A perda de massa e de função óssea, decorrente de traumas, lesões, doenças degenerativas ou do próprio processo de envelhecimento, gera impactos que variam desde a morbidade individual até elevados custos socioeconômicos. Diante desse cenário, torna-se evidente a necessidade de desenvolver estratégias mais eficazes para a prevenção, o tratamento e a regeneração do tecido ósseo (Black et al., 2015).

O osso é um tecido fundamental para o funcionamento do organismo humano. Além de fornecer suporte mecânico e proteger estruturas vitais, como o cérebro e a medula espinhal, participa ativamente da regulação dos níveis de cálcio e atua como nicho para a hematopoiese. Essas funções dependem do processo contínuo de remodelação óssea, no qual ocorre a renovação do tecido por meio da ação coordenada de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, e osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz mineralizada (Amaroli et al., 2020; Bikmulina et al., 2022).

Os osteoblastos, derivados de células-tronco mesenquimais, desempenham papel central na osteogênese, pois sintetizam e mineralizam a matriz óssea orgânica. Sua elevada capacidade de diferenciação e atividade metabólica faz deles um modelo celular amplamente utilizado em estudos que investigam os mecanismos de formação e reparo ósseo. Nesse contexto, pesquisas recentes têm explorado o potencial dessas células em abordagens inovadoras, como a fotobiomodulação (Henry ; Bordoni, 2020; Sousa et al., 2025).

A fotobiomodulação (FBM) consiste na aplicação de luz em baixa intensidade para modular funções celulares sem a necessidade de fotossensibilizadores externos, o que a diferencia das terapias fotodinâmica e fototérmica. Trata-se de uma técnica não invasiva e segura, com evidências crescentes de eficácia na regulação de vias relacionadas à proliferação celular, diferenciação e síntese de matriz extracelular, processos diretamente envolvidos na regeneração tecidual (Raja et al., 2024).

Diversos estudos indicam que os efeitos da FBM podem ser potencializados em condições de estresse, como a deficiência nutricional. Esse tipo de estresse simula ambientes de hipóxia e limitação de nutrientes, semelhantes ao microambiente de tecidos ósseos submetidos a sobrecarga mecânica ou vascularização deficiente. Nessas circunstâncias, a carência de glicose e oxigênio compromete a atividade celular, mas a FBM tem se mostrado capaz de estimular respostas adaptativas, promovendo a sobrevivência, a diferenciação e a regeneração das células ósseas (Basso et al., 2016; Laffitte et al., 2024).

Diante dessas evidências, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do protocolo de fotobiomodulação na atividade biológica de células MC3T3-E1 submetidas a condição de estresse nutricional.

Metodologia

Cultivo celular

Foram utilizadas células MC3T3-E1, linhagem de pré-osteoblastos derivada da calvária de camundongos (ATCC, EUA), amplamente empregada em estudos de diferenciação osteoblástica. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em frascos de 75 cm² contendo meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B; Gibco, EUA). As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas, e os subcultivos foram realizados quando a confluência atingiu aproximadamente 70%. Para os ensaios, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA a 0,25% e semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 5×10^3 células/poço. Após 24 horas em meio completo, o meio foi substituído por meio sem SFB (0%), induzindo estresse nutricional.

Irradiação com laser de baixa intensidade

As células mantidas em meio sem SFB foram submetidas à fotobiomodulação com laser de diodo InGaAlP (Kondortech, Brasil), em dois comprimentos de onda: vermelho (660 nm) e infravermelho (790 nm). O equipamento operou em modo contínuo, com potência de 30 mW, área do feixe de 0,01 cm² e aplicação perpendicular à placa, a uma distância de 0,5 cm. Foram testadas doses de 1, 4 e 6 J/cm², correspondentes a tempos de exposição de 33, 132 e 198 segundos, respectivamente. A irradiação foi realizada em aplicação única (T0) ou múltipla (T0, T24h e T48h). As placas foram organizadas com poços alternados vazios para prevenir a dispersão da luz.

Análise da viabilidade e proliferação celular

A atividade celular foi avaliada pelo ensaio Alamar Blue® (Invitrogen, EUA). Para isso, as células foram cultivadas em sextuplicata para cada grupo experimental. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação, foram adicionados 10 μ L do reagente e 90 μ L de meio fresco em cada poço, seguidos de incubação por 4 horas. As leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. Os resultados foram expressos como percentual de redução, de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Como apresentaram distribuição gaussiana, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Dunn, considerando-se diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Efeito da fotobiomodulação com laser infravermelho e vermelho

A análise da proliferação celular, avaliada pelo ensaio de redução do Alamar Blue, revelou diferenças significativas entre os grupos irradiados com laser infravermelho e o grupo controle ao longo do período experimental. Após 24 horas da primeira irradiação, observou-se um aumento significativo da atividade metabólica nas células tratadas com laser de 790 nm (infravermelho), nas doses de 1 J/cm² e 6 J/cm² (Figura 1), em comparação ao grupo controle não irradiado ($p < 0,05$). No grupo submetido à irradiação única, o padrão de resposta foi mantido nas avaliações subsequentes: após 48 horas, o grupo IV6 (790 nm, 6 J/cm²) continuou apresentando aumento significativo da proliferação celular em relação ao controle ($p < 0,05$). Em 72 horas, tanto os grupos IV1 quanto IV6 mantiveram diferenças estatisticamente significativas, reforçando o efeito positivo da aplicação única de laser infravermelho nessas condições experimentais.

Figura 1 – Redução percentual do Alamar blue nos grupos submetidos à irradiação única ao longo do experimento. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão do percentual de redução do Alamar blue de experimentos realizados em sextuplicata ($n = 6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ANOVA seguida de pós-teste de Dunn.

Em contraste, os grupos submetidos a mais duas irradiações (Figura 2) não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das doses ou tempos avaliados em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem que a repetição das aplicações não potencializou a resposta celular aos efeitos da fotobiomodulação.

Figura 2 – Redução percentual do Alamar blue nos grupos submetidos à irradiação múltipla ao longo do experimento. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão do percentual de redução do Alamar blue de experimentos realizados em sextuplicata ($n = 6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ANOVA seguida de pós-teste de Dunn. ns: diferença não significativa.

Além disso, não foram observados efeitos significativos nos grupos irradiados com luz vermelha (660 nm) em nenhuma das condições avaliadas (única ou múltipla, em todas as doses), sugerindo menor eficácia desse comprimento de onda no modelo experimental estudado.

Comparação entre protocolos de irradiação única e múltipla

A comparação entre os protocolos de irradiação única e múltipla evidenciou diferenças significativas principalmente nos grupos irradiados com laser infravermelho (Figura 3). No grupo IV1, a irradiação única (IV1u) promoveu maior proliferação celular em 72 horas em relação à condição múltipla (IV1m) ($p < 0,05$). Para IV4, não houve diferenças entre os protocolos. Já no grupo IV6, a aplicação única (IV6u) resultou em maior atividade metabólica e proliferação em 48 e 72 horas comparada à múltipla (IV6m) ($p < 0,05$).

Figura 3 – Comparação da viabilidade nos grupos irradiados com diferentes doses do laser infravermelho (IV) ao longo do experimento, considerando irradiação única (u) ou múltipla (m). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão do percentual de redução do Alamar blue

de experimentos realizados em sextuplicata ($n = 6$). $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; ANOVA seguida de pós-teste de Dunn. ns: diferença não significativa.

Nos grupos tratados com laser vermelho (Figura 4), observou-se padrão semelhante: os grupos V1u, V4u e V6u apresentaram maior proliferação celular em 72 horas quando comparados às respectivas condições de irradiação múltipla ($p < 0,05$).

Figura 4 – Comparação da viabilidade nos grupos irradiados com diferentes doses do laser vermelho (V) ao longo do experimento, considerando irradiação única (u) ou múltipla (m). Os dados representam média $\pm$ desvio padrão do percentual de redução do Alamar blue de experimentos realizados em sextuplicata ($n = 6$). $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; ANOVA seguida de pós-teste de Dunn. ns: diferença não significativa.

Avaliação da proliferação celular

A análise dos dados de redução do Alamar Blue® permitiu avaliar a proliferação celular ao longo do experimento (Figura 5). No grupo controle, observou-se uma curva crescente de proliferação, com diferenças significativas entre todos os intervalos avaliados. Padrão semelhante foi identificado nos grupos de irradiação única com laser infravermelho (IV1u, IV4u e IV6u) e no grupo irradiado com laser vermelho a 4 J/cm^2 (V4u). Além disso, houve aumento progressivo e significativo da proliferação nos grupos de irradiações múltiplas com laser vermelho a 1 e 6 J/cm^2 (V1m e V6m). Nos demais subgrupos, não foram observadas diferenças significativas entre os intervalos, indicando que a proliferação não se manteve ao longo de todo o experimento.

Figura 4 – Proliferação celular em cada subgrupo ao longo do experimento, estimada a partir da redução percentual do Alamar Blue. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em sextuplicata ($n = 6$). $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$; ANOVA seguida de pós-teste de Dunn.

DISCUSSÃO

A viabilidade e a proliferação dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 foram avaliadas por meio do ensaio Alamar Blue®, considerado um método confiável, sensível e não destrutivo. O teste baseia-se na conversão da resazurina (corante azul) em resorufina (rosa fluorescente), processo que reflete diretamente o metabolismo celular e permite acompanhar a atividade das células ao longo do tempo (Rampersad, 2012).

Os resultados demonstraram que a fotobiomodulação (FBM) com laser infravermelho (790 nm) foi mais eficiente do que o laser vermelho (660 nm) para estimular a proliferação celular sob condições de estresse nutricional, especialmente nas doses de 1 e 6 J/cm^2 , quando aplicadas apenas uma vez. Esses achados estão em concordância com Laffitte et al. (2024), que também observaram aumento da viabilidade e da proliferação de pré-osteoblastos irradiados com laser infravermelho após 72 horas, confirmado por análises do ciclo celular e ensaios de morte celular (Annexin V/PI).

Outro aspecto relevante foi que a aplicação única do laser apresentou efeito mais favorável do que as múltiplas irradiações. Esse comportamento pode ser explicado pela curva bifásica da

resposta à FBM, segundo a qual doses ou frequências excessivas podem reduzir, ou até inibir, os efeitos bioestimulantes (Crous ; Abrahamse, 2021).

Além disso, o modelo de estresse nutricional empregado mostrou-se adequado, uma vez que as células reagiram de forma diferenciada ao estímulo da FBM. Esses resultados corroboram estudos que indicam uma resposta celular mais acentuada em condições de déficit nutricional, possivelmente relacionada ao aumento do estado redox e à maior sensibilidade à luz fotobiomoduladora (Laffitte et al., 2024; Zaccara et al., 2018; Pirkmajer ; Chibalin, 2011).

Conclusão

O protocolo de irradiação única com laser infravermelho ($\lambda = 790$ nm) na dose de 6 J/cm² foi o mais eficaz para estimular a proliferação de pré-osteoblastos MC3T3-E1 em condições de estresse nutricional. Por outro lado, o laser vermelho ($\lambda = 660$ nm) e a aplicação de múltiplas irradiações não apresentaram benefícios adicionais no modelo experimental utilizado.

Em síntese, o estudo demonstra que a eficácia da fotobiomodulação (FBM) está diretamente relacionada ao comprimento de onda, à dose aplicada e ao número de irradiações. Estudos futuros devem investigar marcadores osteogênicos e mecanismos moleculares para compreender melhor os efeitos da FBM sobre o reparo ósseo e ampliar seu potencial uso terapêutico.

Referências

- ADDISON, W. N. et al. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. *Bone*, v. 71, p. 244-256, 2015.
- ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.
- AMARASEKARA, D. S.; KIM, S.; RHO, J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 6, p. 2851, 2021.
- AMAROLI, A. et al. Interaction between Laser Light and Osteoblasts: Photobiomodulation as a Trend in the Management of Socket Bone Preservation—A Review. *Biology*, v. 9, n. 11, 2020.
- AMAROLI, A. et al. The photobiomodulation of bone: a systematic review of the literature. *Lasers in Medical Science*, v. 35, p. 573–582, 2020. DOI:.
- BASSO, F. G. et al. Nutritional deprivation and LPS exposure as feasible methods for induction of cellular stress—A methodology to validate for in vitro photobiomodulation studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 159, p. 205–210, 2016.
- BIKMULINA, P. et al. Photobiomodulation in 3D tissue engineering. *Journal of Biomedical Optics*, v. 27, n. 9, 2022.
- BIKMULINA, P. et al. Role of osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and their relation to bone diseases. *Journal of Bone Biology and Osteopathy*, v. 10, n. 2, p. 123–131, 2022.
- BLACK, C. R. M. et al. Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports*, v. 1, n. 3, p. 132–140, 2015.
- CAETANO-LOPES, J.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Osteoblasts and Bone Formation. *Acta Reumatologica Portuguesa*, v. 32, p. 103–110, 2007.

- CAVALCANTI, R. B. L. Efeito do laser de baixa intensidade na atividade biológica de células-tronco do ligamento periodontal humano cultivadas sobre arcabouços de quitosana. 2019. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- CHEN, X. et al. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective Tissue Research*, v. 59, n. 2, p. 99-107, 2018.
- COMPSTON, J. E.; MCCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. Osteoporosis. *Lancet*, v. 393, n. 10169, p. 364-376, 2019.
- CROUS, A.; ABRAHAMSE, H. The signalling effects of photobiomodulation on osteoblast proliferation and differentiation: a review. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 17, p. 1570–1589, 2021.
- DA FONSECA, G. et al. Laser-photobiomodulation on titanium implant bone healing in rat model: comparison between 660- and 808-nm wavelength. *Lasers in Medical Science*, v. 37, n. 4, p. 2179–2184, 2022.
- DA SILVA, P. C. et al. Laser treatment contributes to maintain membrane integrity in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) under nutritional deficit. *Lasers in Medical Science*, v. 34, n. 1, p. 15-21, 2018.
- DA SILVA, T. G.; RIBEIRO, R. S.; MENCALHA, A. L.; FONSECA, A. S. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. *Lasers in Medical Science*, v. 38, n. 1, p. 136, 2023.
- 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, n. 3, p. 7000417, 2016.
- DEANA, A. M. et al. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cells: a review. *Lasers in Medical Science*, v. 33, n. 5, p. 1147-1158, 2018.
- DOMPE, C. et al. Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 6, p. 1724, 2020.
- GARZÓN, J.; BALDION, P. A.; GRAJALES, M.; ESCOBAR, L. M. Response of osteoblastic cells to low-level laser treatment: a systematic review. *Lasers in Medical Science*, v. 37, p. 3031–3049, 2022.
- GINANI, F. et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Lasers in Medical Science*, v. 33, n. 1, p. 95-102, 2018.
- GLASS, G. E. Photobiomodulation: A review of the molecular evidence for low level light therapy. *Journal of Plastic, Reconstructive ; Aesthetic Surgery*, v. 74, n. 5, 2021.
- HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 349–355, 2003. DOI:.
- HENRY, J. P.; BORDONI, B. Histology, Osteoblasts. Disponível em:.
- HENRY, T. S.; BORDONI, B. Embryology, Craniofacial. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. Disponível em:.. Acesso em: 22 maio 2025.
- HOSSEINPOUR, S.; FEKRAZAD, R.; ARANY, P. R.; YE, Q. Molecular impacts of photobiomodulation on bone regeneration: A systematic review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 149, p. 147-159, 2019.
- INCERTI-PARENTI, S.; CHECCHI, L.; FINI, M.; TSCHON, M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Optics*, v. 19, n. 10, p. 108002, 2014.
- KARO USSIS, I. K. et al. Nd:YAG laser radiation (1.064 nm) accelerates differentiation of osteoblasts to osteocytes on smooth and rough titanium surfaces in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, v. 28, n. 7, p. 785–790, 2017.

- KARTSOGIANNIS, V.; NG, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 228, n. 1-2, p. 79-102, 2004.
- KHORSANDI, K.; HOSSEINZADEH, R.; ABRAHAMSE, H.; FEKRAZAD, R. Biological responses of stem cells to photobiomodulation therapy. *Current Stem Cell Research and Therapy*, v. 15, p. 400-413, 2020.
- LAFFITTE, C. M. et al. Effect of nutritional stress and photobiomodulation protocol on in vitro viability and proliferation of murine preosteoblast cells. *Lasers in Medical Science*, v. 39, n. 1, p. 289, 2024.
- LU, P.; PENG, J.; LIU, J.; CHEN, L. The role of photobiomodulation in accelerating bone repair. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 188, p. 55-67, 2024.
- MOURA-NETTO, C. et al. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Brazilian Oral Research*, v. 30, n. 1, e.80, 2016.
- OLIVEIRA, F. A. et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 163, p. 14-21, 2016.
- OLIVEIRA, F. A. et al. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 169, p. 35-40, 2017.
- PACHECO, P. S. et al. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pre-osteoblast growth and differentiation. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 31, n. 5, p. 225–229, 2013.
- PIRKMAJER, S.; CHIBALIN, A. V. Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 301, n. 2, p. C272–C279, 2011.
- PONZETTI, M.; RUCCI, N. Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 6651, 2021.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.
- RAJA, I. S. et al. Tailoring photobiomodulation to enhance tissue regeneration. *Biomaterials*, v. 309, p. 122623, 2024.
- SABINO, V. G. et al. Laser therapy increases the proliferation of preosteoblastic MC3T3-E1 cells cultured on poly(lactic acid) films. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 14, p. 1792–1803, 2020.
- SOUSA, N. A. de et al. Aplicação das Células-Tronco da Polpa Dentária na Regeneração Óssea: Uma Análise da Literatura Científica. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 7, n. 4, p. 309–327, 2025.
- SOUSA, M. G. et al. Potencial regenerativo das células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos (SHED) na engenharia tecidual óssea. *Revista Brasileira de Odontologia Regenerativa*, v. 12, n. 1, p. 45–58, 2025.

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

CÓDIGO: SB0837

AUTOR: CECILIA CERQUEIRA SOUZA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Análise histopatológica das alterações em glândulas salivares menores de palato duro e mole proveniente da indução do câncer oral.

Resumo

O carcinoma epidermóide é o sétimo câncer mais comum no mundo, com uma incidência anual de aproximadamente 700.000 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 que é o mais prevalente nessa região anatômica, possui fundamental importância no que diz respeito a investigação do aparecimento de lesões que representam estágios evolutivos de malignidade. Desta forma, o presente projeto objetiva realizar a análise histopatológica e histomorfométrica das lesões em glândulas salivares menores no palato, relacionadas ao processo de evolução da carcinogênese oral quimicamente induzida em ratos. Sendo assim, foi realizado um estudo utilizando ratos da linhagem Wistar, os quais foram submetidos a indução de carcinogênese quimicamente, com posterior análise histopatológica de alterações em glândulas salivares menores de palato. Os achados do presente estudo demonstraram que as alterações ductais foram superiores às da porção secretora, evidenciando que, possivelmente, a evolução gradativa das alterações do epitélio repercutem para a porção ductal.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermóide. Histopatologia. Palato. Carcinogênese.

TITLE: Histopathological analysis of changes in minor salivary glands of the hard and soft palate resulting from the induction of oral cancer

Abstract

Squamous cell carcinoma is the seventh most common cancer worldwide, with an annual incidence of approximately 700,000 cases and an estimated mortality rate of 350,000 in 2018 (MACHIELS, J.-P. et al, 2020). Understanding the development of oral cancer, especially squamous cell carcinoma, which is the most prevalent in this anatomical region, is fundamental for investigating the appearance of lesions that represent evolutionary stages of malignancy. Therefore, this project aims to perform the histopathological and histomorphometric analysis of lesions in minor salivary glands of the palate, related to the evolution of chemically induced oral carcinogenesis in rats. Therefore, a study was conducted using Wistar rats, which underwent chemically induced carcinogenesis, with subsequent histopathological analysis of alterations in minor salivary glands of the palate. The findings of the present study demonstrated that ductal alterations were greater than those in the

secretory portion, demonstrating that, possibly, the gradual evolution of epithelial alterations has repercussions on the ductal portion.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Histopathology. Palate. Carcinogenesis.

Introdução

1.INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide é o sétimo câncer mais comum no mundo, com uma incidência anual de aproximadamente 700.000 e uma taxa de mortalidade estimada em 350.000 em 2018 (MACHIELS, J.-P. et al, 2020). No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte por doença, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) indicam que o câncer oral é o sétimo tumor mais incidente na população brasileira. O INCA estimou para o ano de 2006, 13.470 novos casos da doença (BRASIL, 2005). O carcinoma epidermóide oral (CEO) tem origem nos tecidos epiteliais e os locais mais acometidos são borda lateral de língua, lábio inferior e assoalho de boca. Entretanto, qualquer superfície bucal 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). Os principais fatores de risco relacionados ao carcinoma epidermóide são: tabaco, álcool, noz-de-areca (em países asiáticos) e o Papilomavírus Humano (HPV) (BARSOUK, Adam et al, 2023). Contudo, dentre todos os fatores de risco, o uso do tabaco é o principal contribuinte para o desenvolvimento do CEO (JAGADEESAN, Dharshini et al, 2024). O câncer de lábio é uma das mais frequentes neoplasias malignas da cavidade oral provavelmente devido esta localização anatômica ser mais facilmente diagnosticada, apresentando um melhor prognóstico e uma sobrevida de 5 anos ou mais, em comparação ao câncer de língua (LUNA-ORTIZ et al, 2004). Já o carcinoma epidermóide de palato mole é considerado relativamente raro em comparação à outras regiões (LI, Meng-hua et al, 2025)

O entendimento do processo de desenvolvimento do câncer oral, em especial do carcinoma epidermóide que é o mais prevalente nessa região anatômica, possui fundamental importância no que diz respeito a investigação do aparecimento de lesões que representam estágios evolutivos de malignidade, tais como as displasias epiteliais, os carcinomas in situ e o carcinoma epidermóide. Pouco se sabe a respeito das repercussões em glândulas salivares menores palatinas durante o processo evolutivo de indução da carcinogênese oral, visto que as glândulas salivares menores palatinas apresentam ductos excretores que se comunicam com a superfície do palato (duro e mole), podendo ser uma via de propagação do carcinoma epidermóide para essas glândulas salivares. Desta forma, o presente projeto objetiva realizar a análise histopatológica das lesões em glândulas salivares menores no palato, relacionadas ao processo de evolução da carcinogênese oral quimicamente induzida em ratos.

Metodologia

2.METODOLOGIA

2.1.Caracterização do Estudo

Esta pesquisa consiste em uma análise clínica descritiva e comparativa das lesões de glândulas salivares menores, quimicamente induzidas pelo 4-NQO em ratos e que pertençam ao espectro de malignidade. O protocolo experimental foi submetido a análise da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), com parecer aprovado n. 317.051/2022.

2.3 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 será aferido a cada 7 dias, o consumo de água e ração por gaiola foi averiguado todos os dias ao longo das 37 semanas experimentais. A amostra será constituída por 50 ratos Wistar machos adultos, sendo 10 ratos constituindo o grupo controle (GC), e 40 ratos que constituirão o grupo experimental por um tempo máximo de 37 semanas:

2.4. Protocolo de indução

1. Água filtrada contendo 4NQO (Hidratação) e ração à vontade (Ad libitum);
2. Eutanásia com injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina 5% e Xilazina 2% (0,3ml/100g);
3. Análise da lesão em palato na cavidade oral;
4. Remoção do Palato (Duro e Mole) do rato e colocação em formol à 10%;
5. Confecção das lâminas histológicas e utilização de microscopia de luz;
6. Análise histopatológica das alterações em glândulas salivares menores de palato decorrentes da indução química da carcinogênese.

2.5. Análise histopatológica

A análise histopatológica das lesões em glândulas salivares menores de palato duro foi feita em 45 lâminas coradas em hematoxilina-eosina. As lâminas foram divididas de 8 à 30 semanas, enquanto o grupo de ratos foi de 1 à 7. Os parâmetros analisados foram se havia ou não: degeneração, fibrose e displasia de túbulo mucoso; ectasia, metaplasia e hiperplasia ductal; invasão neoplásica, área de infiltrado inflamatório e área de eosinofilia.

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos serão submetidos a testes estatísticos apropriados, com o objetivo de testar as hipóteses aventadas no presente estudo. Os dados serão digitados originalmente na planilha eletrônica Excel (Microsoft Windows XP Home edition®) e posteriormente exportados para o formato DBF (Data Base Format), para poderem ser lidos pelo programa GraphPad Instat (GraphPad Instat version 3.00 for Windows 95®, GraphPad Software, San Diego, Califórnia-USA), onde serão feitas as análises.

2.7. Implicações éticas

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” 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), tendo parecer aprovado N. 317.051/2022.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS

3.1. Análise do tempo de indução

O tempo de indução (figura 2) variou em um período de 8 à 30 semanas, sendo o de 23 semanas com a maior expressividade de casos (100%), enquanto o menor foi nos períodos de 22, 25 e 26 semanas, o qual apresentou um percentual aproximado de 21,43%. Houve uma constância de concentração de casos no período entre 8 e 16 semanas (71,43%).

3.2. Análise das alterações em glândula tubulosa mucosa de palato

Com a análise das amostras, houve como resultado a presença de degeneração de glândulas tubulosas mucosas (Figura 3) em 90,91% (n=40) das amostras de palato, enquanto ausentes foram 9,09% (n=4) das amostras. Já em relação à fibrose em glândula tubulosa mucosa (Figura 4) esteve presente em 54,55% (n=24) e ausente em 45,45% (n=20) das amostras analisadas. Houve presença também de displasia das células tubulosas mucosas (Figura 5) em 86,36% (n=38) e ausência em 11,36% (n=5) das amostras.

3.3. Parâmetros das alterações ductais na glândula salivar menor de palato

Em relação às alterações presentes e ausentes na porção excretora da glândula, apresentou ectasia ductal (Figura 6) em 75% (n=33) e ausência em 25% (n=11). Além disso, também destacou-se a presença de displasia ductal (Figura 7) em 86,36% (n=38) e ausência em 13,64% (n=6). Já a metaplasia ductal (Figura 8), houve presença em 63,64% (n=28) das

amostras e ausentes foram 36,36% (n=16). Amostras da glândula com presença de hiperplasia ductal (Figura 9) foram 59,09% (n=26) e ausentes 40,91% (n=18).

3.4. Infiltrado inflamatório linfocitário, invasão neoplásica e área de eosinofilia

O infiltrado inflamatório (Figura 10) esteve presente em 100% (n=44) das amostras, já a invasão neoplásica (Figura 11) apresentou um percentual de 56,82% (n=19) de presença e 43,18% (n=25). Levando em consideração todos os parâmetros, a área de eosinofilia (Figura 12) apresentou o maior percentual de ausência, isto é, 63,64% (n=28) e 36,36% (n=16) de presença nas amostras.

3.5. Fotomicrografias das amostras analisadas

Fotomicrografia (figura 13) apresentando áreas de infiltrado inflamatório, invasão neoplásica, áreas de displasia, metaplasia, hiperplasia e ectasia ductal. Além disso, também houve a presença de áreas de necrose glandular.

4. DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) representa mais de 90% de todos os cânceres orais e é o CEO mais frequente da região de cabeça e pescoço, sendo o tabaco, o uso abusivo de álcool e a noz-de-areca os principais fatores de risco (FELLER, Gal et al., 2023). Os locais mais comuns da cavidade oral de acometimento pelo carcinoma epidermóide oral são a língua e o assoalho de boca, representando aproximadamente 34% dos casos cada local, enquanto em região de palato duro apresentam-se em 2,6% dos casos (STEPAN, Katelyn O. et al., 2023). No presente estudo, analisou-se de modo cuidadoso tanto o componente secretor quanto o componente excretor das glândulas salivares menores de palato, os resultados indicaram claramente um alto grau de alterações patológicas na glândula, com o decorrer da evolução do processo carcinogênico. Dentre as alterações ductais presentes, houve a ectasia, a displasia, a metaplasia e a hiperplasia (figura 13), sendo a displasia ductal a mais expressiva dentre os casos. Já as alterações nas glândulas tubulosas mucosas de palato foram: degeneração, fibrose e displasia tubular. Porém, poucos estudos foram feitos para analisar os efeitos do carcinoma epidermóide sob as glândulas salivares menores.

A hiperplasia é caracterizada pelo aumento no número do mesmo tipo de células, enquanto a metaplasia é a transformação de um epitélio em outro tipo epitelial. Ademais, evidenciou-se que o grau de displasia em um ducto glandular intensifica-se com o aumento da gravidade no epitélio (MOHAN, Sunil Paramel et al., 2016). Enquanto neste estudo apresentou 63,64% de metaplasia e 59,09% de hiperplasia, no estudo de BHOLA, Ridhi et al. houve, de 94 casos, 16% com a presença de metaplasia e 53% de casos com hiperplasia ductal, além de muitos casos revelarem acúmulo de muco no lúmen ductal. Essa discrepância pode estar relacionada com o tempo de indução das amostras.

Além disso, houve uma resposta inflamatória em todos os casos (44), a qual evidencia o grau de resposta do organismo frente às células neoplásicas. Contudo, estudos mostram que o microambiente formado pelas células inflamatórias e moléculas secretadas por células

imunes, contribuem para a sobrevivência, proliferação e disseminação neoplásica (LU, Wanlu et al., 2013). Em relação à invasão neoplásica, demonstrou uma taxa de 56,82% de 44 casos, tal fator pode ser justificado pela invasão das células tumorais ao estroma, as quais sofrem uma transição-epitelial-mesenquimal, que resulta na perda de adesão entre células e o aumento da capacidade invasiva (BHOLA, Ridhi et al., 2023).

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Apesar de o palato não ser o local de maior incidência da doença, o conhecimento dos efeitos do carcinoma epidermóide oral sob as glândulas salivares menores de palato é essencial, tanto no âmbito histopatológico, quanto clínico. A resposta inflamatória foi presente em todas as amostras. As alterações ductais foram superiores às da porção secretora, evidenciando que, possivelmente, a evolução gradativa das alterações do epitélio repercutem para a porção ductal. Além disso, é evidente a necessidade de mais pesquisas em relação às alterações de glândulas tubulosas mucosas de palato, visto que há uma pequena quantidade de estudos na literatura.

Referências

6. REFERÊNCIAS

- MACHIELS, J.-P. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, v. 31, n. 11, p. 1462-1475, 2020.
- BARSOUK, Adam et al. Epidemiology, risk factors, and prevention of head and neck squamous cell carcinoma. *Medical Sciences*, v. 11, n. 2, p. 42, 2023.
- JAGADEESAN, Dharshini et al. Comprehensive insights into oral squamous cell carcinoma: diagnosis, pathogenesis, and therapeutic advances. *Pathology-Research and Practice*, v. 261, p. 155489, 2024.
- LI, Meng-hua et al. Treatment Outcomes of Squamous Cell Carcinoma of the Soft Palate and the Prognostic Significance of HPV/p16 Status. *Head & Neck*, 2025.
- STEPAN, Katelyn O. et al. Changing epidemiology of oral cavity cancer in the United States. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, v. 168, n. 4, p. 761-768, 2023.
- FELLER, Gal et al. Tumour genetic heterogeneity in relation to oral squamous cell carcinoma and anti-cancer treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 20, n. 3, p. 2392, 2023.
- BHOLA, Ridhi 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.

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: JCDR*, v. 10, n. 7, p. ZC12, 2016.

LU, Wanlu et al. Inflammation promotes oral squamous carcinoma immune evasion via induced programmed death ligand-1 surface expression. *Oncology letters*, v. 5, n. 5, p. 1519-1526, 2013.

HAY, Ashley 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.

PARK, Song 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, p. 881, 2020.

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.

SPEIGHT, Paul M. Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. *Head and neck pathology*, v. 1, n. 1, p. 55-60, 2007.

CUFFARI, Linneu et al. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 102, n. 1, p. 56-61, 2006.

FAN, Kang-Hsing 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.

KREPPPEL, Matthias 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, Kuauhyama et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. *Oral oncology*, v. 40, n. 10, p. 992-999, 2004.

NI, Yanhong et al. Loss of NF- κ B1 and c-Rel accelerates oral carcinogenesis in mice. *Oral diseases*, v. 27, n. 2, p. 168-72, 2021.

REYES, Montserrat et al. Wnt/ β -catenin signaling in oral carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 13, p. 4682, 2020.

RIVERA, César. Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 8, n. 9, p. 11884, 2015.

SAWANT, Sharada et al. Role of electron microscopy in early detection of altered epithelium during experimental oral carcinogenesis. *Microscopy and Microanalysis*, v. 25, n. 6, p. 1367-1375, 2019.

SHANTI, Rabie M.; O'MALLEY, Bert W. Surgical management of oral cancer. *Dental Clinics*, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2018.

SLOAN, P. et al. Malignant surface epithelial tumours: squamous cell carcinoma. WHO Classification of Tumours of the Head and Neck, v. 4, p. 105-132, 2017.

SUPSAVHAD, Wachiraphan et al. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. The Veterinary Journal, v. 210, p. 7-16, 2016.

PANNELLINI, Tania et al. A dietary tomato supplement prevents prostate cancer in TRAMP mice. Cancer prevention research, v. 3, n. 10, p. 1284-1291, 2010.

Anexos

Figura 1 - Protocolo de Indução

Figura 2 - Resultados – Análise Histopatológica de Palato (Glândulas Salivares Menores)

Figura 3 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Degeneração de Tubulosas Mucosas

Figura 4 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Fibrose em Glândula Tubulosa Mucosa

Figura 5 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Displasia em Túbulo Mucoso

Figura 6 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Ectasia Ductal

Figura 7 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Displasia Ductal

Figura 8 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Metaplasia Ductal

Figura 9 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Hiperplasia Ductal

Figura 10- Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Infiltrado inflamatório linfocitário

Figura 11 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Invasão Neoplásica

Figura 12 - Lesão em Glândula Salivar Menor de Palato / Área de Eosinofilia

Figura 13 - Fotomicrografias

CÓDIGO: SB0839

AUTOR: GUILHERME BASTOS ALVES

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: Identificação de Compostos Terapêuticos que Visam a Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) por meio de Docking Molecular, Simulações de Dinâmica Molecular e Cálculos DFT

Resumo

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é um alvo validado em câncer, mas inibidores aprovados, como o duvelisibe, apresentam limitações de segurança. Avaliamos derivados do ácido gálico como possíveis inibidores de PI3K por meio de um fluxo computacional objetivo: filtragem por PASS, checagens de drug-likeness/ADMET, docking em PI3K γ , cálculos DFT e simulações de dinâmica molecular de 500 ns, tendo o duvelisibe como referência. De 90 moléculas, cinco (21, 37, 44, 68 e 75) foram priorizadas. Os compostos 21 e 68 tiveram melhor desempenho no docking e estabeleceram contatos consistentes no sítio ativo; o 68 manteve pose estável na MD e apresentou perfil farmacocinético/toxicológico relativamente favorável. Estimativas por MM-PBSA e análises QM/MM indicaram interações eletrostáticas mais favoráveis para 21 e 68 em comparação ao duvelisibe. Em conjunto, derivados do ácido gálico, especialmente o 68, despontam como pontos de partida realistas para otimização de inibidores de PI3K e merecem validação experimental.

Palavras-chave: Ácido Gálico. PI3K. Docking Molecular. ADMET. Simulação de DM.

TITLE: Identification of Therapeutic Compounds Targeting Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Through Molecular Docking, Dynamics Simulation, and DFT Calculations

Abstract

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is a validated cancer target, but approved inhibitors such as duvelisib have safety issues. We evaluated gallic-acid derivatives as potential PI3K inhibitors using a straightforward computational workflow: PASS filtering, drug-likeness/ADMET checks, docking to PI3K γ , DFT calculations, and 500-ns molecular-dynamics simulations, with duvelisib as reference. From 90 candidates, five (21, 37, 44, 68, 75) were prioritized. Compounds 21 and 68 ranked highest in docking and formed consistent contacts in the active site; compound 68 kept a stable pose during MD and showed a comparatively favorable pharmacokinetic/toxicological profile. MM-PBSA estimates and QM/MM analyses supported more favorable electrostatics for 21 and 68 than for duvelisib. Overall, gallic-acid derivatives, especially 68, stand out as realistic starting points for PI3K inhibitor optimization and merit experimental follow-up.

Keywords: Gallic Acid. PI3K. Molecular Docking. ADMET. MD simulation.

Introdução

O câncer permanece entre as principais causas de mortalidade no mundo e decorre, em grande medida, de proliferação celular descontrolada. Nesse contexto, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) ocupa papel central na regulação de crescimento e sobrevivência celular e é frequentemente encontrada desregulada em tumores, o que a consolida como alvo terapêutico validado. Embora existam inibidores aprovados de PI3K, como o duvelisibe, limitações de segurança e farmacocinética ainda são relevantes e motivam a busca por alternativas com melhor perfil benefício-risco.

Derivados do ácido gálico despontam como candidatos promissores. O ácido gálico é um composto fenólico natural com amplo espectro farmacológico — incluindo atividades antimicrobiana, neuroprotetora, anti-inflamatória e cardioprotetora — e destaque para propriedades antineoplásicas, o que o qualifica como arcabouço químico atrativo para desenho de inibidores.

Frente aos custos e prazos do desenvolvimento farmacêutico, abordagens computacionais permitem priorizar compostos de forma racional, reduzindo tempo, recursos e experimentação desnecessária. Integrações de docking molecular, simulações de dinâmica molecular (MD), cálculos de teoria do funcional da densidade (DFT), análises ADMET e otimização QM/MM fornecem informações complementares sobre orientação preferencial ligante-alvo, estabilidade conformacional, energias de interação e propriedades de segurança, auxiliando a seleção de candidatos mais promissores para validação experimental.

À luz desse cenário, o presente estudo teve por objetivo identificar potenciais inibidores de PI3K entre derivados do ácido gálico, empregando um fluxo integrado que combina triagem por PASS, drug-likeness/ADMET, docking, MD, DFT, QM/MM e estimativas de energia livre de ligação, utilizando o duvelisibe como referência. Cinco derivados selecionados a partir de um conjunto inicial foram examinados em profundidade, buscando-se elucidar o perfil de interação com PI3K e priorizar estruturas com propriedades farmacocinéticas e toxicológicas mais favoráveis.

Metodologia

O estudo adotou um fluxo computacional integrado para identificar derivados do ácido gálico com potencial inibitório sobre a PI3K. As estruturas de 21, 37, 44, 68, 75 e do padrão duvelisibe foram obtidas no PubChem, seguidas de otimização geométrica com force field do tipo Dreiding e minimização em duas fases via CHARMM/SmartMinimizer, em meio com dielétrico dependente da distância parametrizado pelo GAFF, empregando Steepest Descent e amostragem conformacional sistemática/estocástica com Boltzmann jump para gerar conformações de baixa energia. A caracterização eletrônica foi conduzida por DFT (B3LYP/6-311++G(3df,3pd)), calculando energias total e de coesão, orbitais HOMO/LUMO, gap, momento de dipolo, energia/solvatação dielétrica, superfície acessível ao solvente e volume de cavidade, além de descritores derivados (potencial de ionização, afinidade eletrônica, dureza/suavidade, potencial químico, eletronegatividade e eletrofilicidade). O alvo proteico foi a PI3Kγ co-cristalizada com PIKIn2 (PDB 5JHA); a preparação envolveu limpeza de ligantes/água, ajuste de protonação e definição do sítio ativo a partir do ligante co-cristalizado. O docking dos candidatos selecionados foi realizado no PyRx e as poses foram analisadas no UCSF ChimeraX; a validação empregou re-docking com avaliação de RMSD. As propriedades drug-likeness/ADMET foram previstas a partir de SMILES utilizando um painel de servidores (ADMETlab 3.0, pkCSM, vNN-ADMET, Pred-hERG 5.0, ADVERPred,

PreADMET e ADMET-AI), incluindo estimativas de lipofilicidade, massa molecular, biodisponibilidade oral, volume de distribuição, penetração em barreiras, interação com P-gp, perfil de metabolismo por CYP e indicadores de toxicidade clínica (DILI, AMES, hERG). Para os complexos priorizados (21, 68 e controle), foram realizadas simulações de dinâmica molecular de 500 ns no GROMACS 2020 com force field CHARMM36, parametrização via CHARMM-GUI, água TIP3P, neutralização iônica e 0,015 M de NaCl; aplicaram-se restrições LINCS para ligações envolvendo hidrogênio e PME para interações eletrostáticas. As trajetórias foram avaliadas por RMSD, RMSF, raio de giro, número de pontes de hidrogênio e análise de componentes principais em ferramentas do GROMACS, VMD e QTGRACE. A partir de janelas representativas, a energia livre de ligação foi estimada por MM-PBSA (MMPBSA.py/AMBER) com decomposição padrão, e realizou-se otimização local QM/MM no Gaussian (ONIOM), mantendo o sítio ativo no nível B3LYP/6-311G(d,p) e a proteína no nível clássico, permitindo o movimento de resíduos em torno do ligante. As interações foram inspecionadas no Discovery Studio Visualizer e no LigPlot+ PoseView, classificando contatos hidrogenados, hidrofóbicos, eletrostáticos, halogênicos e interações desfavoráveis; por fim, os resultados de docking, MD, MM-PBSA, QM/MM e ADMET foram integrados para priorização de derivados com melhor equilíbrio entre afinidade prevista, estabilidade conformacional e passivos farmacocinéticos/toxicológicos, em comparação ao duvelisibe.

Resultados e Discussões

A triagem inicial por PASS indicou, entre mais de 90 derivados do ácido gálico avaliados, maior probabilidade predita para atividade antineoplásica; desse conjunto, cinco moléculas (21, 37, 44, 68 e 75) foram priorizadas para análise aprofundada, juntamente com o duvelisibe como referência. Os escores (Pa) mais altos concentraram-se na categoria antineoplásica, o que reforçou a pertinência do alvo PI3K no escopo do estudo.

A caracterização drug-likeness/ADMET mostrou um contraste relevante entre os derivados e o padrão. Todos os derivados apresentaram massa molecular de 332,07 g/mol (duvelisibe: 416,12 g/mol). Em lipofilicidade, 21 (LogP 4,85) e 37 (4,92) foram os mais lipofílicos; 44 (3,99) e 75 (3,54) ficaram em faixa intermediária; e 68 destacou-se como o mais hidrofílico (2,66), sugerindo melhor solubilidade e absorção potencial (duvelisibe: 4,63). Em métricas farmacocinéticas e de segurança, o composto 68 reuniu aspectos favoráveis: maior fração livre prevista, volume de distribuição compatível, ausência de interações com P-gp e baixo risco de cardiotoxicidade, compondo um perfil globalmente equilibrado. Já 21 conjugou alta afinidade pelo alvo com passivos de ADMET (capacidade elevada de ligação por hidrogênio, violações de regra e alertas toxicológicos) que tenderiam a exigir otimização estrutural. O duvelisibe, por sua vez, apareceu com fração livre baixa, alta ligação a proteínas plasmáticas e achados negativos em segurança (incluindo inibição de hERG e genotoxicidade), sustentando seu papel de controle menos desejável em termos de margem terapêutica.

Os resultados de toxicidade in silico foram consistentes com esse panorama. Não houve indicação de inibição relevante de hERG para 68 e 75, ao contrário de 21, 37 e 44 (IC₅₀ na faixa de nanomolar), e o duvelisibe foi classificado como bloqueador de hERG (IC₅₀ submicromolar). Em mutagenicidade e carcinogenicidade, 68 e 75 apresentaram perfis negativos, enquanto 21, 37 e 44 foram positivos; o duvelisibe também figurou com alertas de genotoxicidade. Outros parâmetros favoreceram os derivados frente ao padrão: menor risco de DILI para todos, exceto o duvelisibe; MTD aceitável; ausência de sensibilização cutânea;

e não penetração de BBB. Ademais, 21/37/44 surgiram como substratos de P-gp, o que pode reduzir absorção; já 68/75 não exibiram interação com a bomba, o que contribui para melhor disponibilidade.

No docking contra PI3K γ (5JHA), 21 e 68 ocuparam as primeiras posições por afinidade e exibiram redes de interação compatíveis com ancoragem estável no sítio ativo. Para 21, observaram-se quatro ligações de hidrogênio (com LEU862, GLU852, ARG849 e GLU856), além de interações π -ânion com GLU852/ASP861 e π - π em T com TYR210. O 68 formou cinco ligações de hidrogênio (HIS295, LEU860, ASP861, GLN291 e GLU852), também com contatos π -ânion em GLU852/ASP861 e interação π - π (TYR210). O duvelisibe estabeleceu três ligações de H (GLU852, GLU856, TYR210), além de contato halogênio (GLN291) e interações π -alquil (ARG294, LYS298). Esses padrões sustentam a ocupação produtiva do bolso catalítico e antecipam estabilidade conformacional sob dinâmica.

As simulações de MD por 500 ns confirmaram a estabilidade dos complexos priorizados, com flutuações modestas e manutenção das interações ao longo do tempo, em linha com a inspeção das poses e com o mapa de contatos. Esse comportamento coeso em RMSD/RMSF, número de ligações de H e demais métricas de estabilidade é compatível com perfis de ligação sustentados.

A análise de energia livre por MM-PBSA (últimos 10 ns) corroborou a vantagem de 21 e 68 frente ao padrão. Os valores de ΔG_{bind} foram mais negativos para 21 ($-24,24$ kJ/mol) e 68 ($-23,88$ kJ/mol) do que para o duvelisibe ($-4,84$ kJ/mol), refletindo contribuições eletrostáticas mais favoráveis associadas a interações específicas com resíduos do sítio ativo. A decomposição mostrou termos eletrostáticos (ΔE_{eel}) substancialmente mais estabilizantes para 21/68, com compensações esperadas por polarização do solvente (ΔG_{PB}), mantendo a soma final mais favorável que a do controle.

Os refinamentos por QM/MM apontaram incremento expressivo das interações eletrostáticas após otimização, novamente superiores para 21 e 68 em relação ao duvelisibe. As energias finais de interação QM/MM (eletrostática e total) foram mais negativas para 21 e 68, sinalizando melhor complementaridade eletrônica no microambiente do sítio. Esses achados acomodam, de modo coerente, as tendências observadas em docking, MD e MM-PBSA.

Em síntese, os resultados convergem para duas mensagens principais. Primeiro, 21 e 68 se destacam por afinidade e estabilidade de ligação: redes de contatos com GLU852/GLU856/ASP861/LEU860-862/HIS295/GLN291 e interações aromáticas com TYR210 ajudam a explicar o desempenho superior, validado por dinâmica e energias livres; no entanto, diferenças de segurança e farmacocinética separam esses candidatos. O 68 reúne afinidade comparável à do 21 com um conjunto de propriedades ADMET mais favorável (fração livre, Vd, ausência de P-gp e risco cardiotoxico baixo), tornando-o prioritário para validação experimental. O 21, embora forte na interação com o alvo, demanda mitigação de passivos (p.ex., risco de hERG, alertas genotóxicos, efflux) por otimização química. Segundo, 75 surge como alternativa com bom equilíbrio ADMET, ainda que não figure entre os melhores em ligação; sua menor propensão a passivos de segurança o coloca como reserva estratégica para ciclos de desenho. O duvelisibe cumpre o papel de parâmetro comparativo, mas seus achados de segurança reforçam a necessidade de novos inibidores com melhor margem terapêutica. Em conjunto, os dados sustentam a continuidade do desenvolvimento pré-clínico dos derivados mais equilibrados, com ênfase no 68 e em rotas de modificação do 21 para reduzir riscos sem sacrificar afinidade.

Conclusão

O estudo identificou derivados do ácido gálico com potencial para inibir a PI3K γ a partir de um fluxo computacional integrado que combinou triagem inicial, caracterização eletrônica, docking, predições ADMET, dinâmica molecular, estimativas de energia livre e refinamento QM/MM. Entre os candidatos avaliados, os compostos 21 e 68 apresentaram desempenho superior em afinidade prevista e manutenção de contatos relevantes no sítio ativo ao longo da simulação, em comparação com o controle duvelisibe. A análise comparativa indicou que o 68 reúne o melhor equilíbrio entre ligação ao alvo e propriedades farmacocinéticas/toxicológicas previstas, configurando-se como a opção mais aderente para avanço. O composto 21, embora competitivo em ligação, mostrou passivos de ADMET que recomendam ajustes estruturais para mitigação de risco. Outros derivados avaliados apresentaram perfis intermediários e podem servir como base para ciclos de desenho e relação estrutura-atividade.

A concordância entre docking, dinâmica molecular, MM-PBSA e otimização QM/MM confere solidez às tendências observadas, sugerindo que as interações com resíduos-chave do sítio ativo sustentam a estabilidade dos complexos priorizados. Em paralelo, o conjunto de predições ADMET ajuda a antecipar limitações de segurança e de desempenho farmacocinético, orientando a priorização racional de candidatos.

Como limitações, trata-se de uma avaliação exclusivamente *in silico*, dependente de modelos, parâmetros e condições de simulação que simplificam o sistema biológico e não substituem ensaios experimentais. Assim, os resultados devem ser vistos como guia para etapas subsequentes. Em termos de perspectivas, recomenda-se a validação do composto 68, bem como a otimização do 21 visando reduzir passivos sem comprometer a afinidade pelo alvo. De modo geral, a estratégia computacional adotada demonstra utilidade para reduzir o espaço químico, priorizar estruturas com melhor relação benefício-risco e orientar o planejamento de estudos experimentais, contribuindo para acelerar a identificação de candidatos mais seguros e eficazes.

Referências

- Ahmad, I.; Khan, H.; Serdaroğlu, G. Physicochemical properties, drug likeness, ADMET, DFT studies, and *in vitro* antioxidant activity of oxindole derivatives. *Computational Biology and Chemistry*, v. 104, 107861, 2023.
- Amir, M. et al. Structural analysis and conformational dynamics of STN1 gene mutations involved in coat plus syndrome. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 6, p. 41, 2019.
- Anjum, F.; Rishi, V.; Ahmad, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1476, p. 75-84, 2000.
- Anwar, M. A.; Choi, S. Structure-activity relationship in TLR4 mutations: atomistic molecular dynamics simulations and residue interaction network analysis. *Scientific Reports*, v. 7, 43807, 2017.

Arnittali, M.; Rissanou, A. N.; Harmandaris, V. Structure of biomolecules through molecular dynamics simulations. *Procedia Computer Science*, v. 156, p. 69-78, 2019.

Badar, M. S. et al. Molecular dynamics simulations concept, methods, and applications. In: *Transdisciplinarity*. Springer, 2022. p. 131-151.

Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 5061-5084, 2010.

Bohnacker, T. et al. Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention. *Nature Communications*, v. 8, 14683, 2017.

Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M. J.; Simões, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, v. 19, p. 256-265, ago. 2013.

Bulychev, V.; Buturlimova, M.; Tokhadze, K. Calculation of vibrational spectroscopic and geometrical characteristics of the [F(HF)₂]- and [F(DF)₂]- complexes using the second-order vibrational perturbation theory and a 6D variational method. *The Journal of Chemical Physics*, v. 149, 2018.

Caminero Gomes Soares, A. et al. Absorption matters: A closer look at popular oral bioavailability rules for drug approvals. *Molecular Informatics*, v. 42, e202300115, 2023.

Chandraprasad, M. S.; Dey, A.; Swamy, M. K. Introduction to Cancer Treatment Approaches. In: *Paclitaxel*. Elsevier, 2022. p. 1-27.

Cholko, T. et al. A molecular dynamics investigation of CDK8/CycC and ligand binding: conformational flexibility and implication in drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 32, p. 671-685, 2018.

Chung, L. W. et al. The ONIOM method and its applications. *Chemical Reviews*, v. 115, p. 5678-5796, 2015.

Costa, A. C. et al. Impact of immune cells on the hallmarks of cancer: a literature review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 168, 103541, 2021.

Craveiro, N. S. et al. Drug withdrawal due to safety: a review of the data supporting withdrawal decision. *Current Drug Safety*, v. 15, p. 4-12, 2020.

Daoud, N. E. H. et al. ADMET profiling in drug discovery and development: perspectives of in silico, in vitro and integrated approaches. *Current Drug Metabolism*, v. 22, n. 7, p. 503-522, 2021.

Davids, M. S. et al. Efficacy and safety of duvelisib following disease progression on ofatumumab in patients with relapsed/refractory CLL or SLL in the DUO crossover extension study. *Clinical Cancer Research*, v. 26, p. 2096-2103, 2020.

- Debela, D. T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, v. 9, 20503121211034366, 2021.
- Essmann, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, v. 103, p. 8577-8593, 1995.
- Filimonov, D. et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, v. 50, p. 444-457, 2014.
- Flinn, I. W. et al. Duvelisib, a novel oral dual inhibitor of PI3K- δ,γ , is clinically active in advanced hematologic malignancies. *Blood*, v. 131, p. 877-887, 2018.
- Fu, L. 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 Research*, gkae236, 2024.
- Gadhe, C. G.; Kim, M.-H. Insights into the binding modes of CC chemokine receptor 4 (CCR4) inhibitors: a combined approach involving homology modelling, docking, and molecular dynamics simulation studies. *Molecular BioSystems*, v. 11, p. 618-634, 2015.
- Garrido, A. et al. hERG toxicity assessment: Useful guidelines for drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 195, 112290, 2020.
- Guterres, H. et al. CHARMM-GUI high-throughput simulator for efficient evaluation of protein-ligand interactions with different force fields. *Protein Science*, v. 31, e4413, 2022.
- He, Y. et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, p. 425, 2021.
- Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J.; Fraaije, J. G. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, v. 18, p. 1463-1472, 1997.
- Holford, N.; Yim, D.-S. Clearance. *Translational and Clinical Pharmacology*, v. 23, p. 42-45, 2015.
- Holford, N.; Yim, D.-S. Volume of distribution. *Translational and Clinical Pharmacology*, v. 24, p. 74-77, 2016.
- Horwitz, S. M. et al. Activity of the PI3K- δ,γ inhibitor duvelisib in a phase 1 trial and preclinical models of T-cell lymphoma. *Blood*, v. 131, p. 888-898, 2018.
- Huang, X. L. et al. Role of receptor tyrosine kinases mediated signal transduction pathways in tumor growth and angiogenesis: New insight and futuristic vision. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 180, p. 739-752, 2021.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, p. 33-38, 1996.

Hung, C.-M.; Garcia-Haro, L.; Sparks, C. A.; Guertin, D. A. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, a008771, 2012.

Jakimov, D. et al. In vitro antitumor activity of carboplatin and analogues. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 77, p. 697-709, 2024.

Jiang, W.; Ji, M. Receptor tyrosine kinases in PI3K signaling: The therapeutic targets in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, p. 3-22, 2019.

Jiang, Y. et al. Gallic acid: A potential anti-cancer agent. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, v. 28, p. 661-671, 2022.

Kar, S.; Leszczynski, J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 15, p. 1473-1487, 2020.

Khan, K. H. et al. Hyperglycemia and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) inhibitors in phase I trials: incidence, predictive factors, and management. *The Oncologist*, v. 21, p. 855-860, 2016.

Khandelwal, A. et al. A combination of docking, QM/MM methods, and MD simulation for binding affinity estimation of metalloprotein ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 5437-5447, 2005.

Kim, S. et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, v. 47, p. D1102-D1109, 2019.

Kleshchonok, A.; Tkatchenko, A. Tailoring van der Waals dispersion interactions with external electric charges. *Nature Communications*, v. 9, 3017, 2018.

Kma, L.; Baruah, T. J. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 248-264, 2022.

Kraljevic Pavelic, S. et al. Metastasis: new perspectives on an old problem. *Molecular Cancer*, v. 10, p. 1-14, 2011.

Kumar, A. et al. Copanlisib: Novel PI3K Inhibitor for the treatment of lymphoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 1158-1172, 2020.

Consultar todas via DOI: [10.1016/j.compbiolchem.2025.108433](https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2025.108433)

Anexos

Tabela 1. Cálculo do espectro de predição biológica (PASS).

Figura 1. Propriedades físico-químicas e de semelhança com fármaco (drug-likeness) de A. derivados do ácido gálico e B. fármaco controle Duvelisib.

Figura 2. Parâmetros físico-químicos e ADMET para cada ligante, sendo azul propriedades dentro dos valores de referência e vermelho, valores fora desse intervalo. Para a família de enzimas CYP, o azul indica interação e o vermelho indica ausência de inter

Tabela 2. Dados de energias quânticas.

Tabela 3. Descritores quânticos para cada ligante. *Potencial de ionização (I), afinidade eletrônica (A), dureza química (η), suavidade (σ), potencial químico (μ), índice de eletronegatividade (χ) e índice de eletrofilicidade (ω).

Figura 3. (A) Energias quânticas e (B) HOMO e LUMO 3D dos compostos líderes.

Tabela 4. Afinidades de ligação calculadas dos ligantes acoplados.

Figura 4. A relação conformacional entre a pose acoplada (azul-claro) e as moléculas de referência dentro do bolsão proteico é destacada, com o ligante original representado em rosa e o ligante acoplado em ciano.

Figura 5. Gráficos de RMSD após uma execução de 500 ns. (A) Ligante-68 (B) Ligante-21 e (C) Duvelisib. O RMSD do esqueleto da proteína é exibido em vermelho. O RMSD do complexo é exibido em preto. O RMSD do ligante é exibido em verde.

Figura 6. Os gráficos apresentam valores de RMSF para três compostos complexados com a proteína quinase do receptor-alvo Pi3K (Pi3K gama) em avaliações de MDS de 500 ns.

Figura 7. Valores de RoG dos complexos proteína–ligante em relação ao esqueleto proteico por 500 ns. Os RoG de Duvelisib, 68 e 21 são mostrados em preto, vermelho e azul, respectivamente.

Figura 8. Quantidade de ligações de hidrogênio que contribuem para a estabilidade dos complexos (68, 21 e padrão) durante um período de 500 nanossegundos.

Tabela 5. Análise das ocupações de ligações de hidrogênio para cada ligante durante a simulação de dinâmica molecular (MD).

Figura 9. Projeção dos átomos C α no subespaço essencial ao longo dos dois primeiros autovetores de 68 (preto), 21 (vermelho) e ligante padrão (verde).

Figura 10. Paisagens de energia livre de quatro estruturas cristalinas durante 500 ns de simulação de MD. Gráficos 2D e 3D projetados nos dois primeiros componentes principais (PC1 + PC2).

Figura 11. Análise de SASA para o complexo Ligante-padrão (preto), complexo-68 (vermelho) e complexo-21 (verde).

Tabela 6. Resultados da análise QM/MM antes (inicial) e após (final) a minimização em kcal/mol.

Tabela 7. Resultados de energia de ligação.

apresenta uma representação gráfica do gráfico da energia livre de ligação. O primeiro complexo é o 68, o segundo é o 21, e o terceiro é o padrão.

Tabela 8. Os dois melhores ligantes por afinidade de ligação, suas ligações de hidrogênio (HBs) formadas com a Pi3K e outras ligações químicas formadas.

Figura 13. Os dois melhores ligantes por afinidade de ligação, seus vários tipos de ligações formadas e o controle Duvelisib com o receptor selecionado.

CÓDIGO: SB0846

AUTOR: MARIA ELISA FILGUEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: IURI GOULART BASEIA

TÍTULO: Diversidade do gênero *Geastrum* Pers. (Basidiomycota) para regiões do semiárido e Mata Atlântica no Nordeste Brasileiro

Resumo

O gênero *Geastrum* Pers. (Geastraceae, Basidiomycota), conhecido como "estrela-da-terra", compreende fungos macroscópicos sapróbios ou micorrízicos de relevância ecológica e farmacológica. O nordeste brasileiro possui aproximadamente 29% do número de espécies registradas no mundo todo e ainda há muito a ser descoberto e estudado. Este estudo teve como objetivo inventariar e descrever taxonomicamente espécies de *Geastrum* provenientes de coletas na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba. Foram analisados espécimes mediante características macro e micromorfológicas, seguindo protocolos padronizados. Como resultado, foram identificadas cinco espécies: *Geastrum albonigrum*, *G. entomophilum*, *G. lageniforme*, *G. neoamericanum* e *G. lloydianum*, todas depositadas na coleção UFRN-Fungos. Os dados obtidos ampliam a distribuição conhecida dessas espécies na região Nordeste e reforçam a necessidade de contínuos esforços de coleta e revisão de coleções para melhor compreender e conservar a biodiversidade fúngica em remanescentes da Mata Atlântica e Caatinga.

Palavras-chave: Fungos gasteroides; Taxonomia; Diversidade; Mata Atlântica; Semiárido.

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 macroscopic 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, five species were identified: *Geastrum albonigrum*, *G. entomophilum*, *G. lageniforme*, *G. neoamericanum*, and *G. lloydianum*, 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 e é popularmente conhecido como "estrela-da-terra", devido à abertura do exoperídio em raios (SOTO & WRIGHT, 2000). Sendo um gênero de fungos de distribuição cosmopolita, ocorre em todos os continentes, exceto a Antártida (SUNHEDE, 1989), atuando na decomposição da matéria orgânica vegetal em diversos ecossistemas florestais, tanto tropicais quanto temperados (DOUANLA-MELI et al., 2005; KASUYA et al., 2011). Algumas espécies apresentam compostos com potencial industrial e farmacológico e podem formar micorrizas, estabelecendo associações simbióticas com raízes de 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). No Brasil, há 76 espécies registradas (CROUS et al., 2023; FREITAS et al., 2023; FREITAS-NETO et al., 2023), sendo 42 documentadas na região Nordeste (PIRES et al., 2023; FREITAS et al., 2025). Apesar dos avanços, ainda existem lacunas quanto à diversidade atual do gênero, refletindo a necessidade de novos estudos.

Desde 2010, houve aumento significativo na descrição de novas espécies no Brasil, como *Geastrum laevisporum*, *G. magnosporum*, *G. pusillipilosum* (SOUSA et al., 2015), *G. cariense* (CROUS et al., 2017), *G. verrucoramulosum* (CABRAL et al., 2017), *G. neoamericanum*, *G. rubellum*, *G. brunneocapillatum*, *G. baculicrystallum*, *G. rubropusillum*, *G. courtecuissei* (ACCIOLY et al., 2019), *G. tupiense* (FREITAS-NETO, 2023) e *G. albofibrosum* (CROUS et al., 2023).

Sousa et al. (2014) registraram *Geastrum minimum* pela primeira vez no Nordeste, incluindo os estados do Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte. Posteriormente, Pires et al. (2023) contabilizaram 41 espécies para a região, com novas ocorrências na Mata Atlântica baiana, incluindo o primeiro registro de *G. argentinum* no Nordeste. Mais recentemente, Freitas et al. (2025) descreveu *G. argentinum*, atualizando o número de espécies para 42. Esses achados reforçam a importância dos estudos taxonômicos na região, visando preencher lacunas no conhecimento da micota local.

Compreender a diversidade de *Geastrum* no Brasil, especialmente no Nordeste, é crucial para embasar políticas de conservação em Unidades de Conservação e proteger espécies ameaçadas. A região nordestina abriga mais de 50% das espécies brasileiras e cerca de 29% das registradas globalmente. Foram priorizadas coletas no Semiárido e na Mata Atlântica, áreas com vastas zonas ainda pouco exploradas e condições propícias à frutificação do gênero. A Mata Atlântica, em particular, é um hotspot global de biodiversidade, com alta taxa de endemismo e severa degradação (MYERS et al., 2000).

Este estudo visa contribuir para o preenchimento de lacunas taxonômicas e de distribuição do gênero *Geastrum* no Nordeste brasileiro. A partir da análise de espécimes coletados na Reserva Biológica Guaribas (PB), o trabalho documenta ocorrências, fortalece o acervo científico regional e fornece subsídios para futuras pesquisas ecológicas, filogenéticas,

farmacológicas, industriais e conservacionistas. Os resultados ampliam o conhecimento sobre a micota nordestina e reforçam a importância de inventários contínuos em áreas prioritárias e ameaçadas.

Metodologia

Os espécimes analisados foram provenientes de coletas realizadas durante o período chuvoso de 2024 (julho), na Reserva Biológica Guaribas (REBIO Guaribas), no município de Mamanguape - PB. A metodologia de coleta seguiu o padrão descrito em Silva et al. (2014). O material já se encontrava desidratado e armazenado em sacos plásticos de fechamento hermético (zip locks), e a partir daí foram realizadas as análises e identificações para que fossem adicionadas à Coleção UFRN-Fungos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia de Fungos (LBF) do Departamento de Botânica e Zoologia (DBZ), Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), empregando a metodologia tradicional para taxonomia do grupo (SUNHEDE, 1989; BASEIA et al., 2014; ZAMORA et al., 2014; SOUSA, 2015).

A análise macromorfológica foi feita com auxílio de uma lupa onde foi observado o formato, cor, tamanho, superfície e ápice do basidioma, número de raios, presença de rizomorfa, subículo, colar, estipe e apófise, além das características das camadas micelial, fibrosa e pseudoparenquimatosa. As medições foram efetuadas com um paquímetro digital, e a coloração foi determinada utilizando a tabela de cores de Kernerup & Wanscher (1978). Para a análise microscópica, foi utilizado um pequeno fragmento da porção fértil do basidioma, retirado com pinças. As amostras foram montadas em lâminas histológicas com o auxílio de agulhas de insulina e postas em solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 5%. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ni, acoplado a uma câmera Nikon DS-Ri1 para microfotografia. Foram realizadas 30 medições de capilício e esporos, utilizando o software NIS - Elements AR v.4.51.00. Os valores registrados foram incluídos em cálculo da média estatística, desvio padrão das estruturas e o quociente entre altura e largura (Qm).

Para a identificação e descrição dos espécimes analisados foram utilizados os trabalhos de foram utilizados os trabalhos de Zamora et al. (2013), Sousa et al. (2015) e Accioly et al. (2019). O material descrito foi catalogado e integrado ao acervo da coleção UFRN-Fungos. A nomenclatura de descrição seguiu a terminologia proposta por Kirk et al. (2008).

Durante o primeiro semestre de 2025 também foram feitas coletas nas áreas da Floresta Nacional de Nísia Floresta/RN, Parque Estadual das Dunas de Natal/RN e Parque Estadual Mata do Pau-Ferro/PB, cujos materiais serão utilizados em trabalhos futuros. Nessas ocasiões, foram percorridas trilhas pré-existentes em cada uma das localidades de coleta, adentrando à mata quando necessário, objetivando abranger áreas ainda não exploradas. O material foi fotografado in situ, com a devida localização documentada, facilitando análises futuras e eventuais publicações (FIDALGO & BONONI, 1984). As coletas foram realizadas manualmente ou com o auxílio de uma faca/canivete, junto com uma pequena porção do substrato, essencial para espécies que apresentam estruturas diretamente associadas (como rizomorfos e subículo). Todas essas amostras seguirão o mesmo padrão de acondicionamento, análise para serem usadas posteriormente e serem adicionadas à coleção UFRN-Fungos.

Resultados e Discussões

Foram analisados 58 basidiomas, dentre eles 5 espécies: *Geastrum albonigrum* Calonge & Mata, Bol. Soc. Micol. Madrid 28: 332 (2004), *Geastrum entomophilum* Fazolino, Calonge & Baseia, Mycotaxon 104: 450 (2008), *Geastrum lageniforme* Vittad. Monograph Lyc. 16 (1842), *Geastrum neoamericanum* J.O. Sousa, Accioly, M.P. Martín & Baseia (Sousa et al., 2019) e *Geastrum lloydianum* (Rick) P. Ponce de León, Fieldiana Bot. 31: 326 (1968).

Taxonomia

Geastrum albonigrum Calonge & Mata, Bol. Soc. Micol. Madrid 28: 332 (2004).

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, marrom (6F4), subgloboso a oval, $12,9 - 14,7 \times 13,5 - 17,9$ mm, ápice plano a arredondado, superfície hirsuta, um pouco incrustada. Basidioma expandido saculiforme, $11,5 - 16,7 \times 17,6 - 19,6$ mm. Exoperídio com 6 – 7 raios, revolutos. Camada micelial dupla, a interna papirácea branca (1A1) e a externa alaranjada (6A2), hirsuta, efêmera. Camada fibrosa branca a branco-alaranjada (6A2), coriácea. Camada pseudoparenquimatosa marrom-acinzentada (6F2), persistente, rimosa. Endoperídio marrom-acinzentado (6F2), subgloboso, $11,2 - 17,7 \times 16,6 - 22,2$ mm, séssil. Peristômio fibriloso, marrom-acinzentado (6D3), não delimitado, cônico, $4,7 - 5,9$ mm. Esporos amarronzados, subglobosos, $3,81 - 5,22 \times 3,3 - 5,21$ μm [$x = 4,01 \pm 0,4 \times 4,35 \pm 0,4$ μm , $Q_m = 1,1$, $n = 30$]. Capilício marrom escuro, espessos, $1,56 - 0,77$ mm de diâmetro, retos, superfícies incrustadas, glabras e apresentando algumas ramificações, lúmen ocasionalmente visível.

Habitat: Liteira.

Hábito: Gregário.

Material examinado: Paraíba, REBIO Guaribas, 17/06/2024, com. Freitas, I.L.F.S.; Junior, F.A.A.M.; Nascimento, P.H.G.; Góis, J.S.; Moraes, V. S..S., 2024. (UFRN Fungos - 3796)

Observações: Caracteriza-se pelo exoperídio hirsuto, peristômio fibriloso não delimitado e endoperídio enegrecido. Distingue-se de *G. hirsutum* pela ausência de subículo; de *G. lloydianum* e *G. entomophilum* pela ausência de peristômio sulcado e endoperídio pedicelado; e de *G. inpaense* (T.S.Cabral et. al. 2014) pelos esporos maiores.

Geastrum entomophilum Fazolino, Calonge & Baseia, Mycotaxon 104: 450 (2008).

Descrição: Basidioma imaturo ausente, rizomorfas ausentes. Basidioma expandido fornicado $30,2 - 28,3 \times 34,3 - 28,3$ mm. Exoperídio com 5 – 6 raios, arqueados e involutos. Camada micelial dupla sendo a externa cotonosa branca (4A1) e a interna papirácea e branca (5A2). Camada fibrosa branca (5A2) e persistente, coriácea. Camada pseudoparenquimatosa marrom-escuro (6F4), persistente e rimosa. Endoperídio marrom-escuro (6F3), globoso a subgloboso, $12,5 - 10,9 \times 13,4 - 12,5$ mm, séssil, com hifas protuberantes. Peristômio fibriloso, marrom-escuro (6F2), sem delimitação, cônico. Esporos amarronzados, com ornamentação sob MOP, subglobosos, $4,40 - 4,95 \times 4,35 - 4,90$ μm [$x = 4,70 \pm 0,14 \times 4,65 \pm 0,14$ μm , $Q_m = 1,01$, $n = 30$], capilício bastante marrom, de paredes finas (< 1 μm), com $3,6 - 10,2$ μm diam., superfície incrustada, lúmen visível, ramificações presentes.

Habitat: Solo arenoso ou argiloso.

Hábito: Gregário ou solitário.

Material examinado: Paraíba, REBIO Guaribas, 17/06/2024, com. Freitas, I.L.F.S.; Junior, F.A.A.M.; Nascimento, P.H.G.; Góis, J.S.; Morais, V. S..S., 2024. (UFRN Fungos - 3800)

Observações: Identificada pelo endoperídio sésil e enegrecido, combinado com peristômio sulcado e delimitado. Distingue-se de *G. lloydianum* pelo endoperídio sésil (não pedicelado) e ausência de apófise.

Geastrum lageniforme Vittad. Monograph Lyc. 16 (1842).

Descrição: Basidioma imaturo ausente, rizomorfa ausente, basidioma expandido sacado e arqueado, 7,9 – 3,5 × 10,6 – 9,9 mm. Exoperídio com 6 – 7 raios revolutos aracnoides. Camada micelial simples, marrom acinzentada (5E4), coriácea com ranhuras longitudinais. Camada fibrosa bege (5B3), coriácea. Camada pseudoparenquimatosa marrom clara (5D4), persistente. Endoperídio amarronzado (5B2), subgloboso, 11,8 – 6 × 10,7 – 6,9 mm, sésil, superfície glabra. Peristômio fimbriado, marrom (5D3), delimitado, cônico. Esporos amarronzados, com ornamentação conspícua sob MOP, globosos a subglobosos, 4,75 – 5,25 × 4,70 – 5,15 µm [$x = 5,00 \pm 0,14 \times 4,91 \pm 0,13$ µm, $Q_m = 1,02$, $n = 30$]. Capilícios levemente amarronzados, de paredes finas, com 4,08–6,15 µm diâm., superfície incrustada, lúmen visível, ramificações presentes.

Habitat: Solo argiloso ou arenoso.

Hábito: Gregário.

Material examinado: Paraíba, REBIO Guaribas, 17/06/2024, com. Freitas, I.L.F.S.; Junior, F.A.A.M.; Nascimento, P.H.G.; Góis, J.S.; Morais, V. S..S., 2024. (UFRN Fungos - 3797)

Observações: Caracteriza-se pela forma lageniforme (de frasco) do basidioma expandido e peristômio sulcado e delimitado. Distingue-se de *G. saccatum* pelos raios com pontas finas e aspecto aracnoide.

Geastrum neoamericanum J.O. Sousa, Accioly, M.P. Martín & Baseia (Sousa et al., 2019)

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, branco-amarelado (6A1), globoso a subgloboso, 6,2 – 4,8 × 6,2 – 5,7 mm, ápice umbonado, superfície cotonosa, não incrustada. Subículo branco (5A1). Basidioma expandido sacado, 7,4 – 5,7 mm alt. × 10,6 – 10,1 mm larg. Exoperídio com 5-6 raios revolutos, não higroscópicos. Camada micelial branco-amarelada (4A2), persistente. Camada fibrosa papirácea, branca (4A1). Camada pseudoparenquimatosa marrom (6D4), persistente. Endoperídio marrom-acinzentado (6F3), subgloboso, 4,2 – 3,4 × 5,5 – 4,1 mm, sésil, superfície glabra. Peristômio fimbriado amarronzado (5F3), delimitado por uma linha marrom-acinzentada (5E3), mamiforme, < 1 mm de alt. Esporos amarronzados, subglobosos, 3,88 – 5,10 × 3,75 – 4,95 µm [$x = 4,32 \pm 0,31 \times 4,21 \pm 0,29$ µm, $Q_m = 1,03$, $n = 30$], ornamentação conspícua em MO. Capilício marrom-escuro, 2,77–3,98 µm de diâmetro, paredes finas com leves incrustações e sem lúmen perceptível.

Habitat: Madeira em decomposição.

Hábito: Gregário ou cespitoso.

Material examinado: Paraíba, REBIO Guaribas, 17/06/2024, com. Freitas, I.L.F.S.; Junior, F.A.A.M.; Nascimento, P.H.G.; Góis, J.S.; Morais, V. S..S., 2024. (UFRN Fungos - 3798).

Observações: Identificada pelos basidiomas pequenos com subículo, coloração clara das camadas externas e esporos pequenos (c. 4.3 μm) com verrugas conspícuas. Distingue-se de *G. schweinitzii* pelos esporos ligeiramente maiores e verrugas mais evidentes. Este é o segundo registro da espécie para a Paraíba.

Geastrum lloydianum (Rick) P. Ponce de León, Fieldiana Bot. 31: 326 (1968).

Descrição: Basidioma imaturo hipógeo, marrom-acinzentado(5E5), subgloboso, 14,79 – 15,4 $\times$ 16,72 – 17 mm, ápice umbonado, superfície incrustada. Rizomorfias ausentes. Basidioma expandido sacado, 22,74 – 33,12 $\times$ 23,65 – 37,5 mm. Exoperídio com 7 – 8 raios, revolutos e arqueados. Camada micelial simples, branco alaranjada (5A2) e com incrustações, efêmera. Camada fibrosa amarronzada-alaranjada (5C4), papirácea. Camada pseudoparenquimatosa marrom-escura (6F4), persistente e rimosa. Endoperídio marrom-escuro (7F3), globoso, 9,13 – 12,54 $\times$ 14,84 – 16,58 mm, pedicelado, superfície asperulada. Peristômio regularmente sulcado, marrom (6F3), não-delimitado, cônico. Esporos amarronzados, com ornamentação conspícua sob MOP, globosos, 4,60 – 5,60 $\times$ 4,50 – 5,20 μm [$x = 4,92 \pm 0,29 \times 4,82 \pm 0,20$ μm , $Q_m = 1,02$, $n = 30$]. Capilícios levemente amarronzados, de paredes finas, com 3,45–5,72 μm diâm., superfície incrustada, verrucosa, lúmen visível, ramificações ausentes.

Habitat: Solo argiloso ou arenoso.

Hábito: Gregário ou solitário.

Material examinado: Paraíba, REBIO Guaribas, 17/06/2024, com. Freitas, I.L.F.S.; Junior, F.A.A.M.; Nascimento, P.H.G.; Góis, J.S.; Moraes, V. S..S., 2024. (UFRN Fungos - 3799).

Observações: Caracteriza-se pela combinação de endoperídio escuro, pedicelado e asperulado, com peristômio sulcado. Distingue-se de *G. elegans*, *G. pectinatum* e *G. kotlabae* pelo endoperídio escuro.

Conclusão

O estudo corroborou a ocorrência de cinco espécies de *Geastrum* na Reserva Biológica Guaribas (PB), ampliando a distribuição geográfica de *G. albonigrum*, *G. entomophilum*, *G. lageniforme*, *G. neoamericanum* e *G. lloydianum* 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 e 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. 63, n. 3, p. 447-497, 2014.

FREITAS, I.L.F.S. et al. *Geastrum argentum* (Geastraceae, Basidiomycota): a new earthstar fungi species from the Atlantic Rainforest. *New Zealand Journal of Botany*, v.63, p.1643, 2025.

CÓDIGO: SB0875

AUTOR: VITOR CARVALHO SILVA

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Desenvolvimento de uma ferramenta de visão computacional para a identificação de espécies camarões sete-barbas que ocorrem na costa brasileira.

Resumo

Os camarões peneídeos apresentam grande relevância econômica, explorados comercialmente em diversas regiões do mundo. Embora sejam bastante conhecidos por consequência de sua relevância econômica, estudos recentes mostram a existência de espécies muitos semelhantes morfologicamente, fazendo parte do mesmo gênero. Como é o caso dos camarões sete-barbas, que, no caso, só é possível identificar as espécies a partir dos caracteres sexuais secundários que passam por variações no decorrer do estado de crescimento desses animais. Nesta instância, este trabalho teve como objetivo a elaboração de uma ferramenta de taxonomia digital, utilizando redes neurais convolucionais para a identificação taxonômica de 3 espécies simpátricas que fazem parte do gênero *Xiphopenaeus* (sete-barbas), utilizando 630 imagens dessas 3 classes, combinando técnicas de inteligência computacional e processamento digital de imagens. Foram utilizadas 3 redes neurais convolucionais (AlexNet, MobileNetV2 e ReNet-50). Como resultado obteve-se 85% de acurácia para a ResNet18, enquanto a AlexNet foi de 79% e a MobileNetV2 86%. A rede ResNet18 obteve um melhor desempenho em relação aos outros algoritmos, tendo em vista sua maior consistência durante a etapa de validação e teste, assim como do seu uso da estrutura morfológica do animal para a identificação do indivíduo.

Palavras-chave: Redes Neurais Convolucionais, Camarão sete-barbas, Taxonomia digital.

TITLE: Development of a computer vision tool for identifying seven-barbed shrimp species found on the Brazilian coast

Abstract

Peneid shrimp are of great economic importance and are commercially exploited in various regions of the world. Although they are well known due to their economic importance, recent studies show the existence of species that are very similar morphologically and belong to the same genus. This is the case with seven-barbed shrimp, which can only be identified based on secondary sexual characteristics that vary as the animals grow. In this instance, the objective of this study was to develop a digital taxonomy tool using convolutional neural networks for the taxonomic identification of three sympatric species belonging to the genus *Xiphopenaeus* (seven-barbed shrimp), using 630 images of these three classes, combining computational intelligence techniques and digital image processing. Three convolutional neural networks (AlexNet, MobileNetV2, and ReNet-50) were used. As a result, ResNet18 achieved 85% accuracy, while AlexNet achieved 79% and MobileNetV2 achieved 86%. The ResNet18

network performed better than the other algorithms, given its greater consistency during the validation and testing stage, as well as its use of the animal's morphological structure to identify the individual.

Keywords: Convolutional Neural Networks, Seven-bearded Shrimp, Digital Taxonomy.

Introdução

Os camarões peneídeos possuem grande relevância econômica, sendo explorados constantemente em uma grande variedade das regiões tropicais e subtropicais de diversos países, caracterizando-o como um dos recursos pesqueiros mais rentáveis mundialmente (Hossain & Ohtomi, 2008; Dias-Neto & Dias, 2015). Apesar de serem extremamente conhecidos, estudos recentes apresentam a existência de novas espécies ainda não identificadas que apresentam-se ocupando a mesma nomenclatura de outras já conhecidas (Carvalho-Batista et al., 2019). Nesse sentido, a identificação taxonômica desses animais é caracterizada pela morfologia dos caracteres sexuais secundários, devido a grande diversidade anatômica entre as espécies (Dall et al. 1990, Lavery et al. 2004, Pérez-Farfante & Kensley 1997).

A utilização dessas estruturas promove a fácil identificação desses indivíduos, porém, variações podem ocorrer dentro das espécies, tendo em vista que segundo Pérez-Farfante (1970) seu formato pode variar ao longo de seu desenvolvimento. Dessa forma, utilizar apenas dessas características não se torna uma maneira eficaz de diferenciação anatômica, ocasionando conflitos em meio a sua classificação decorrente das semelhanças entre as estruturas, algo que ocorre na espécie camarão sete-barbas (Carvalho-Batista et al. 2019, Carvalho-Batista et al. 2020).

De acordo com Carvalho-Batista et al. (2019) essa espécie é dividida em 3 grupos, *Xiphopenaeus Dincao*, *Xiphopenaeus Baueri* e *Xiphopenaeus kroyeri*, sendo este último caracterizado por correspondente a 40% dos camarões pescados no Brasil, no entanto, esta condição é originária do fato de que as demais espécies estejam sendo quantificadas como uma única denominação de sete-barbas.

Nessa perspectiva, existe a necessidade de se elaborar maneiras mais eficazes para a identificação desses animais e o uso de tecnologias como redes neurais convolucionais se mostra como uma solução efetiva. Portanto, este trabalho realizou o treinamento desses tipos de algoritmos de aprendizado de máquina para a identificação de 3 espécies de camarão sete-barbas apresentados por Carvalho-Batista et al. (2019), a partir do uso de imagens desses animais, mediante a utilização de redes neurais convolucionais, avaliando o desempenho dos algoritmos utilizados e a sua eficiência na tarefa de diferenciação dos camarões.

Metodologia

O banco de imagens utilizado para o treinamento das redes foi obtido por meio da parceria com pesquisas já realizadas no Laboratório de Ecologia e Evolução de Crustáceos (LABEEC), constituído por um conjunto de 630 fotos, contendo um fundo azul (background) para facilitar futuras etapas relacionadas a manipulação das imagens, de modo a distinguir os demais elementos existentes (foreground), o camarão (objeto de interesse), uma régua e uma

etiqueta de identificação, componentes utilizados em outras pesquisas, como pode ser observado na figura 1.

Inicialmente foram realizados estudos em relação ao banco de imagens disponível para o treinamento das redes neurais, sendo essencial a aplicação de técnicas de processamento digital de imagens com o objetivo de executar um pré-processamento para remover elementos que dificultam a retirada do objeto de interesse, havendo necessidade de se utilizar filtros, operações morfológicas e colorimétricas para melhorar as características das fotos, evitando a ocorrência de ruídos.

Posteriormente, seguiu-se para a etapa de segmentação que objetiva a retirada dos elementos que não possuem significado para o objeto de estudo, ou seja, remoção do fundo, da régua e etiqueta de identificação, porém, o background existente não favoreceu este processo, apesar da aplicação de filtros para a eliminação de ruídos, além disso, em algumas fotografias, o camarão está em contato direto com os outros elementos, sendo algo de difícil separação por meio de técnicas convencionais, ademais interfere diretamente no treinamento dos algoritmos de aprendizado de máquina.

Nesse sentido, observou-se que o desenvolvimento de um algoritmo de segmentação usando técnicas de processamento digital de imagens convencionais não seria eficiente para o objetivo do projeto, sendo preciso utilizar a biblioteca rembg existente na linguagem de programação Python que possibilitou a remoção do foreground. Entretanto, como em algumas fotos, existiam objetos conectados, foi necessário removê-los de forma manual (Figura 2), por meio da ferramenta de borracha generativa existente no sistema operacional Windows 11, utilizada nas imagens problemáticas para a remoção dos elementos que dificultavam a extração do camarão, configurando um processo de segmentação semi automático, visto que esta etapa exige interferência humana.

Dessa maneira, após aplicação deste procedimento, foi elaborado um algoritmo para a retirada do maior elemento da imagem, possibilitando a separação camarão dos demais objetos. Este procedimento se fez necessário para promover o treinamento das redes neurais de modo mais efetivo, uma vez que sua presença poderia interferir neste processo. Observando a disponibilidade de tempo, não foi possível a utilização de todas as imagens disponíveis, tendo em vista que a quantidade de imagens presente e a série de testes em busca de algoritmos clássicos para sua manipulação, obtendo ao final 392 imagens contendo o recorte dos camarões para serem utilizadas nas etapas posteriores.

Em seguida, converteu-se todas as imagens selecionadas para escala de cinza (Figura 3) para finalizar a confecção da base de dados, por meio da biblioteca OpenCV do Python. Utilizou-se como base 3 redes neurais convolucionais, AlexNet, MobileNetV2 e ReNet-50, replicando o método elaborado por Miranda e Gurgel (2025) para identificação de vetores da doença de Chagas. Desse modo, adaptou-se o procedimento descrito para o objetivo do trabalho, promovendo a execução das etapas de treinamento, teste e validação para a classificação das diferentes classes de camarões sete-barbas.

Resultados e Discussões

Nesse contexto, obtiveram-se diferentes resultados na tarefa de classificação proposta para cada algoritmo. Após a divisão da base de dados para ser utilizada nas etapas posteriores

(treinamento, validação e teste), foi aplicado o treinamento das redes e após a aplicação de 10 interações (10 épocas), obteve-se como resultado na etapa de validação, 85% de acurácia para a ResNet18, enquanto a AlexNet obteve 79% e a MobileNetV2 86%, algo destacado pela geração das matrizes de confusão expostas respectivamente na figura 4.

Durante a validação do modelo ResNet18, foi obtida uma sensibilidade (recall) de 67% para a classe XB (*Xiphopenaeus Baueri* Nov. sp.), entretanto apenas existiam 6 amostras durante esse treinamento, consequência da pouca quantidade de imagens deste gênero, havendo apenas 30 dentro da base de dados, gerando uma , sinalizando que 33% foram classificados de forma errônea, como pode ser observado na figura 4, onde 4 amostras foram classificadas corretamente e 2 erroneamente. Enquanto a classe XD (*Xiphopenaeus Dincao* Nov. sp.) possuía 27 amostras, obtendo uma sensibilidade de 78%, rotulando 21 imagens de acordo com o esperado. A classe XK (*Xiphopenaeus kroyeri*) obteve um melhor desempenho, tendo em vista que possui uma maior quantidade de imagens, sendo 51 no total, possuindo uma sensibilidade de 92%. Desse modo, compreende-se que o modelo apresenta uma boa performance para rotular a classe XK e XD, porém ainda se faz necessário adaptações para a categoria XB.

A validação da AlexNet demonstra uma sensibilidade de 67% para a categoria XB, 63% para XD e 86% para XK, apresentando uma performance inferior em relação ao modelo anterior, o que justifica uma acurácia mais baixa. Nesse sentido, compreende-se porque a acurácia deste modelo representou a menor dentre as demais redes, tendo em vista que a grande quantidade de erros cometidos durante a etapa de validação, algo observado na figura 4, onde destacam-se uma grande quantidade de erros para a classe XD e uma maior quantidade de erros para a classe majoritária (XK). Logo, observando as métricas mencionadas, este modelo apresenta-se como o pior desempenho dentre os demais.

O modelo MobileNetV2 apresentou melhor eficiência dentre os outros, possuindo uma sensibilidade de 83% para a classe XB, para a XD 70% e 96% para a XK. Portanto, compreende-se que este modelo se mostrou mais eficiente para o objetivo deste trabalho, sendo ainda assim necessário a criação de estratégias para a melhoria de seu desempenho, como um aumento na base de dados para promover um treinamento mais eficaz, apresentando mais imagens decorrente da classe XB e aumentando a quantidade de imagens para a classe XD, objetivando balancear a quantidade de fotos para maximizar a eficiência dos algoritmos.

Após a etapa de análise das redes após o treinamento e a validação, seguiu-se para uma etapa de testes que expôs os algoritmos à imagens que não estavam presentes em nenhum conjunto de dados anterior, obtendo uma relativa queda na acurácia em todos os modelos, porém, havendo 77% de acurácia para o ResNet18, 75% para o AlexNet e 70% para o MobileNetV2, valendo salientar que nesta etapa o último modelo que se mostrou melhor que os demais não obteve um resultado satisfatório, sendo a ResNet18 mais consistente em relação aos resultados anteriores e na eficiência da classificação.

Além disso, posteriormente foram gerados mapas de calor (Figura 5) como uma maneira de averiguar se as redes neurais estavam utilizando as características morfológicas dos animais para a sua identificação e diferenciação. Observando as figuras 5 e 6, compreende-se que este objetivo foi alcançado na ResNet18 e MobileNetV2, tendo em vista que as regiões de intensidade se mostraram como áreas integrantes da estrutura física do camarão, entretanto, o modelo AlexNet apresentou utilizar elementos exteriores ao objeto de interesse para a sua classificação, como pode ser observado na figura 7.

Conclusão

Portanto, compreende-se que a rede ResNet18 obteve um melhor desempenho em relação aos outros algoritmos, tendo em vista sua maior consistência durante a etapa de validação e teste, assim como do seu uso da estrutura morfológica do animal para a identificação do indivíduo. No entanto, faz-se necessário a expansão da base de dados para melhorar o processo de treinamento, não só aplicando a metodologia de segmentação semi automática nas fotos restantes, como também aplicando técnicas para a expansão do banco de imagens, como a data argumentation. Ademais, o balanceamento da quantidade de fotos por cada classe também se faz uma tarefa relevante, já que influenciará diretamente na rotulação das redes, como pode ser observado nos resultados apresentados, onde a classe XB se tornou a categoria com menor desempenho, tendo em vista a baixa disponibilidade de imagens para treinamento,

Dessa maneira, o uso de algoritmos de aprendizado de máquina para classificação taxonômica, apresenta-se como um processo promissor, tendo em vista o bom desempenho dos algoritmos, justificando a continuidade de maiores estudos em relação aos modelos de aprendizado de máquina utilizados, assim como a introdução de novos algoritmos em busca de melhores resultados. Logo, depreende-se que a aplicação da taxonomia digital utilizando redes neurais convolucionais se mostra como algo eficiente e que requer futuros estudos utilizando outras técnicas de Inteligência Computacional e Processamento Digital de Imagens.

Referências

- Carvalho-Batista, A.; Terossi, M.; Zara, F.J.; Mantelatto, F.L. & Costa, R.C. 2019. A multigene and morphological analysis expands the diversity of the seabod shrimp *Xiphopenaeus* Smith, 1869 (Decapoda: Penaeidae), with descriptions of two new species. *Scientific reports*, 9(1): 1–19.
- Carvalho-Batista, A.; Terossi, M.; Zara, F.J.; Mantelatto, F.L. & Costa, R.C. 2020. Validation of *Xiphopenaeus dincao* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto & Costa and *Xiphopenaeus baueri* Carvalho-Batista, Terossi, Zara, Mantelatto & Costa (Decapoda: Penaeidae) from western Atlantic. *Zootaxa*, 4772(3): 597–599.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. & Staples, D.J. (1990). The biology of the Penaeidae. In: Blaxter JHS & Southward A.J. (Eds). *Advances in Marine Biology*. San Diego: Academic press, 27, 1-489.
- Dias-Neto, J. & J. De F. O. Dias. 2015. *Uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca*. Brasília: IBAMA, 288 p.
- Hossain, M. Y. & J. Ohtomi. 2008. Reproductive biology of the southern rough shrimp *Trachysalambria curvirostris* (Penaeidae) in Kagoshima Bay, southern Japan.
- Lavery, S., Chan, T.Y., Tam, Y.K. & Chu, K.H. (2004). Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol*, 31, 39-49.

Miranda V. L, Gurgel, G. R. Phytophagous, blood-suckers or predators? Automated identification of Chagas disease vectors and similar bugs using convolutional neural network algorithms. *Acta Trop.* 2025 May;265:107621. doi: 10.1016/j.actatropica.2025.107621. Epub 2025 Apr 26. PMID: 40288198.

Pérez-Farfante, I., (1970). Diagnostic characters of juveniles of the shrimps *Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, and *P. brasiliensis*. (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). In: Hacker, R.L., Fukuyama, M.S. (Eds.), *Special Scientific Report – Fisheries No. 599*. United States Department of the Interior, U.S. Fish and Wildlife Service. Bureau of Commercial Fisheries, Washington, pp. 1–26.

Pérez-Farfante, I., Kensley, B., (1997). Penaeids and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Mém. Mus. natn. Hist. nat.* 175, 1–233.

Anexos

Figura 1: Exemplo de imagem existente no estudo

Figura 2: Imagem após aplicação de procedimento manual

Figura 3: Imagem após segmentação e conversão para escala de cinza

Figura 4: Matrizes de confusão após etapa de treinamento e validação

Figura 5: Mapa de calor resultante da rede ResNet18

Figura 6: Mapa de calor resultante da rede MobileNetV2

Figura 7: Mapa de calor resultante da rede AlexNet

CÓDIGO: SB0880

AUTOR: JOAO PEDRO DO NASCIMENTO DE SOUZA

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Padrões espaciais de descanso em saguis (*Callithrix jacchus*): modulação térmica na Caatinga

Resumo

Resumo A ecologia comportamental em primatas fornece subsídios fundamentais para compreender como as espécies organizam o uso do espaço em resposta a pressões ambientais e sociais. Este estudo investigou a organização espacial dos locais de descanso em grupos de *Callithrix jacchus* no semiárido brasileiro, avaliando a influência de fatores climáticos na estruturação desses padrões. Ao longo de 11 meses, três grupos foram acompanhados na Floresta Nacional de Açu (RN), com registro contínuo de trajetos por GPS e monitoramento de variáveis climáticas. Os locais de descanso foram identificados através de análise de proximidade e algoritmo DBSCAN, calculando-se métricas de dispersão espacial e fidelidade aos sítios. Os resultados confirmaram a existência de agregações espaciais bem definidas, com 59,4% dos pontos agrupados em seis manchas distintas. A temperatura apresentou correlação negativa significativa com a dispersão espacial ($r = -0,392$; $p = 0,002$), explicando 15,37% da variância observada. Cada grau Celsius de aumento associou-se à redução de 11,90 metros na dispersão entre locais de descanso. A umidade relativa não apresentou efeito significativo ($r = 0,159$; $p = 0,245$). Os resultados demonstram que *C. jacchus* apresenta fidelidade espacial aos locais de descanso, com padrões modulados termicamente, sugerindo estratégias adaptativas de termorregulação em ambientes semiáridos.

Palavras-chave: ecologia espacial, primatas, termorregulação, análise geoespaciais

TITLE: Thermal modulation of resting-site spatial organisation in *Callithrix jacchus* groups in the Brazilian semi-arid region

Abstract

Behavioural ecology in primates provides essential insights into how species organise space use in response to environmental and social pressures. This study investigated the spatial organisation of resting sites in groups of *Callithrix jacchus* in the Brazilian semi-arid region, assessing the influence of climatic factors on the structuring of these patterns. Over an 11-month period, three groups were monitored in the Açu National Forest (RN), with continuous GPS tracking and climatic variable recording. Resting sites were identified using proximity analysis and the DBSCAN algorithm, and metrics of spatial dispersion and site fidelity were calculated. Results confirmed the presence of well-defined spatial aggregations, with 59.4% of points clustered into six distinct patches. Temperature showed a significant negative correlation with spatial dispersion ($r = -0.392$; $p = 0.002$), explaining 15.37% of the observed variance. Each one-degree Celsius increase was associated with an 11.90-metre reduction in dispersion between resting sites. Relative humidity showed no significant effect ($r = 0.159$; $p = 0.245$). These findings demonstrate that *C. jacchus* exhibits spatial fidelity to resting sites,

with thermally modulated patterns, suggesting adaptive thermoregulatory strategies in semi-arid environments.

Keywords: spatial ecology, primates, thermoregulation, geospatial analysis

Introdução

Os primatas apresentam grande diversidade morfológica e ecológica, variando desde pequenos calitriquídeos (≤ 500 g) até grandes gorilas (> 200 kg) (Reyna-Hurtado et al., 2018). Essa diversidade reflete padrões específicos de uso do habitat, que compõem adaptações ligadas à área de vida de cada espécie (Reyna-Hurtado et al., 2018). A área de vida corresponde ao espaço geográfico utilizado para atividades essenciais, sendo explorada com base em representações mentais detalhadas do ambiente — os chamados mapas cognitivos (Allritz et al., 2022). Tais representações permitem navegação eficiente, baseando-se em locais previamente visitados e ajustando estratégias conforme mudanças ambientais (Xavier et al., 2024). Agregações espaciais com maior disponibilidade de recursos alimentares influenciam fortemente a organização espacial (La Fuente et al., 2014), tornando-se pontos focais de deslocamento (Mandl et al., 2018).

A interação entre forrageamento, descanso e termorregulação forma um sistema comportamental com importantes implicações energéticas (Korstjens et al., 2010). O descanso é essencial para dissipar calor, especialmente após grandes ingestões de alimento, que elevam a temperatura corporal. O tempo investido em forrageio reduz o tempo disponível para repouso, estabelecendo um trade-off energético (Aleign et al., 2023). Espécies que percorrem longas distâncias tendem a descansar menos (Montilla et al., 2021), enquanto o acesso a recursos de alta qualidade permite maior tempo de repouso (Agetsuma; Nakagawa, 1998). Essas dinâmicas afetam a distribuição espacial de manchas de descanso e forrageio.

Nos calitriquídeos, locais de alimentação, descanso diurno e dormitórios noturnos são espacialmente distintos (Ferrari & Digby, 1995; Pinheiro; Mendes-Ponte, 2015). Manchas de descanso e forrageio consistem em agregações espaciais de locais usados com alta fidelidade e reutilização temporal. Em regiões semiáridas, *Callithrix jacchus* reduz a atividade física nas horas mais quentes, selecionando locais de descanso com proteção térmica (La Fuente et al., 2014; Abreu et al., 2016), conservando energia durante escassez de recursos (Guinea et al., 2019).

Callithrix jacchus é um modelo adequado para estudos de uso espacial em ambientes semiáridos por sua plasticidade ecológica e habituação à presença humana (Malukiewicz et al., 2020). As áreas de vida variam amplamente: cerca de 0,7 ha em ambientes urbanos ricos em recursos (Castro, 2003; Hubrecht, 1985; Santos et al., 2014) e até 40 ha em habitats semiáridos ou perturbados (Amora, 2013; Raboy et al., 2008).

Mudanças climáticas afetam todos os primatas (Graham et al., 2016), tornando crucial compreender como fatores abióticos modulam a seleção de locais de descanso e forrageio, auxiliando na previsão de respostas comportamentais e no direcionamento de estratégias de conservação.

O presente estudo teve como objetivo geral identificar padrões espaciais de descanso em grupos de *Callithrix jacchus* na Caatinga e verificar se esses padrões são modulados por fatores climáticos.

Objetivo específico 1: Investigar a existência de manchas de descanso espacialmente definidas por meio de análises geoespaciais.

H₁: Saguis apresentam fidelidade espacial aos locais de descanso, resultando em agregações espaciais detectáveis.

Objetivo específico 2: Avaliar a influência da temperatura na organização espacial dos locais de descanso.

H₂: Temperaturas elevadas estão associadas à redução da distância média entre locais de descanso, indicando maior fidelidade espacial.

Objetivo específico 3: Verificar o efeito da umidade relativa nos padrões espaciais de descanso.

H₃: Altas taxas de umidade estão associadas a maior distância média entre locais de descanso.

Metodologia

Área de Estudo

O estudo foi conduzido na Floresta Nacional de Açu (5°34'20"S, 36°54'33"O), Rio Grande do Norte, Brasil. A área apresenta 218 hectares com vegetação caducifólia espinhosa (caatinga), caracterizada por formações arbóreo-arbustivas adaptadas ao clima semiárido. O clima regional apresenta temperatura média anual de 28,1°C e precipitação média de 704 mm, concentrada entre fevereiro e maio, com período seco prolongado no restante do ano (Climate-data.org, 2021).

Sujeitos experimentais

Foram utilizados no estudo três grupos de *C. jacchus*, totalizando 12 indivíduos no período de coleta com variação de dois a cinco animais por grupo. Os animais foram previamente individualizados seguindo protocolo de Araújo et al. (2008), permitindo identificação individual durante as observações. Apenas indivíduos adultos foram observados.

Coleta de Dados Comportamentais

Os dados foram coletados de fevereiro de 2024 até o final de dezembro de 2024 (11 meses). Cada grupo foi acompanhado desde a saída do local de dormida até o retorno, aproximadamente das 05h00 às 18h00. O trajeto foi mapeado continuamente usando GPS portátil Garmin® 65s. Os comportamentos foram registrados pelo método animal focal com amostragem instantânea cada vez que o animal utilizava o recurso e os locais de descanso foram definidos como pontos onde um ou mais animais permaneceram descansando por no mínimo 20 minutos (sheng et al., 2025).

Dados Climáticos

As variáveis climáticas foram registradas continuamente por uma estação meteorológica automatizada, instalada na área de vida dos grupos. Esta estação aferiu a temperatura do ar (°C) e a umidade relativa do ar (%). Para as análises subsequentes, a temperatura e a umidade relativa foram calculadas como médias diárias.

Análises Geoespaciais

As manchas de descanso foram identificadas utilizando duas abordagens complementares para garantir a robustez dos resultados. Primeiramente, foi realizada uma análise de proximidade, onde os pontos de descanso com ≥ 2 vizinhos dentro de um raio de 30 metros foram classificados como pertencentes a uma "mancha". Em segundo lugar, o algoritmo DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise) foi aplicado, utilizando os parâmetros eps (raio máximo de vizinhança) de 30 metros e minPts (número mínimo de pontos para formar um cluster) = 3.

Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 4.3.2.1 As correlações entre as variáveis climáticas e as métricas espaciais foram analisadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Modelos de regressão linear foram ajustados para quantificar os efeitos das variáveis climáticas na dispersão espacial. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

Resultados e Discussões

Resultados

Agregação espacial dos locais de descanso (H_1)

A hipótese H_1 que previa a existência de manchas espacialmente definidas foi corroborada com a identificação de seis manchas de descanso para os grupos. Dentre os 64 pontos de descanso registrados, 59,4% (38/64) foram observados nessas manchas. A distribuição da agregação variou entre os grupos: o grupo "Bosque" demonstrou a maior agregação, com 78,3% de seus pontos agrupados em quatro manchas distintas. O grupo "Torre" apresentou um padrão intermediário, com 54,2% de seus pontos em uma única mancha, enquanto o grupo "Água" exibiu a menor agregação, com 41,2% de seus pontos em uma mancha.

Efeito da temperatura nos locais de descanso (H_2)

A hipótese H_2 que previa modulação térmica sobre o local de descanso foi corroborada, encontramos uma correlação negativa significativa com a dispersão espacial dos locais de descanso ($r = -0,392$; $p = 0,002$; $n = 64$). Indicando que, à medida que a temperatura ambiente aumenta, a dispersão dos locais de descanso tende a diminuir, sugerindo uma maior fidelidade a sítios específicos. O modelo de regressão linear ajustado para esta relação explicou 15,37% da variância observada na dispersão ($R^2 = 0,154$; $F_{1,58} = 10,53$; $p = 0,002$). Quantitativamente, cada aumento de 1°C na temperatura associou-se a uma redução de $11,90 \pm 3,67$ metros na dispersão dos locais de descanso ($t = -3,25$; $p = 0,002$).

Efeito da umidade relativa nos locais de descanso (H_3)

A hipótese H_3 que previa a influência da umidade relativa sobre a dispersão dos locais de descanso não foi corroborada ($r = 0,159$; $p = 0,245$). A inclusão da umidade no modelo de regressão linear não resultou em uma melhoria substancial do ajuste do modelo ($\Delta R^2 = 0,025$; $F_{1,57} = 1,68$; $p = 0,200$).

Discussão

A confirmação da existência de manchas de descanso espacialmente definidas em *Callithrix jacchus* (H₁) corrobora achados mais amplos sobre a organização espacial de primatas, onde áreas centrais frequentemente estão associadas a recursos críticos (Reyna-Hurtado et al., 2018). No entanto, este estudo expande o conceito de "recursos críticos" para além das fontes alimentares tradicionais, incluindo as manchas de descanso. A fidelidade observada aos locais de descanso sugere que a organização da área de vida dos saguis é impulsionada não apenas pela eficiência de forrageamento (Abreu et al., 2016), mas também, pelas necessidades termorregulatórias, especialmente em ambientes desafiadores como a Caatinga.

A correlação negativa significativa entre a temperatura e a dispersão espacial dos locais de descanso (H₂) oferece evidências diretas de que *C. jacchus* aumenta sua fidelidade a locais de descanso específicos sob maior estresse térmico. Esse ajuste comportamental é uma estratégia termorreguladora vital, em consonância com observações de redução da atividade e aumento do descanso durante períodos quentes em habitats semi áridos (Abreu et al., 2016). A quantificação dessa relação, com uma redução de 11,90 metros na dispersão para cada aumento de 1°C na temperatura, fornece uma medida concreta da plasticidade comportamental da espécie em resposta ao estresse térmico. Essa métrica é valiosa por ter o potencial de prever as respostas desses animais a futuros impactos impulsionados pelas mudanças climáticas.

Embora *C. jacchus* seja conhecido por empregar estratégias de movimento flexíveis e memória espacial para otimizar o forrageamento em ambientes irregulares (Abreu et al., 2020; Abreu et al., 2021; Xavier et al., 2024), os resultados deste estudo indicam que as restrições térmicas podem sobrepor-se ou modificar substancialmente esses padrões. Em vez de se dispersarem amplamente em busca de alimento, os saguis podem concentrar seu uso espacial em locais que oferecem temperaturas mais agradáveis para o descanso. Isso sugere uma potencial compensação entre a otimização das rotas de forrageamento (que podem envolver movimentos mais amplos) e a otimização da termorregulação (que pode exigir movimentos restritos a locais específicos). Essa compensação pode explicar parte da variabilidade observada nos tamanhos das áreas de vida e nos padrões de movimento em diferentes contextos ambientais. A adaptação dos saguis não é ilimitada; em condições de estresse ambiental extremo, como o calor intenso, as estratégias de forrageamento eficientes podem ser restringidas em favor da termorregulação, fornecendo uma ligação causal para algumas das inconsistências nos tamanhos das áreas de vida relatadas na literatura.

Conclusão

Conclusão

Os resultados evidenciam que a organização espacial de *Callithrix jacchus* em ambientes semiáridos não é aleatória, mas estruturada em torno de manchas de descanso utilizadas ao longo do tempo. Essa fidelidade confirma que locais de repouso são recursos críticos na ecologia da espécie, ao lado das áreas de alimentação e dormida. O achado central foi a relação direta entre variáveis térmicas e o uso desses locais: a correlação negativa entre temperatura e dispersão indica que, sob estresse térmico, os saguis restringem deslocamentos e reforçam a fidelidade a microclimas favoráveis. Essa plasticidade revela uma estratégia adaptativa de termorregulação que assegura a homeostase energética em condições sazonais extremas. O estudo demonstra que fatores abióticos modulam de forma mensurável a organização espacial, ampliando análises antes centradas em alimento e sociabilidade. A

métrica obtida (redução média de 11,9 m na dispersão por grau Celsius) constitui parâmetro preditivo útil diante do aumento previsto de ondas de calor, com impactos potenciais sobre forrageamento, competição e viabilidade populacional. Assim, compreender como pressões térmicas moldam o uso do espaço é essencial para antecipar respostas adaptativas e orientar estratégias de manejo e conservação em cenários de aquecimento global.

Referências

Abreu, F., Fuente, M. F. D. L., Schiel, N., & Souto, A. (2016). Feeding ecology and behavioral adjustments: Flexibility of a small neotropical primate (*callithrix jacchus*) to survive in a semiarid environment. <https://doi.org/10.1007/S13364-016-0262-4>

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. <https://doi.org/10.1007/S10071-020-01465-1>

Abreu, F., Souto, A., & Schiel, N. (2020). Wild common marmosets (*callithrix jacchus*) employ spatial cognitive abilities to improve their food search and consumption: An experimental approach in small-scale space. *Primates*, 61(6), 807-816. <https://doi.org/10.1007/S10329-020-00826-1>

Ahlborn, S., & Rothe, H. (1999). Food selection of semifree common marmosets (*callithrix jacchus*): Indications for optimal foraging. *Primates*, 40 (3), 479-486. <https://doi.org/10.1007/BF02557583>

Alelign, M., Balakrishnan, M., & Bekele, A. (2023). Activity budget and feeding ecology of the gelada baboon (*Theropithecus gelada*) in the Simien Mountains National Park, Ethiopia. *Journal of Animal Ecology*, 92(1), 166-178.

Allritz, M., Schiel, N., & Souto, A. (2022). The role of spatial memory in primate foraging: A review. *Animal Cognition*, 25(2), 205-220.

Amora, T. D. (2013). Padrões ecológicos do sagui-do-nordeste *callithrix jacchus* (primates, *callitrichidae*) em uma área de Caatinga no alto sertão sergipano.

Amora, T. D., Beltrão-Mendes, R., Beltrão-Mendes, R., Ferrari, S. F., & Ferrari, S. F. (2013). Use of alternative plant resources by common marmosets (*callithrix jacchus*) in the semi-arid caatinga scrub forests of northeastern Brazil. *American Journal of Primatology*, 75(4), 333-341. <https://doi.org/10.1002/AJP.22110>

Andrade, A. C. D. (2021). Density of marmosets in highly urbanised areas and the positive effect of arboreous vegetation. *Urban Ecosystems*, 24(5), 1-9. <https://doi.org/10.1007/S11252-021-01131-5>

ARAUJO, Arrilton. Influence des facteurs écologiques, comportementaux et démographiques sur la dispersion de *Callithrix jacchus*. 1996. Tese de Doutorado. Paris.

Barraquand, F., Barraquand, F., & Murrell, D. J. (2012). Evolutionarily stable consumer home range size in relation to resource demography and consumer spatial organization. *Theoretical Ecology*, 5(4), 567-589.
<https://www.google.com/search?q=https://doi.org/10.1007/S12080-011-0148-7>

Castro, C. S. S. D. (2003). Tamanho da área de vida e padrão de uso do espaço em grupos de sagüis, *callithrix jacchus* (linnaeus) (primates, callitrichidae). *Revista Brasileira De Zoologia*, 20(1), 91-96. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000100011>

Climate-data.org. (2021). Dados climáticos para Açu, Rio Grande do Norte, Brasil.

Detogne, N., Ferregueti, Á. C., Mello, J. H. F., Santana, M. C., Dias, A. D. C., Mota, N. C. J. D., Gonçalves, A. E. D. C., Souza, C. P. D., & Bergallo, H. G. (2017). Spatial distribution of buffy-tufted-ear (*callithrix aurita*) and invasive marmosets (*callithrix* spp.) in a tropical rainforest reserve in southeastern Brazil. *American Journal of Primatology*, 79(12).
<https://doi.org/10.1002/AJP.22718>

Devore, I. (2017). *Primate Behavior: Field Studies of Monkeys and Apes*. Holt, Rinehart and Winston. Di Fiore, A., & Suarez, S. A. (2007). Terrestrial behavior and thermoregulation in a lowland woolly monkey (*Lagothrix lagotricha poeppigii*). *American Journal of Primatology*, 69(11), 1279-1290.

Dias, A. C. B., Hannibal, W., Martinez, R. A., & Machado, P. R. R. (2022). Distribution, activity patterns and diet of *callithrix penicillata* (primates: Callitrichidae) in an urban area in central Brazil. *Research, Society and Development*, 11(8), e14811830717-e14811830717.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30717>

Ferrari, S. F., & Digby, L. J. (1995). Wild *callithrix* groups: Stable extended families?. *American Journal of Primatology*, 38(1), 19-27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1996\)38:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1996)38:1)

Ferreira, A. S., Pendu, Y. L., & Martinez, R. A. (2018). The use of a mixed rubber landscape by tufted-ear marmosets. *Primates*, 59(3), 293-300. <https://doi.org/10.1007/S10329-017-0645-4>

Francisco, T. M., Couto, D. R., Zanutcio, J. C., Serrão, J. E., Silva, I. D. O. E., & Boere, V. (2014). Vegetable exudates as food for *callithrix* spp. (callitrichidae): Exploratory patterns. *PLOS ONE*, 9(11).<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112321>

Francisco, T. M., Francisco, T. M., Lopes-Mattos, K. L. B., Picoli, E. A. D. T., Couto, D. R., Oliveira, J. A. D., Zanutcio, J. C., Serrão, J. E., Silva, I. D. O. E., & Boere, V. (2017). Feeding habits of marmosets: A case study of bark anatomy and chemical composition of *anadenanthera peregrina* gum. *American Journal of Primatology*, 79(3), 1-9.
<https://doi.org/10.1002/AJP.22615>

Fuente, M. F. D. L., Souto, A., Sampaio, M. B., & Schiel, N. (2014). Behavioral adjustments by a small neotropical primate (*callithrix jacchus*) in a semiarid caatinga environment. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/326524>

Fuente, M. F. D. L., Sueur, C., Garber, P. A., Bicca-Marques, J. C., Souto, A., & Schiel, N. (2021). Foraging networks and social tolerance in a cooperatively breeding primate (callithrix jacchus). *Journal of Animal Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13609>

Garber, P. A. (1992). Vertical clinging, small body size, and the evolution of feeding adaptations in the callitrichinae. *American Journal of Physical Anthropology*, 88(4), 469-482. <https://doi.org/10.1002/AJPA.1330880404>

Grande, T. O. D., Alencar, R. D. M., Ribeiro, P., & Melo, F. R. D. (2020). Fragment shape and size, landscape permeability and fragmentation level as predictors of primate occupancy in a region of brazilian cerrado. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42. <https://doi.org/10.4025/ACTASCIBIOLSCI.V42I1.48339>

Guinea, M. L., Montilla, J., & Korstjens, A. H. (2019). The energetic trade-off between foraging and resting in wild primates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 73(6), 1-12.

Guimarães-Lopes, V. D. P., Rodrigues, F. H. G., & Massara, R. L. (2023). Landscape factors and allochthonous congeneric species influence callithrix aurita occurrence in brazilian atlantic forest remnants. *Ecology and Evolution*, 13(4). <https://doi.org/10.1002/ece3.9968>

Harrison, M. L., & Tardif, S. D. (1994). Social implications of gummivory in marmosets. *American Journal of Physical Anthropology*, 95(4), 399-408. <https://doi.org/10.1002/AJPA.1330950404>

Hilário, R. R., Ferrari, S. F., & Ferrari, S. F. (2015). Dense understory and absence of capuchin monkeys (sapajus xanthosternos) predict higher density of common marmosets (callithrix jacchus) in the brazilian northeast. *American Journal of Primatology*, 77(4), 425-433. <https://doi.org/10.1002/AJP.22358>

Hilário, R. R., Silvestre, S. M., Abreu, F., Beltrão-Mendes, R., Castro, C. S. S. D., Chagas, R. R. D., Fuente, M. F. D. L., Duarte, M. H. L., Ferrari, S. F., Passamani, M., Schiel, N., Souto, A., Young, R. J., & Souza-Alves, J. P. (2021). Temperature and exudativory as drivers of the marmoset (callithrix spp.) daily activity period. *American Journal of Primatology*. <https://doi.org/10.1002/AJP.23341>

Hubrecht, R. C. (1985). Home-range size and use and territorial behavior in the common marmoset, callithrix jacchus jacchus, at the tapacura field station, recife, brazil. *International Journal of Primatology*, 6(5), 533-550. <https://doi.org/10.1007/BF02735575>

Korstjens, A. H., Dunbar, R. I. M., & Lehmann, J. (2010). The trade-off between foraging and resting in primates: A review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(1), 1-15.

Malukiewicz, J., Boere, Ma, B. D. O., M, D., J, V. A. F., French, J. A., G, H., C, A. I. D. S., L, J., F, R. D. M., M, M. V., S, B. M., I, D. O. E. S., F, S. P., J, R., Pissinatti, A., R, D. R., Ross, C. N., N, S.,... S, T. (2020). An introduction to the callithrix genus and overview of recent

Anexos

restante das referências

restante das referências 2

CÓDIGO: SB0881

AUTOR: RODRIGO OLIMPIO ORVATE ARRUDA

COAUTOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

COAUTOR: GENEDY KARIELLY DA SILVA APOLINARIO

COAUTOR: LUCAS DENYLSO RIBEIRO FARIAS SANTOS

COAUTOR: JOHSEPH PABALLO GOMES DE SOUZA

ORIENTADOR: JANINE INEZ ROSSATO

TÍTULO: Impacto da inibição da degradação de proteínas na atividade eletrofisiológica

Resumo

A formação e atualização das memórias dependem de um balanço entre a síntese e a degradação de proteínas. Embora a degradação via proteassoma seja reconhecida como crucial para a consolidação de memórias de longa duração, seu papel na regulação da atividade de redes neurais em tempo real é pouco compreendido. Este estudo investigou como a inibição da degradação proteica afeta as oscilações no hipocampo, uma atividade neural essencial para o processamento cognitivo. Ratos Wistar foram submetidos a cirurgia para implante de matrizes de microeletrodos com cânulas na área CA1 do hipocampo dorsal. Após a recuperação, os animais receberam infusões locais do inibidor do proteassoma, a lactacistina, ou veículo. Registros de potencial de campo local (LFP) foram realizados antes e por até 120 minutos após as infusões. Os resultados revelam que a inibição do proteassoma induz uma supressão seletiva e significativa na potência da banda de frequência teta (5-10 Hz). Em contraste, a potência nas bandas gama de baixa e média frequência não foi alterada, enquanto a de alta frequência parece estar aumentada. Concluímos que a degradação proteica é um mecanismo vital para a manutenção da integridade e potência do ritmo teta, a principal oscilação hipocampal para o processamento mnemônico.

Palavras-chave: Hipocampo; Degradação proteica; Oscilações neurais; Ritmo gama.

TITLE: Impact of protein degradation inhibition on electrophysiological activity

Abstract

The formation and updating of memories depend on a balance between protein synthesis and degradation. Although proteasome-mediated degradation is recognized as crucial for the consolidation of long-term memories, its role in regulating real-time neural network activity is poorly understood. This study investigated how the inhibition of protein degradation affects hippocampal oscillations, an essential neural activity for cognitive processing. Wistar rats underwent surgery for the implantation of microelectrode arrays with cannulas in the dorsal hippocampal CA1 area. Following recovery, the animals received local infusions of the proteasome inhibitor, lactacystin, or a vehicle. Local field potential (LFP) recordings were performed before and for up to 120 minutes after the infusions. The results reveal that proteasome inhibition induces a selective and significant suppression in the power of the

theta frequency band (5-10 Hz). In contrast, the power in the low and mid-gamma frequency bands was not altered, while the high-frequency gamma seems to be increased. We conclude that continuous protein degradation is a vital mechanism for maintaining the integrity and power of the theta rhythm, the main organizing oscillation of the hippocampus for mnemonic processing.

Keywords: Hippocampus; Protein degradation; Neural oscillations; Gamma rhythm.

Introdução

A formação e atualização das memórias dependem da capacidade do cérebro de modificar a força das conexões neurais para ocorrerem (McGaugh, 2000). Esse tipo de modificação é estabelecido por meio de alterações na composição proteica das sinapses, especialmente nas densidades pós-sinápticas, onde a adição ou a remoção de receptores modula a eficácia da comunicação neuronal (Anggono & Huganir, 2012). Esse dinâmico remodelamento é orquestrado por dois processos celulares fundamentais e antagônicos: a síntese de novas proteínas e a degradação seletiva de proteínas já existentes.

Embora ambos os processos sejam cruciais, as pesquisas em neurobiologia da memória têm focado principalmente na investigação do papel da síntese de novas proteínas no processamento mnemônico de longa duração (Alberini & Kandel, 2015). Contudo, evidências crescentes apontam que a degradação proteica, mediada principalmente pelo sistema ubiquitina-proteassoma, pode ser igualmente essencial (Jarome & Helmstetter, 2014; Hedge, 2022; Lee & Kaang, 2023). Para investigar esse sistema, são utilizados inibidores farmacológicos como a lactacistina, um composto que se liga de forma covalente e inibe irreversivelmente a atividade catalítica do proteassoma 26S, bloqueando a degradação de proteínas marcadas com ubiquitina (Goo & Han, 2024). A inibição da degradação proteica é capaz de prejudicar a manutenção da potenciação de longa duração (LTP), fenômeno reconhecido como correlato celular da memória (Karpova et al., 2006), sugerindo que a remoção seletiva de proteínas é um passo indispensável para a flexibilidade sináptica que sustenta o aprendizado. No entanto, a forma como essa regulação molecular em nível de sinapses individuais se traduz em padrões de atividade de larga escala, que coordenam o processamento de informações no cérebro, ainda é pouco compreendida.

Esses padrões manifestam-se como ritmos ou oscilações, os quais refletem a atividade síncrona de grandes populações de neurônios (Buzsaky, 2006). No hipocampo, estrutura-chave para a formação das memórias, as oscilações cerebrais nas faixas de frequência teta (4-8 Hz) e gama (30-100 Hz) são proeminentes. O ritmo teta está associado à exploração e ao aprendizado, enquanto a gama está ligada a outros processos cognitivos complexos, como a atenção, a percepção sensorial e a ligação de características de um objeto em uma representação coerente (Buzsaky, 2006). Notavelmente, a atividade coordenada em ambas as bandas é considerada um mecanismo fundamental para a codificação e a recuperação de informações mnemônicas (Lisman & Jensen, 2013; Jensen & Colgin, 2007). Se esses ritmos coordenados emergem da comunicação precisa entre milhões de sinapses, e a degradação proteica é crucial para ajustar a função de cada uma dessas sinapses, então é razoável supor que os dois processos estejam intimamente ligados.

Partindo dessa premissa, o presente trabalho analisa esta hipótese, investigando qual é o impacto da inibição aguda da degradação proteica sobre a atividade oscilatória hipocampal. O objetivo central da pesquisa foi estudar as alterações da atividade oscilatória hipocampal causadas pela infusão de lactacistina, um inibidor da degradação proteica, avaliando especificamente seus efeitos sobre as oscilações teta e gama. Ao investigar a relação entre a degradação proteica que ocorre nas sinapses, um processo molecular intrínseco à atividade

cerebral, e um fenômeno de rede neural essencial para a memória, este estudo contribui para o melhor entendimento dos processos fisiológicos subjacentes às funções cognitivas.

Metodologia

Animais experimentais e condições de manutenção

O estudo utilizou ratos Wistar machos adultos ($N = 10$), provenientes do biotério do Instituto do Cérebro (ICe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde todos os procedimentos foram realizados. Os animais foram mantidos em caixas padrão com 5 animais por caixa, em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e sob ciclo claro/escuro de 12h com acesso livre à água e ração, seguindo as diretrizes éticas da Lei AROUCA (Lei nº 11.794/2008) aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN (Certificado 384.010/2024). O aluno realizou o curso de manejo de animais (Figura 1).

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução 2-5%, manutenção 0.5-2%) e submetidos a cirurgia estereotáxica para o implante unilateral de uma matriz de 16 canais de microeletrodos de tungstênio ($35\ \mu\text{m}$) acoplada a uma cânula de infusão. O alvo foi a camada piramidal da área CA1 do hipocampo dorsal (coordenadas: AP -4.2 mm, ML +2.4 mm, DV -3.0 mm; Paxinos & Watson). Parafusos de ancoragem e um parafuso de aterramento foram fixados ao crânio. Os animais receberam analgesia com meloxicam ($2\ \text{mg/kg}$, s.c.) antes da cirurgia e nos três dias subsequentes, sendo alojados individualmente para recuperação por um período de 7 a 10 dias antes do início dos experimentos.

Registro eletrofisiológico e infusão

O protocolo experimental, ilustrado na Figura 2, consistiu em colocar o animal em um campo aberto para a habituação e registro da atividade elétrica por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a infusão intra-hipocampal de uma das seguintes soluções: Veículo (VEH): Solução salina 0,9 % ($N = 5$) Lactacistina (LAC): Inibidor irreversível do proteassoma 26S; $32\ \text{ng}/\mu\text{l}$ em solução salina ($N = 5$). As infusões (volume total de $1\ \mu\text{l}$) foram realizadas a uma taxa de $0.5\ \mu\text{l}/\text{min}$. Após a infusão, o animal retornou ao campo aberto e a atividade de potencial de campo local (LFP) foi registrada continuamente, avaliando-se os efeitos da droga nos minutos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 120. A atividade elétrica foi registrada com o sistema CerePlex Direct (Blackrock Microsystems). Os sinais de potencial de campo local (LFP) foram adquiridos a 30 kHz, com um filtro passa-banda de 0.3 - 500 Hz.

Análise dos dados e estatística

A análise foi realizada offline com rotinas customizadas em Python 3.14. Para calcular a potência espectral, foi utilizado o método do periodograma de Welch (janelas de Hamming de 3s, sobreposição de 75%). A potência foi calculada para as seguintes bandas de frequência: teta (5-10 Hz), slow gamma (30-55 Hz), mid-gamma (55-85 Hz) e fast-gamma (85-120 Hz). As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA de duas vias (fatores: grupo e tempo) com múltiplas comparações seguidas pela correção de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

Resultados e Discussões

A infusão intra-hipocampal do inibidor do proteassoma, lactacistina, induziu alterações neurofisiológicas específicas e duradouras. A análise da atividade oscilatória no hipocampo ipsilateral à infusão revelou um perfil de desregulação altamente seletivo, com um impacto proeminente e supressor na banda de frequência teta, contrastando com os efeitos observados na banda gama. O principal achado deste estudo foi o efeito seletivo da LAC sobre o ritmo teta. A análise quantitativa da variação da potência espectral, normalizada pelo período basal, está apresentada nas Figura 3A-D. A Figura 3A, mostra que existe diferença na banda da oscilação teta para os grupos VEH e LAC. Essa diferença emerge logo após a infusão e se sustenta por até uma hora. Enquanto o grupo controle (VEH) exibiu uma potência teta estável, oscilando naturalmente em torno da linha de base (100%), o grupo tratado com LAC apresentou uma queda abrupta. Esta supressão atingiu seu pico entre 10 e 25 minutos pós-infusão e permaneceu robustamente abaixo do grupo controle por até uma hora, indicando um colapso prolongado deste ritmo. A Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito nos fatores grupo e tempo ($F(1,8) = 9.912$, $p = 0.0136$ para grupo e $F(2.357, 18.86)$, $p = 0.0097$ para tempo). Este resultado é de suma importância, pois indica que a trajetória da potência teta ao longo do tempo foi significativamente diferente entre os animais que receberam a droga e os que receberam o veículo. As comparações múltiplas com correção de Bonferroni, cujos resultados são indicados pelos asteriscos na Figura 3A, detalharam essa interação, apontando que a potência no grupo LAC foi significativamente menor que no grupo VEH em múltiplos pontos temporais, entre os minutos 10 e 30 após a infusão (5-10 min, $p < 0.01$; 10-15 min, $p < 0.05$; 15-20 min, $p < 0.01$ e 25-30 min, $p < 0.05$, em um teste de Bonferroni).

Em notável contraste com o forte efeito supressor observado em teta, a análise das sub-bandas de gama revelou que a inibição do proteassoma não causou uma redução de potência. Para as bandas de low gamma (Figura 3B) e fast gamma (Figura 3C), as curvas de variação de potência dos grupos LAC e VEH permaneceram sobrepostas durante os 120 minutos. A ANOVA corrobora esta observação, não detectando efeito do tratamento (Low gamma: $F(1,8) = 0.165$, $p = 0.695$; Mid gamma: $F(1,8) = 0.033$, $p = 0.859$), o que confirma que a lactacistina não alterou a potência nestas faixas de frequência. Curiosamente, foi observado um efeito principal do fator tempo para ambas as bandas (Low gamma: $F(4.391, 35.13) = 10.70$, $p < 0.0001$; Mid gamma: $F(3.906, 31.25) = 18.74$, $p < 0.0001$). Isso sugere que a potência variou ao longo do experimento de forma similar em ambos os grupos, possivelmente devido a fatores comportamentais como a habituação ao ambiente, mas independentemente da ação da droga. A análise da banda de fast gamma (Figura 3D) também não revelou um impacto da droga. Embora o gráfico possa sugerir uma leve tendência de aumento de potência no grupo LAC, a ANOVA não encontrou efeito de interação ($F(8, 64) = 1.165$, $p = 0.3361$) nem efeito principal do Tempo ($F(4.451, 35.61) = 1.957$, $p = 0.1215$). Portanto, de acordo com a análise estatística, a inibição do proteassoma não induziu alterações significativas na potência desta banda.

A profunda desregulação do ritmo teta, quantificada acima, é também claramente observável nos registros brutos (Figura 4) e na análise tempo-frequência (Figura 5) de animais representativos. A Figura 4 compara os traçados do Potencial de Campo Local (LFP). Em condições basais, ambos os grupos exibem uma oscilação de alta amplitude e com uma ritmicidade quase sinusoidal, característica do estado de vigília ativa. Após a infusão, o animal controle (Figura 4A) mantém essa estrutura rítmica, enquanto o traçado do animal tratado com lactacistina (Figura 4B) torna-se visivelmente desorganizado, perdendo sua regularidade e apresentando uma amplitude reduzida. Esta perda de organização rítmica é visualmente detalhada nos espectrogramas da Figura 5. O espectrograma de um animal controle (Figura 5A) exibe uma "banda" horizontal de alta potência (indicada pela cor

amarela/vermelha) estável e bem definida, centrada na faixa de frequência teta (~8 Hz) durante todo o experimento. Em contrapartida, no animal tratado com lactacistina (Figura 5B), esta banda de potência teta, inicialmente presente no período basal, torna-se progressivamente mais fraca, pálida e fragmentada nos períodos pós-infusão, ilustrando o colapso da principal dinâmica oscilatória do hipocampo. Juntas, estas figuras fornecem uma evidência qualitativa robusta que suporta os achados quantitativos, demonstrando que a inibição da degradação protéica leva a uma profunda e seletiva desorganização da atividade neural hipocampal, centrada na supressão do ritmo teta.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a degradação proteica mediada pelo proteassoma no hipocampo é um regulador crítico da dinâmica de rede neural. Portanto, a inibição da degradação protéica leva a uma redução potente e seletiva na potência da oscilação teta, um ritmo fundamental para a função hipocampal. Em contraste, a atividade na banda gama não foi suprimida; enquanto as sub-bandas de baixa e média frequência permaneceram inalteradas, a potência na gama de alta frequência aumentou significativamente. Esses achados sugerem que a função do proteassoma transcende a simples manutenção estrutural ou a consolidação de memórias de longo prazo. A degradação proteica contínua parece ser um mecanismo ativo e essencial para a manutenção do ritmo organizador teta e, ao mesmo tempo, parece regular de forma distinta os microcircuitos que geram as oscilações de alta frequência. Como sugestão para pesquisas futuras, seria importante identificar as proteínas específicas cuja acumulação, devido à inibição do proteassoma, é responsável por esses efeitos eletrofisiológicos, utilizando técnicas de proteômica. Além disso, investigar se a manipulação da degradação protéica afeta de forma similar outros tipos de acoplamento de frequência ou a atividade de subtipos específicos de interneurônios poderia aprofundar nossa compreensão sobre este novo eixo de regulação da função cerebral.

Referências

- ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 1, p. a021741, 2015.
- ANGGONO, V.; HUGANIR, R. L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*, v. 22, n. 3, p. 461-469, 2012.
- BATS, C.; GROG, L.; CHOQUET, D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*, v. 53, n. 5, p. 719-734, 2007.
- BUZSAKY, G. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, 2006.
- BUZSAKY, G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, v. 25, n. 10, p. 1073-1188, 2015.
- DELINT-RAMIREZ, I. et al. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 24, p. 8162-8170, 2010.
- GOO, M.; HAN, K. Ubiquitination in control of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 56, n. 2, p. 263-272, 2024.
- HEGDE, A. N. The Ubiquitin-Proteasome System in Synaptic Function and Dysfunction. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 15, p. 846939, 2022.

- JAROME, T. J.; HELMSTETTER, F. J. The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 105, p. 107-116, 2013.
- JAROME, T. J.; HELMSTETTER, F. J. Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 7, p. 61, 2014.
- JENSEN, O.; COLGIN, L. L. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 11, n. 7, p. 267-269, 2007.
- KAANG, B. K.; LEE, S. H.; KIM, H. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist*, v. 15, n. 5, p. 430-435, 2009.
- KARPOVA, A. et al. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 18, p. 4949-4955, 2006.
- LEE, S. H. et al. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, v. 319, n. 5867, p. 1253-1256, 2008.
- LEE, S. H.; KAANG, B. K. New insights into the role of protein degradation in memory consolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 24, n. 7, p. 415-431, 2023.
- LISMAN, J. E.; JENSEN, O. The θ - γ neural code. *Neuron*, v. 77, n. 6, p. 1002-1016, 2013.
- LOPEZ-SALON, M. et al. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 11, p. 1820-1826, 2001.
- LU, J. et al. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*, v. 55, n. 6, p. 874-889, 2007.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.
- PASZKIEL, S.; DOBRAKOWSKI, P.; ŁYSIAK, A. The Impact of Different Sounds on Stress Level in the Context of EEG, Cardiac Measures and Subjective Stress Level: A Pilot Study. *Brain Sciences*, v. 10, n. 10, p. 728, 2020.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5. ed. Elsevier, 2006.
- ROOPUN, A. K. et al. A beta2-frequency (20-30 Hz) oscillation in nonsynaptic networks of somatosensory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 42, p. 15646-15650, 2006.

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 de 15 minutos em campo aberto; 2) Infusão intra-hipocampal de veículo (VEH) ou lactacistina (LAC); 3) Registro pós-infusão por 120 minutos.

Figura 3 - Variação da potência espectral no hipocampo após inibição da degradação proteica. Dados de potência para os grupos veículo (VEH, N=5) e lactacistina (LAC, N=5), normalizados pelo período basal. *p

Figura 4 - Registros representativos do Potencial de Campo Local (LFP) demonstrando o impacto da Lactacistina na ritmicidade do sinal. Traçados de LFP de um animal do grupo VEH (A) e um do grupo LAC (B) nos períodos basal, 15-20 min e 2h pós-infusão.

Figura 5 - Análise tempo-frequência (espectrogramas) ilustrando a supressão seletiva da banda teta. Análise tempo-frequência para os grupos VEH(A) e LAC(B), demonstrando a atenuação da banda de potência na faixa teta (~8 Hz) no animal tratado com a droga.

CÓDIGO: SB0882

AUTOR: BRUNA EVELLYN FERREIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: DENISE MORAIS LOPES GALENO

TÍTULO: Impacto do Estresse, Ansiedade e Distúrbios do Sono e ritmo na Ciência de mulheres pesquisadoras

Resumo

Nos últimos anos, a discussão acerca da relação entre maternidade e carreira científica tem ganhado destaque nos eventos acadêmicos, evidenciando a sobrecarga física e mental enfrentada por mulheres devido ao persistente androcentrismo científico e à desigual distribuição das responsabilidades com a vida privada. O presente estudo teve como objetivo investigar de que forma a maternidade impacta a trajetória profissional de docentes-pesquisadoras, enfatizando os efeitos do estresse sobre a qualidade de vida e do sono dessas mulheres. A pesquisa foi fundamentada em dados de Galeno et al. (2023), obtidos por planilhas e questionários aplicados a professores universitários, e em referências publicadas entre 2018 e 2025. Trata-se de estudo descritivo e exploratório, com abordagem quali-quantitativa, em duas etapas: (1) levantamento e análise dos dados-base e (2) revisão integrativa da literatura. Os resultados evidenciaram desigualdade de gênero na produção científica: homens publicaram mais artigos (média de $30,5 \pm 4,36$), enquanto mulheres, sobretudo mães, se destacaram em projetos de pesquisa ($11,96 \pm 2,05$) e extensão ($6,25 \pm 1,07$), atividades subvalorizadas pelas métricas tradicionais. Além disso, docentes-mães apresentaram a maior latência do sono ($22,71 \pm 5,50$ minutos), refletindo estresse elevado, fadiga e comprometimento cognitivo. Espera-se que os achados subsidiem políticas institucionais que promovam o sono saudável, o bem-estar e a permanência de mulheres na academia.

Palavras-chave: Carreira científica, maternidade, gênero, estresse docente e sono (QS)

TITLE: "Impact of Stress, Anxiety, Sleep Disorders, and Rhythm on Women Researchers in Science".

Abstract

In recent years, the discussion about the relationship between motherhood and scientific careers has gained prominence in academic events, highlighting the physical and mental overload faced by women due to persistent scientific androcentrism and the unequal distribution of private life responsibilities. The present study aimed to investigate how motherhood impacts the professional trajectory of female researcher-academics, emphasizing the effects of stress on these women's quality of life and sleep. The research was based on data from Galeno et al. (2023), obtained from spreadsheets and questionnaires applied to university professors, and on references published between 2018 and 2025. It is a descriptive and exploratory study with a qualitative and quantitative approach, conducted in two stages: (1) survey and analysis of the base data and (2) an integrative literature review.

The results showed significant gender inequality in scientific production: men published more articles (mean of 30.5 ± 4.36), while women, especially mothers, excelled in research (11.96 ± 2.05) and extension projects (6.25 ± 1.07), activities that are undervalued by traditional metrics. In addition, female academics who are mothers showed the highest sleep latency (22.71 ± 5.50 minutes), reflecting high stress, fatigue, and cognitive impairment. It is expected that these findings will inform institutional policies that promote healthy sleep, well-being, and the retention of women in academia.

Keywords: Scientific career, motherhood, gender, faculty stress, and sleep (QS).

Introdução

A consolidação da carreira científica exige alta produtividade acadêmica, disponibilidade cognitiva contínua, estabilidade emocional e tempo dedicado à pesquisa. Contudo, esses pilares nem sempre são acessíveis de forma equitativa a todos os pesquisadores, sobretudo às mulheres, que historicamente enfrentam múltiplos obstáculos no ambiente acadêmico (Cech; Blair-loy; Rogers, 2022). As desigualdades de gênero na ciência permanecem como um desafio estrutural e multifatorial, expressando-se em discrepâncias de contratação, financiamento, ascensão a cargos de liderança e reconhecimento institucional (Morley, 2021; Williams et al., 2020). Tais assimetrias tornam-se ainda mais agudas quando cruzadas com marcadores como maternidade, raça e classe, evidenciando um cenário de desigualdades interseccionais que se refletem diretamente na produção científica (Malisch et al., 2020; Oleschuk, 2020). A literatura contemporânea aponta que a sobrecarga de trabalho remunerado e não remunerado, como os cuidados com filhos e tarefas domésticas, recai de forma desproporcional sobre as mulheres, especialmente mães pesquisadoras (Staniscuaski et al., 2021; González; Griffin, 2021). Esse desequilíbrio impacta negativamente a saúde física e mental, além de comprometer funções cognitivas essenciais para a atividade científica, como atenção, memória de trabalho e criatividade (Walker, 2019; Freeman; Walker, 2019). Entre os fatores fisiológicos e comportamentais mais afetados, destacam-se a qualidade e duração do sono (Galeno et al., 2023; Chellappa et al., 2019). Estudos indicam que a privação e fragmentação do sono, comuns entre mães docentes, estão associadas a aumento do estresse, sintomas ansiosos e redução do desempenho acadêmico (Lawrence et al., 2023; Chinn; Hall, 2021). Durante a pandemia de COVID-19, essas desigualdades foram ainda mais evidenciadas. O acúmulo de funções profissionais e familiares no ambiente doméstico intensificou a sobrecarga feminina e gerou perdas significativas na produtividade científica das mulheres, como demonstrado por diversos estudos nacionais e internacionais. No Brasil, iniciativas como o movimento “Parent in Science” têm buscado reconhecer os efeitos da maternidade na trajetória acadêmica, propondo políticas de equidade na avaliação da produção científica. Diante desse contexto, o presente artigo tem como objetivo realizar uma revisão crítica da literatura recente sobre os impactos da desigualdade de gênero e da privação de sono na produtividade acadêmica das mulheres, com ênfase nas pesquisadoras que também exercem a maternidade. Complementarmente, apresenta-se uma análise comparativa de dados de docentes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), com base no estudo de Galeno et al. (2023), de modo a ilustrar empiricamente as correlações entre sono, gênero e desempenho científico.

OBJETIVO GERAL:

Investigar as disparidades de gênero na produção acadêmica e compreender os impactos do sono e do estresse na vida docente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Revisar criticamente a literatura científica recente sobre a relação entre sono, estresse, ansiedade e desempenho acadêmico de docentes universitários da UFRN com foco nas repercussões para o desempenho científico e saúde mental dos docentes.
2. Identificar evidências sobre disparidades de gênero e parentalidade nas rotinas de sono, níveis de estresse e produtividade acadêmica, especialmente entre mães pesquisadoras.
3. Analisar como a maternidade impacta a trajetória científica de mulheres e docentes na academia, entre docentes de diferentes perfis parentais e de gênero, identificando como a parentalidade influencia o desempenho na academia.

Metodologia

O presente artigo consiste em uma revisão bibliográfica integrativa, complementada por uma análise secundária de dados do estudo intitulado “Riscos cardiometabólicos e jetlag social em professores universitários”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP/UFRN), sob o parecer nº 2.401.132. O estudo original foi conduzido entre 2018 e 2019 e publicado em 2023, envolvendo docentes do Centro de Biociências da UFRN, com coleta de dados realizada por meio de formulário eletrônico disponibilizado na plataforma Google Forms. A metodologia do presente artigo combina revisão crítica da literatura científica recente com análise comparativa de dados empíricos do estudo original, incluindo atualização em 2025 com informações obtidas na plataforma Lattes. Essa abordagem permite compreender de forma abrangente os impactos da maternidade, da privação de sono e do estresse sobre a saúde mental e a trajetória acadêmica de docentes universitários. O foco principal do estudo concentra-se em docentes mulheres que exercem a maternidade de crianças; entretanto, para possibilitar comparações de produtividade acadêmica, docentes homens também foram incluídos. Os participantes foram convidados via e-mails institucionais obtidos através do Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas (SIGAA) e contatos de projetos anteriores da mesma linha de pesquisa. O acesso ao questionário esteve condicionado à leitura e aceitação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que fornecia informações detalhadas sobre objetivos, procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. A análise se organizou em eixos temáticos inter-relacionados: sono, maternidade, desigualdade de gênero, produtividade acadêmica e níveis de estresse conciliados com as exigências da carreira. A escolha desses eixos justifica-se pela robusta evidência científica que aponta a sobrecarga física e emocional enfrentada por mulheres acadêmicas ao conciliarem responsabilidades maternas com exigências profissionais, impactando diretamente o sono, o estresse, o desempenho, a progressão na carreira e o bem-estar geral. Para organizar os dados, foi elaborada uma planilha na plataforma Google Sheets, contendo exclusivamente informações pertinentes à proposta atual. Nela foram calculadas estatísticas de médias aritméticas e erro padrão, que foram incorporadas na descrição de cada figura. A planilha reuniu apenas os docentes que preencheram voluntariamente o formulário original de Galeno et al. (2023) de maneira completa e adequada, mantendo apenas registros compatíveis com os critérios da presente análise. Cabe destacar que, embora muitas participantes se identificassem como mães, algumas eram mães de adultos, não de crianças pequenas, o que implica que nem todas enfrentam as dificuldades maternas típicas associadas ao cuidado de bebês ou crianças. Reconhece-se que essa característica reduz a especificidade do estudo, mas a análise ainda é

relevante, permitindo comparações, ampliando tópicos de discussão e gerando oportunidades científicas para reflexão, debate e conhecimento sobre questões de grande importância acadêmica e social. Os critérios de inclusão adotados na análise secundária mantiveram os do estudo original: docentes vinculados ao Centro de Biociências da UFRN, de ambos os sexos, com idades entre 25 e 65 anos, que manifestaram interesse em participar mediante preenchimento do formulário eletrônico e aceitação do TCLE. Foram excluídos estudantes de graduação, docentes afastados das atividades (por licença, férias, aposentadoria, gestação ou lactação), participantes com limitações físicas que impedissem o preenchimento adequado do questionário, aqueles que não consentiram formalmente e os que não completaram etapas presenciais do estudo original, como exames laboratoriais. Informações incompletas também foram removidas por impossibilidade de identificação no Currículo Lattes, garantindo que os dados analisados fossem consistentes e adequados para avaliação. Essa abordagem metodológica integrativa possibilita a análise crítica da literatura e a interpretação de dados empíricos de forma combinada, permitindo investigar as relações entre maternidade, sono, estresse e produtividade acadêmica. Ao incluir docentes homens para comparação, torna-se possível observar diferenças de gênero na produção científica e nas experiências de sobrecarga emocional. Além disso, a inclusão de mães de diferentes faixas etárias amplia o escopo da discussão, fornecendo subsídios para compreender a complexidade das demandas enfrentadas por mulheres na academia e para propor políticas institucionais voltadas ao bem-estar, à equidade de gênero e à permanência de mulheres pesquisadoras em carreiras científicas. Dessa forma, o estudo contribui não apenas para a compreensão de impactos individuais, mas também para a formulação de estratégias que promovam igualdade, saúde mental e produtividade sustentável no contexto acadêmico.

Resultados e Discussões

A pesquisa buscou complementar o estudo de Galeno et al. (2023), cuja planilha original não contemplava dados específicos de produção científica. Para suprir essa lacuna, foi realizada extração manual nos Currículos Lattes dos(as) participantes, permitindo calcular médias de produtividade por gênero desde o início da carreira até 2018 e, em seguida, atualizar a análise até 2025. Essa estratégia possibilitou observar mudanças longitudinais e avaliar comparações entre homens e mulheres, considerando ainda a parentalidade como variável-chave. Ressalta-se que, embora os dados femininos incluam mães, muitas delas possuem filhos adultos, o que reduz a especificidade quanto às dificuldades da maternidade de crianças pequenas, mas não elimina a relevância das análises. Também foram examinados dados de qualidade e latência do sono de docentes, coletados em 2018, reconhecendo-se a limitação temporal dessa base, mas destacando sua pertinência diante da interface com estresse, cognição e desempenho acadêmico. Para a consolidação dos dados, 14 docentes foram excluídos por falhas de identificação no Lattes, impossibilitando atualização curricular. Por fim, o estudo sublinha a carência de pesquisas que articulem, de modo integrado, eixos como produção científica, sono, gênero, maternidade e estresse, reforçando a relevância de abordagens sobre essas desigualdades na academia.

Figura 1 – Média da produção científica de docentes da UFRN por gênero (artigos, projetos de extensão e projetos de pesquisa), desde o início da carreira até 2018.

Fonte: Elaboração própria com base na análise dos Currículos Lattes dos(as) docentes investigados(as) por Galeno et al. (2023). Siglas: P.E. = Projetos de Extensão; Projetos = Projetos de pesquisa. Descrição dos achados. A análise individual dos Currículos Lattes, com

soma por pessoa e subsequente média aritmética por tipo de produção, evidencia disparidades de gênero na trajetória acumulada até 2018. A análise foi feita baseando o número total de publicações de artigos, participação em projetos de extensão (P.E) e projetos científicos em geral. Foi-se dividido então em cada um desses grupos de Mulheres Docentes (cor azul) e Homens Docentes (cor amarela). Em artigos, docentes homens apresentaram média de 35 enquanto mulheres tiveram 22. Em projetos de pesquisa, as docentes do gênero feminino apresentaram média de $11,96 \pm 2,05$, superando os docentes do gênero masculino, cuja média foi de $8,29 \pm 1,44$. Nos projetos de extensão (P.E.), verificou-se novamente maior desempenho entre as mulheres ($6,25 \pm 1,07$) em comparação aos homens ($3,70 \pm 0,64$). Quanto à produção de artigos, as mulheres exibiram média de $11,96 \pm 3,92$, enquanto os homens obtiveram $8,29 \pm 6,23$. Esses resultados evidenciam não apenas a maior participação das docentes mulheres em projetos de pesquisa e extensão, mas também uma produtividade científica globalmente mais elevada, ainda que associada a maior dispersão em algumas variáveis. O predomínio masculino em artigos tradicionalmente a “moeda” de maior valor para progressão na carreira, financiamento e reconhecimento sugere a atuação de fatores estruturais e barreiras sistêmicas que afetam de modo desigual a conversão do trabalho acadêmico em publicações, sobretudo entre mulheres. Por sua vez, as médias superiores femininas em projetos de pesquisa e extensão apontam possível direcionamento (ou preferência condicionada) para atividades de alta relevância institucional e social, mas menos valorizadas quando a métrica central é a publicação de artigos. Estudos anteriores já identificaram esse padrão de maior engajamento feminino em atividades de ensino, pesquisa aplicada e extensão, em contraste com o predomínio masculino em artigos e publicações de maior impacto (Santos; Lima, 2019; Leite; Bastos; Paula, 2020). Essa tendência reforça a hipótese de que a sobrecarga da maternidade e do trabalho doméstico, frequentemente atribuída às mulheres, compromete a disponibilidade de tempo contínuo necessário para a redação de artigos (Maluf; Silva, 2021). Ao mesmo tempo, a maior média feminina em projetos de pesquisa e extensão sugere não apenas um direcionamento institucional, mas também uma forma de resistência e inserção acadêmica por meio de atividades de impacto social. Assim, os resultados aqui encontrados não apenas corroboram a literatura, mas também indicam que a desigualdade de gênero na produção científica permanece como um fenômeno estrutural e persistente.

Figura 2 - Média da produção científica por gênero de docentes da UFRN no período pós-2018, com análise curricular via Lattes até 2025.

Fonte: Elaboração própria com base na análise dos Currículos Lattes dos(as) docentes investigados(as) por Galeno et al. (2023), utilizando-se as informações de 2018 (nome, e-mail institucional e departamento) para rastreamento.

Nota técnica: Figura em barras agrupadas (Google Sheets) Foi feita a ilustração azul para o grupo feminino e amarela para o masculino para abordar as três vistas consideráveis de produção científica (Projetos de pesquisa, Média de Artigos e Projetos de Extensão/P.E).

Limitação declarada: embora a produção tenha sido observada até 2025, a extração operacional registrou atualizações até o final de 2019, o que impõe defasagem temporal e deve ser considerado na interpretação. Descrição dos achados. A atualização do levantamento para o pós-2018 reproduz o padrão observado na Figura 1. Na produção de artigos, os docentes homens apresentaram média superior ($30,5 \pm 4,36$) em comparação às docentes mulheres ($22,8 \pm 3,47$). Em contrapartida, nas atividades de pesquisa, as mulheres mantiveram vantagem, com média de $6,61 \pm 1,06$, superando os homens ($4,66 \pm 0,76$). Do mesmo modo, nos projetos de extensão (P.E.), as docentes do gênero feminino exibiram desempenho mais elevado ($4,74 \pm 1,11$) em relação aos docentes do gênero masculino ($1,87$

$\pm 0,83$). Esses achados reforçam a tendência de maior envolvimento das mulheres em iniciativas de pesquisa e extensão, ao passo que os homens concentram-se mais fortemente na publicação de artigos científicos. Análise interpretativa. A persistência dessas diferenças sugere desigualdades estruturais que não se restringem ao início da carreira, perdurando ao longo do tempo. Em sistemas de avaliação que conferem maior peso a artigos, o engajamento feminino elevado em projetos de pesquisa e extensão tende a ser subvalorizado, produzindo efeitos cumulativos sobre promoção e reconhecimento (Santos; Lima, 2019). A priorização de artigos por homens pode refletir menor interrupção das rotinas acadêmicas e maior disponibilidade de períodos longos de trabalho, ao passo que a maior participação feminina em atividades de extensão (com alta demanda de gestão e articulação) muitas vezes não se converte, na mesma proporção, em publicações (Maluf; Silva, 2021; Oliveira et al., 2024; Jaramillo et al., 2025). Tais elementos dialogam com a discussão sobre carga mental, parentalidade e qualidade do sono (cf. seção de eixos e Figuras 3 e 4). Síntese parcial. A comparação entre as Figuras 1 (até 2018) e 2 (pós-2018) confirma a robustez do padrão: homens concentram médias mais altas em artigos, enquanto mulheres lideram em projetos de pesquisa e extensão. Esse arranjo, consolidado e persistente, tem implicações diretas para a equidade e a progressão na carreira docente. Limitações específicas. Algumas limitações dessa etapa são dadas devido a: (i) rastreabilidade dependente dos Currículos Lattes, com possível subregistro ou atualização desigual entre docentes; (ii) dados de parentalidade (número de filhos, status atualizado) indisponíveis no período pós-2018, inviabilizando correlações diretas entre produção e filhos/as; (iii) fatores contextuais (estressores externos, licenças/afastamentos) não controlados; (iv) defasagem temporal: embora a janela pós-2018 tenha sido estendida até 2025, a coleta operacional capturou atualizações até 2019, o que pode subestimar a produção mais recente (Oliveira et al., 2024).

Figura 3. – Média da Parentalidade UFRN em 2018 por Gênero e Status Parental (Projetos de Pesquisa, Artigos e Projetos de Extensão – P.E.)

Fonte: De autoria própria, com base em dados analisados pela Plataforma Lattes e no estudo de Galeno et al. (2023).

Siglas: MSF= Mulheres sem; MCF= Mulheres com filhos; HCF= Homens com filhos; HSF=Homens sem filhos.

O gráfico de pizza foi criado com base na Planilha e representa a proporção do número total de filhos para cada um dos grupos analisados. A visualização do gráfico permite observar claramente a maior proporção de filhos no grupo de Mulheres com filhos, seguida pelos Homens com filhos. O menor percentual é do grupo de Homens sem filhos. O objetivo da criação dessa figura foi analisar a porcentagem do total de docentes que responderam o questionário teriam filhos e quantos não teriam. A Figura 3 apresenta a média da produção científica de docentes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) no ano de 2018, desagregada por gênero (homens e mulheres) e status parental (com ou sem filhos). Os dados de parentalidade foram obtidos por meio de questionário aplicado em 2018, não estando disponíveis na Plataforma Lattes, o que inviabiliza sua atualização posterior. Ressalta-se o caráter exploratório da análise, considerando o tamanho limitado de alguns subgrupos. Os grupos foram representados por cores distintas nas figuras: mulheres com filhos (MCF, vermelho claro, $n = 21$), mulheres sem filhos (MSF, rosa, $n = 10$), homens com filhos (HCF, azul, $n = 17$) e homens sem filhos (HSF, azul escuro/cobalto, $n = 6$), totalizando 69 docentes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Em termos de produção científica, as médias observadas foram: para MCF, projetos de pesquisa $13,66 \pm 7,55$, artigos $19,95 \pm 7,55$ e P.E. (projetos de extensão) $5,80 \pm 7,55$. Entre as MSF, registrou-se média de projetos de pesquisa $8,94 \pm 11,17$, artigos $39,11 \pm 11,17$ e P.E. $5,11 \pm 11,17$. No grupo de

HCF, as médias foram de $9,20 \pm 13,79$ para projetos de pesquisa, $22,00 \pm 13,79$ para artigos e $7,30 \pm 13,79$ em P.E. Já os HSF apresentaram média de $7,83 \pm 5,31$ em projetos de pesquisa, $23,33 \pm 5,31$ em artigos e $5,33 \pm 5,31$ em P.E. Com base nesses dados, é possível concluir que há uma disparidade significativa na produção científica entre docentes homens e mulheres da UFRN, mesmo no período pós-2018. Embora ambos os grupos apresentem participação em artigos, projetos de pesquisa e projetos de extensão, observa-se que os homens mantêm maior média de produção científica em praticamente todas as categorias analisadas. Esse resultado reflete um padrão de desigualdade de gênero já apontado em diferentes estudos, no qual as pesquisadoras enfrentam barreiras estruturais que podem estar relacionadas a sobrecarga de atividades não acadêmicas, como responsabilidades domésticas e maternais, além da escassez de políticas institucionais de apoio. Isso também exhibe que a predominância de docentes com filhos é exibida pelo público de docentes feminino, demarcando que, conforme evidenciado por Santos e Lima (2019), as mulheres enfrentam desafios específicos na conciliação entre maternidade e carreira acadêmica. Estudos recentes, como o de Barros e Mourão (2018), corroboram essa perspectiva, indicando que a maternidade impacta diretamente na trajetória profissional das mulheres, refletindo-se em menor produtividade científica e avanços mais lentos na carreira. Além disso, a pesquisa de Della Zanna-Zanon et al. (2023) destaca que a escassez de políticas de apoio institucional contribui para a sobrecarga das docentes mães, dificultando a conciliação entre as demandas acadêmicas e familiares. Assim, embora a academia exija um desempenho intelectual contínuo e de alta complexidade, falha em oferecer suporte adequado às suas trabalhadoras. A naturalização da sobrecarga, somada à ausência de reconhecimento institucional da maternidade, perpetua ciclos de exaustão física e emocional. Intervenções estruturais, com base em dados como os apresentados por Staniscuaski et al. (2021), Campos et al. (2024) e Ramos et al. (2023), são urgentes para conter a evasão silenciosa de mulheres da carreira científica e garantir um ambiente acadêmico mais justo, saudável e produtivo. Esses dados reforçam a necessidade de políticas públicas e institucionais que promovam a equidade de gênero na academia, oferecendo suporte adequado às docentes que também desempenham o papel de mães.

Figura 3.1- Correlação entre Produção Científica e Parentalidade de Docentes.

Fonte: Elaboração própria com dados analisados via Currículo Lattes e Parentalidade com base nas respostas dos questionários do estudo de Galeno et al. (2024).

A análise da produção científica por gênero e status parental, com base nos dados coletados em 2018, permite compreender os efeitos da parentalidade na trajetória acadêmica dos docentes do Centro de Biociências da UFRN. A Tabela 3, representada graficamente na figura, sintetiza informações relativas à média de produção científica em três frentes: projetos de pesquisa, artigos e projetos de extensão, discriminando os grupos por sexo e parentalidade. O primeiro segmento da coluna (azul) representa homens com filhos. A quantidade de produção é de aproximadamente 14 projetos de pesquisa, 20 artigos e 6 projetos de extensão. O grupo seguinte (laranja) representa homens sem filhos, com cerca de 9 projetos de pesquisa, 39 artigos e 5 projetos de extensão. Essa comparação evidencia que, para os homens, a paternidade impacta diretamente a produção de artigos, com uma queda acentuada em relação aos homens sem filhos, que apresentam a maior produtividade neste quesito. Por outro lado, o engajamento em projetos de pesquisa parece ser maior para os pais. O segmento (verde) representa mulheres com filhos. A quantidade de produção é de aproximadamente 9 projetos de pesquisa, 22 artigos e 7 projetos de extensão. O último segmento (vermelho) representa mulheres sem filhos, com cerca de 8 projetos de pesquisa, 24 artigos e 6 projetos de extensão. Essa comparação evidencia que a maternidade também impacta a produção de

artigos, embora a diferença entre as mulheres com e sem filhos seja menos acentuada do que a observada entre os grupos de homens. As mulheres, especialmente as mães, apresentam maior engajamento em projetos de extensão. A análise intergrupos evidencia disparidades profundas: homens sem filhos apresentaram a maior quantidade de artigos publicados (cerca de 39), superando todos os outros grupos. Mulheres sem filhos são o segundo grupo mais produtivo em artigos, com cerca de 24. No entanto, a comparação entre homens com filhos (aproximadamente 20 artigos) e mulheres com filhos (cerca de 22 artigos) demonstra que, mesmo compartilhando o status de parentalidade, as mulheres mantêm uma produtividade de artigos um pouco maior, o que pode sugerir um ajuste de estratégias de produção ou uma menor sobrecarga de tarefas acadêmicas (Zimmermann; Almeida, 2023). Em contrapartida, os homens com filhos são os líderes na quantidade de projetos de pesquisa (aproximadamente 14), e as mulheres com filhos na quantidade de projetos de extensão (cerca de 7). Isso sugere que a parentalidade pode direcionar a produção acadêmica para atividades que oferecem maior flexibilidade ou que permitem um ritmo de trabalho menos concentrado em longos períodos, o que é característico da escrita de artigos (Soares ; Ferreira, 2024; Gomes; Pereira, 2022). Os resultados revelam diferenças significativas de gênero. De modo geral, as mulheres, especialmente as mães, apresentaram menor número de publicações e projetos em comparação aos colegas homens, evidenciando os impactos da sobrecarga de trabalho doméstico e de cuidado tradicionalmente atribuída às mulheres Almeida; Souza, 2024; Silva; Costa, 2023) Em contraste, a maternidade não parece impactar de maneira tão acentuada a produção acadêmica masculina, sugerindo a presença de desigualdade estrutural e distribuição desigual das responsabilidades parentais (Cunha; Silva, 2023; Martins; Oliveira, 2023). Além disso, a maior participação feminina em projetos de pesquisa e extensão, comparativamente aos homens, sugere a presença de uma “carga invisível”, consistente com a sobrecarga de tarefas acadêmicas e domésticas que limita o tempo para atividades de alta concentração intelectual, como a produção de artigos científicos (Souza; Lima, 2024; Zimmermann; Almeida, 2023). Esses resultados ressaltam a necessidade de políticas institucionais que considerem as dimensões da desigualdade de gênero na academia.

Figura 4 - Duração Média e Latência Média do Sono por Gênero e Status Parental de Docentes da UFRN (Dados de 2018).

Fonte: autoria própria, com base nos questionários utilizados nos estudos de Galeno et al. (2023).

A Figura 4 apresenta a comparação entre a duração média do sono, expressa em horas, e a latência média do sono, expressa em minutos, entre docentes da UFRN categorizados por gênero (masculino e feminino) e status parental (com e sem filhos). Em cada grupo, a latência do sono é representada pela cor amarela e a duração do sono pela cor azul. Os valores são médias aritméticas simples calculadas a partir de dados autorreferidos no questionário aplicado em 2018. Destaca-se que a análise apresenta limitações devido ao tamanho amostral específico, não sendo generalizável para toda a população docente. A análise evidencia padrões distintos nas relações entre gênero, parentalidade e sono. As mulheres com filhos ($n = 21$) apresentaram a maior latência média do sono, com $22,71 \pm 5,50$ minutos, valor superior ao das mulheres sem filhos ($15,83 \pm 3,83$ minutos) e mais que o dobro dos homens com filhos ($12,35 \pm 2,99$ minutos), indicando sobrecarga mental e estresse associados à conciliação entre trabalho acadêmico, maternidade e tarefas domésticas. Os homens sem filhos apresentaram latência média de $22,00 \pm 5,50$ minutos, semelhante ao das mulheres com filhos, possivelmente relacionada a fatores estressogênicos distintos, como rotina instável ou excesso de demandas individuais.

Quanto à duração do sono, mulheres com filhos dormiram, em média, $8,36 \pm 2,02$ horas, superando as mulheres sem filhos ($6,53 \pm 1,58$ horas), possivelmente em virtude de maior estabilidade profissional, filhos mais velhos ou apoio institucional/familiar. Já os homens com filhos relataram $6,13 \pm 1,48$ horas, enquanto os sem filhos apresentaram $8,38 \pm 2,09$ horas, sugerindo que a parentalidade masculina impacta a duração do sono de maneira linear, sem afetar de forma relevante a latência.

Os resultados indicam precisão das médias e consistência dos dados em cada grupo. A análise conjunta da latência e duração do sono sugere impacto desproporcional sobre mulheres, especialmente mães docentes: apesar de dormirem mais, a latência elevada indica pior qualidade subjetiva do sono, refletindo maior estresse emocional e mental. Homens com filhos adormecem mais rápido, evidenciando divisão desigual das tarefas domésticas. Esses dados reforçam que mulheres enfrentam maiores obstáculos na carreira devido à acumulação de funções produtivas, reprodutivas e afetivas (Santos et al., 2020; Silva et al., 2021). Revisões apontam que normas sociais de gênero e estressores crônicos determinam pior sono feminino (Sleep in Women, 2023). Galeno et al. (2022) indicam maior prevalência de sono ruim em mulheres casadas entre 32–65 anos, compatível com maternidade ativa. Falta de políticas institucionais, como flexibilidade de horários, licenças parentais e suporte à conciliação vida-trabalho, contribui para sobrecarga cumulativa, afetando saúde mental, bem-estar e produtividade acadêmica (Almeida et al., 2022; Pereira et al., 2023; Costa; Lima, 2024). Esses achados reforçam a necessidade de medidas estruturais que promovam equidade de gênero, valorizem pesquisa e reduzam o impacto desproporcional da maternidade na carreira científica feminina.

Conclusão

Este estudo de revisão bibliográfica, associado à análise secundária de dados, evidencia as disparidades de gênero na carreira científica, destacando o impacto da maternidade, do estresse e dos distúrbios do sono na produtividade e no bem-estar de mulheres pesquisadoras (Misra et al., 2021; Moreira et al., 2022; Oliveira; Araújo, 2023). Os resultados indicam que a produção acadêmica, particularmente em artigos, é desigual entre os gêneros, com homens apresentando maior média de publicações tanto antes quanto após 2018. Em contrapartida, mulheres, especialmente mães, demonstram maior engajamento em projetos de pesquisa e extensão, atividades de relevância social e institucional frequentemente subvalorizadas nos sistemas de avaliação que priorizam artigos (Guedes; Cabral, 2021). A parentalidade, sobretudo a maternidade, acentua essas desigualdades. Homens sem filhos publicam significativamente mais artigos do que qualquer outro grupo, enquanto mulheres com filhos mantêm produtividade em artigos ligeiramente superior à dos homens com filhos, mas lideram em projetos de extensão. Isso evidencia que as responsabilidades de cuidado recaem desproporcionalmente sobre as mulheres, limitando tempo e energia para atividades que exigem longos períodos de concentração, como a redação de artigos científicos (Leta; Martins, 2020; Mason; Wolfinger, 2022). Dados de sono de 2018 revelam que mulheres com filhos apresentam maior latência do sono, refletindo sobrecarga mental e estresse elevados. Embora durmam mais horas que mulheres sem filhos, a latência elevada indica pior qualidade subjetiva do sono, resultado da conciliação entre vida profissional, maternidade e tarefas domésticas. Tais achados corroboram estudos que apontam normas sociais de gênero e estressores crônicos como determinantes de pior qualidade do sono entre mulheres (Santos et al., 2020; Silva et al., 2021; Walker, 2019). A ausência de políticas institucionais de apoio, como flexibilidade de horários, licenças parentais estendidas e programas de suporte contribuíram para sobrecarga cumulativa das docentes mães, afetando saúde mental, bem-

estar e produtividade. A naturalização dessa sobrecarga e a falta de reconhecimento institucional da maternidade perpetuam um ciclo de exaustão, que pode resultar em um "abandono silencioso" da carreira científica por mulheres (Almeida et al., 2022; Pereira et al., 2023; Costa; Lima, 2024). Em síntese, as desigualdades de gênero na academia são estruturais e multifatoriais, com a maternidade constituindo um marcador central de assimetria, refletindo-se na produção científica e na qualidade de vida das docentes. É urgente que instituições acadêmicas implementem políticas baseadas em evidências que promovam equidade de gênero, valorizem todas as formas de produção científica e ofereçam suporte robusto a mães pesquisadoras, garantindo permanência, desempenho e sucesso na carreira universitária.

Referências

1. ALMEIDA, C. et al. Mental health and work-life balance in academic mothers: institutional challenges. *International Journal of Academic Research*, v. 14, n. 3, p. 89-103, 2022.
2. ALMEIDA, C.; SOUZA, F. Desafios da maternidade acadêmica e desigualdade de gênero na ciência. *Revista Estudos Feministas*, v. 32, n. 2, p. 201-219, 2024.
3. CECH, E.; BLAIR-LOY, M.; ROGERS, L. The changing career trajectories of new parents in STEM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 119, n. 9, e2100535119, 2022.
4. CHELLAPPA, S. L. et al. Circadian disruption: causes, consequences and countermeasures. *Sleep Medicine Reviews*, v. 43, p. 23-36, 2019.
5. CHINN, J.; HALL, R. Academic women, sleep, and the pandemic: a hidden toll. *Gender, Work & Organization*, v. 28, n. S3, p. 350–362, 2021.
6. COSTA, M.; LIMA, R. Políticas de apoio à maternidade na carreira acadêmica: avanços e desafios. *Revista Gênero e Direito*, v. 13, n. 1, p. 45-62, 2024.
7. CUNHA, A.; SILVA, J. Maternidade e produtividade acadêmica: uma análise interseccional. *Revista de Ciências Sociais*, v. 54, n. 1, p. 120-137, 2023.
8. FREEMAN, D.; WALKER, M. Sleep and mental health: Critical connections. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 20, n. 9, p. 505–517, 2019.
9. GALENO, T. C. C. et al. Cardiometabolic risk factors and social jetlag in university professors. *Sleep Science*, v. 16, n. 2, p. 163–172, 2023.
10. GALENO, T. C. C. et al. Disparidades de gênero na produção acadêmica: análise de docentes no Brasil. *Revista Brasileira de Educação Médica*, v. 46, n. 4, p. 51-64, 2022.
11. GALENO, T. C. C. et al. Sono, parentalidade e desigualdade de gênero em docentes universitários: novas evidências. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*, v. 46, n. 1, p. 22-35, 2024.

12. GOMES, A.; PEREIRA, V. Sono, maternidade e desempenho acadêmico: uma revisão integrativa. *Revista de Saúde Coletiva*, v. 32, n. 1, p. 34-48, 2022.
13. GONZÁLEZ, R.; GRIFFIN, K. Academic motherhood in pandemic times. *Gender, Work & Organization*, v. 28, n. S2, p. 243–249, 2021.
14. GUEDES, M.; CABRAL, L. Produtividade acadêmica e desigualdade de gênero: panorama nacional. *Revista Brasileira de Pós-Graduação*, v. 18, n. 2, p. 155-172, 2021.
15. LAWRENCE, A. et al. Sleep and stress among academic mothers: Implications for health and productivity. *Journal of Sleep Research*, v. 32, n. 1, e13612, 2023.
16. LETA, J.; MARTINS, A. Desigualdade de gênero na ciência brasileira: evidências e tendências. *Scientometrics*, v. 124, n. 2, p. 1245–1268, 2020.
17. MALISCH, J. L. et al. Opinion: In the wake of COVID-19, academia needs new solutions to ensure gender equity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 27, p. 15378–15381, 2020.
18. MISRA, J. et al. The motherhood penalty in academia: global perspectives. *Sociology of Education*, v. 94, n. 4, p. 299-315, 2021.
19. MOREIRA, L. et al. Gênero, maternidade e produção científica: impactos na trajetória de docentes. *Revista Brasileira de Educação*, v. 27, p. 1-19, 2022.
20. MORLEY, L. Gender in higher education: global trends, debates and policies. *British Journal of Sociology of Education*, v. 42, n. 7, p. 981–996, 2021.
21. MASON, M.; WOLFINGER, N. Gender equity and family in academia: revisiting persistent inequalities. *Sociological Forum*, v. 37, n. 2, p. 456–473, 2022.
22. OLESCHUK, M. Gender equity considerations for tenure and promotion during COVID-19. *Canadian Review of Sociology*, v. 57, n. 3, p. 502–515, 2020.
23. OLIVEIRA, D.; ARAÚJO, P. Gênero, maternidade e desigualdade acadêmica no Brasil. *Cadernos de Pesquisa*, v. 53, n. 149, p. 233–251, 2023.
24. PEREIRA, A. et al. Academic mothers and institutional policies: a systematic review. *Journal of Higher Education Policy and Management*, v. 45, n. 2, p. 123-138, 2023.
25. SANTOS, M. et al. Sono, estresse e gênero na docência universitária. *Revista Brasileira de Educação Médica*, v. 44, n. 4, p. 12-21, 2020.
26. SILVA, E.; COSTA, H. Trabalho acadêmico e desigualdade de gênero: uma análise institucional. *Revista Administração em Debate*, v. 11, n. 2, p. 55-72, 2023.
27. SILVA, J. et al. Sono, maternidade e saúde mental em docentes universitárias. *Revista de Saúde Pública*, v. 55, p. 87-95, 2021.
28. SOARES, P.; FERREIRA, A. Desigualdade de gênero e políticas acadêmicas no Brasil. *Revista Brasileira de Educação Superior*, v. 10, n. 2, p. 102-119, 2024.

29. SOUZA, V.; LIMA, M. Produtividade acadêmica e maternidade: revisão sistemática. *Revista de Estudos de Gênero*, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2024.
30. STANISCUASKI, F. et al. Gender, race and parenthood impact academic productivity during the COVID-19 pandemic: from survey to action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 36, e2106548118, 2021.
31. WALKER, M. *Why we sleep: Unlocking the power of sleep and dreams*. New York: Scribner, 2019.
32. WILLIAMS, J. C. et al. Beyond the “chilly climate”: Eliminating bias against women and mothers in academia. *Gender & Society*, v. 34, n. 1, p. 1–23, 2020.
33. ZIMMERMANN, L.; ALMEIDA, R. Sono e desigualdade de gênero: implicações para a saúde acadêmica. *Revista Brasileira de Saúde Coletiva*, v. 28, n. 3, p. 215-230, 2023.

CÓDIGO: SB0918

AUTOR: MARCO AURELIO DE ALMEIDA MARINHO

ORIENTADOR: IURI GOULART BASEIA

TÍTULO: *Cyathus* Haller (Basidiomycota) na caatinga e em áreas de Mata Atlântica no nordeste do Brasil

Resumo

O gênero *Cyathus* Haller (Basidiomycota) reúne fungos sapróbios caracterizados por seus corpos de frutificação em forma de ninho, no interior dos quais se encontram peridiólos responsáveis pela dispersão dos esporos. Esses organismos exercem papel essencial nos ecossistemas florestais por atuarem na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes. Apesar de possuírem ampla distribuição, ainda são pouco estudados no Brasil, sobretudo na região Nordeste, onde o conhecimento micológico permanece fragmentado. Neste estudo, foram analisadas seis espécimes de *Cyathus* coletadas em remanescentes de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte, especificamente no Parque das Dunas e no município de Nísia Floresta. A análise morfológica permitiu a descrição detalhada das espécies, além da confirmação de registros para o estado, representando um avanço no inventário de fungos da região. A ocorrência de *Cyathus* nesses ambientes ressalta a importância da preservação de áreas de vegetação nativa, uma vez que tais fungos desempenham funções ecológicas relevantes e podem servir como bioindicadores de qualidade ambiental.

Palavras-chave: biodiversidade; fungos; gasteroides; micologia

TITLE: *Cyathus* Haller (Basidiomycota) in the Caatinga and Atlantic Forest Areas

Abstract

The genus *Cyathus* Haller (Basidiomycota) comprises saprobic fungi characterized by their nest-shaped fruiting bodies, inside which peridioles responsible for spore dispersal are found. These organisms play an essential role in forest ecosystems by contributing to the decomposition of organic matter and nutrient cycling. Despite their wide distribution, they remain poorly studied in Brazil, especially in the Northeast region, where mycological knowledge is still fragmented. In this study, six specimens of *Cyathus* were analyzed from remnants of the Atlantic Forest in Rio Grande do Norte, specifically in Parque das Dunas and the municipality of Nísia Floresta. Morphological analysis allowed for a detailed description of the species, as well as the confirmation of records for the state, representing an advance in the fungal inventory of the region. The occurrence of *Cyathus* in these environments highlights the importance of preserving areas of native vegetation, since these fungi play relevant ecological roles and may serve as bioindicators of environmental quality.

Keywords: biodiversity; fungi; gasteroides; micology

Introdução

O gênero *Cyathus* Haller (Basidiomycota) é reconhecido por seus basidiomas em formato de vaso ou sino invertido, contendo pequenas estruturas chamadas peridíolos, responsáveis pela dispersão dos esporos por meio do impacto de gotas de água, mecanismo conhecido como “*splashcup*” (Brodie, 1975; Money, 2014). Popularmente chamados de “bird’s nest fungi” ou fungos “ninho de pássaro”, apresentam peridíolos que lembram ovos dispostos dentro de um ninho, o que facilita sua identificação visual em campo (Lloyd, 1906; Brodie, 1975). São classificados como gasteroides, um grupo caracterizado por apresentar basidiomas fechados, nos quais a produção e liberação dos esporos ocorrem de forma protegida, diferindo de outros basidiomicetos que apresentam himênio exposto. Essa morfologia peculiar está relacionada a estratégias adaptativas de dispersão, que, no caso de *Cyathus*, envolvem a interação direta com a água da chuva, por meio do sistema conhecido como “*splashcup*”, que catapulta os peridíolos para longe, para garantir a propagação eficiente deles no ambiente. Durante seu desenvolvimento, os basidiomas passam por fases vegetativa e reprodutiva. O corpo de frutificação, formado na fase reprodutiva, é utilizado como principal critério para delimitação das espécies. Seu crescimento depende de fatores ambientais como umidade, disponibilidade de matéria orgânica, pH do solo e incidência de luz (Toledo et al., 2014; Sánchez, 2017). Além dos aspectos morfológicos e taxonômicos, é fundamental destacar o papel ecológico de espécies de *Cyathus* nos ecossistemas florestais. Ao degradar folhas, restos de madeira e outros materiais vegetais, liberam elementos essenciais de volta ao solo, mantendo a fertilidade e a saúde do ecossistema. Estudos com *Cyathus olla* (Batsch) Pers. mostraram a produção de enzimas capazes de quebrar lignina e celulose, evidenciando sua função ativa na manutenção do ciclo de nutrientes (Brodie, 1984; Shinnars-Carneley et al., 2002). Considerando essa relevância ecológica e a escassez de estudos micológicos no Nordeste brasileiro, especialmente em áreas de Mata Atlântica, este trabalho buscou analisar a diversidade de espécies de *Cyathus* no Rio Grande do Norte. As coletas foram realizadas no Parque das Dunas, uma Unidade de Conservação urbana de grande importância para a manutenção da biodiversidade local, e no município de Nísia Floresta, que abriga fragmentos de vegetação nativa ainda pouco explorados cientificamente. A escolha dessas áreas permite não apenas ampliar o inventário de fungos do estado, mas também contribuir para a compreensão do papel desses organismos em ecossistemas ameaçados pelo avanço da urbanização e de outras atividades antrópicas.

A Mata Atlântica é um dos biomas mais biodiversos e ameaçados do mundo, restando pouco mais de 12% de sua cobertura original no Brasil (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2022). No Rio Grande do Norte, ocorre de forma fragmentada e sob forte pressão antrópica, mas ainda mantém elevada diversidade biológica e relevância ecológica. O estudo de *Cyathus* nesses remanescentes reforça a importância da conservação desse bioma.

O presente estudo analisou exsiccatas de *Cyathus* provenientes de remanescentes de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte, especificamente no Parque das Dunas e em Nísia Floresta. A pesquisa visa preencher lacunas sobre a distribuição do gênero na região e reforçar a importância da conservação de vegetação nativa. Além disso, os resultados podem subsidiar estudos futuros em taxonomia, ecologia e biotecnologia fúngica, já que algumas espécies do gênero apresentam potencial para produção de antibióticos, controle biológico de patógenos e metabolitos com atividades neurotróficas e anti-inflamatórias (Anke, 1977; Kang et al., 2007; El-Fallal & Moussa, 2008; Yin, 2020).

Metodologia

Os materiais coletados foram provenientes de coletas realizadas durante o período de 2022 e 2024 ao longo de trilhas já estabelecidas, sendo necessário em alguns momentos avançar para áreas internas da mata, com o intuito de ampliar a exploração da região. Para o processo de coleta e preservação dos espécimes fúngicos, foram seguidos os procedimentos descritos por Fidalgo & Bononi (1984) e Silva et al. (2014), sendo realizadas em dois remanescentes de Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Norte: a Floresta Nacional de Nísia Floresta, localizada no município de Nísia Floresta, e o Parque Estadual Dunas do Natal, em Natal. Durante as coletas, cada basidioma foi fotografado e foram registradas informações como nome do coletor, data da coleta, geolocalização e tipo de substrato, seguindo recomendações de Silva et al. (2014).

Após a coleta, os materiais foram levados ao laboratório e desidratados em desidratador elétrico a 40 °C por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram armazenados em sacos plásticos tipo zip-lock, identificados e depositados na Coleção UFRN-Fungos, no Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Para a análise macroscópica, utilizou-se o microscópio estereoscópico Nikon SMZ1500 com câmera Nikon DS-Ri1 acoplada para captura de imagens e medições. Foram avaliadas características como altura total dos basidiomas, diâmetro da parte superior, formato, presença de marcações transversais, tipo de tomento, dimensões das hifas na margem da boca e coloração, utilizando o guia de cores Methuen Handbook (Kornerup & Wanscher, 1978).

A análise microscópica foi realizada com microscópio óptico Nikon Eclipse Ni-U, também equipado com câmera DS-Ri1. Os peridiolos foram cuidadosamente cortados com uma lâmina de aço e macerados em solução de Hidróxido de Potássio (KOH) 5% até obtenção de suspensão homogênea. Em cada espécime, foram avaliados 30 basidiósporos quanto a forma, altura, largura, espessura da parede, coloração, ornamentação, número de esporos e presença de ápice. A identificação e classificação seguiram a literatura especializada do grupo (Lloyd, 1906; Brodie, 1984; Cruz, 2017; Góis, 2021).

Resultados e Discussões

As análises morfológicas permitiram identificar três espécies já conhecidas: *Cyathus triplex* Lloyd, *Cyathus earlei* Lloyd, *Cyathus limbatus* Tul. & C. Tul.

Tratamento taxonômico

Cyathus earlei Lloyd. In Mycol. Writ. 2, Nidulariaceae 26 (1906).

Substrato: Madeira em decomposição.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Natal. Floresta Nacional de Nísia Floresta e Parque Estadual Dunas do Natal. Col. MORAIS, V.S.; Junior, F.A.A.M.; Freitas, I.F.S.; Nascimento, P.H.G.; Costa, A.B.M. (UFRN – Fungos 3790); (UFRN – Fungos 3791); (UFRN – Fungos 3792); (UFRN – Fungos 3793).

Perídio infundibuliforme de 7,60 - 9,00 mm de altura, 5,63 - 6,76 mm de largura na porção superior, não expandido na boca, não afilando na base. Embasamento de 2,84 - 3,12 mm, conspicuo, de coloração marrom escuro (6F5). Exoperídio hirsuto, marrom escuro (6F5) a (6F8), com tomentos de 0,34 - 0,60 mm, arranjados em tufos regulares orientados para

baixo ou para fora, variando entre cada amostra e flexíveis. Parede externa inconspicuamente plicada, com 0,34 - 0,52 mm entre as marcações. Boca finamente fimbriada em padrão contínuo, 0,19 - 0,27 mm de altura, marrom escuro (6F5). Endoperídio cinza claro levemente prateado (7C1), inconspicuamente plicado a conspicuamente plicado com 0,45 - 0,62 mm entre as marcações. Brilho perceptível, contrastando com o exterior. Estipe de 1,25 - 1,57 mm, preto (14F1). Epifragma da mesma cor do exoperídio, flexível. Peridíolo cinza escuro (8F2), cerca de 11 por basidioma, 1,73 - 2,10 mm × 1,84 - 2,22 mm, de formato circular, liso a levemente enrugado, túnica presente em apenas uma das amostras e córtex duplo, sendo exocórtex negro, endocórtex negro e mesocórtex branco. Hifas do mesocórtex compactas e apresentando característica pulverulenta em apenas uma amostra. Basidiosporos lisos, hialinos, numerosos, 13,78 - 18,76 × 7,87 - 12,40 µm (L = 16,17 µm; W = 10,17 µm); elipsoide a cilíndrico (Q = 1,32 - 2,08), em média alongado (Qm = 1,64), sem apículo presente e parede de 1,68 - 3,35 µm.

Figura 1 – *Cyathus earlei*. A. Exoperídio hirsuto. B. Cortex duplo. C. Peridíolos liso. D. Basidiosporos alongados.

Comentários: Entre os quatro espécimes identificados como *Cyathus earlei*, um apresentou características morfológicas que se aproximam da descrição de *Cyathus* aff. *earlei* discutida por Góis (2021). Os espécimes brasileiros analisados por Góis (2021) exibem córtex duplo bem delimitado em todo o peridíolo e endoperídio com marcações mais evidentes. O material obtido no presente estudo compartilha essas variações, reforçando a hipótese de que há um possível complexo de espécies atualmente agrupadas sob a denominação *C. earlei*.

Cyathus triplex Lloyd, The Nidulariaceae or “bird’s nest fungi” (1906).

Substrato: Madeira em decomposição.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Natal. Floresta Nacional de Nísia Floresta. Col. MORAIS, V.S.; Junior, F.A.A.M.; J.S. Góis.; Freitas, I.F.S.; Nascimento, P.H.G.; Costa, A.B.M. (UFRN – Fungos 3795).

Perídio infundibuliforme de 7,37 - 9,84 mm de altura, 4,75 - 7,29 mm de largura na porção superior, não expandido na boca, não afilando na base, nem formando pedicelo. Embasamento de 3,35 - 4,67 mm, conspícuo, de coloração marrom escuro (7F6). Exoperídio hirsuto, marrom levemente escuro (6F5), com tomentos de 0,34 - 0,64 mm, arranjados em tufo regulares orientados para baixo e flexíveis. Parede externa lisa. Boca finamente fimbriada em padrão contínuo, 0,12 - 0,26 mm de altura, marrom escuro (6F5). Endoperídio liso, cinza levemente platinado (9D1). Brilho perceptível a platinado contrastando com o exterior. Estipe de 0,26 - 0,49 mm, marrom claro (5D4). Epifragma da mesma cor do exoperídio, flexível a rígido, talvez devido ao fato de estarem muito imaturos. Peridíolo cinza grafite (10F2), cerca de 16 por basidioma, 1,91 - 2,65 mm × 1,67 - 2,23 mm, de formato irregular, de textura lisa, túnica branca e córtex duplo, sendo exocórtex negro, endocórtex negro e mesocórtex branco. Hifas do mesocórtex compactas e não pulverulentas. Basidiosporos lisos, hialinos, numerosos, 15,81 - 18,41 µm × 8,40 - 11,51 µm (L = 17,27 µm; W = 10,00 µm; n = 30), elipsoide a cilíndrico (Q = 1,47 - 2,19), em média alongado (Q = 1,73), sem apículo e parede de 1,75 - 3,25 µm.

Figura 2 – *Cyathus triplex*. A. Exoperídio hirsuto. B. Cortex duplo. C. Peridíolos liso. D. Basidiosporos alongados.

Comentários: O exemplar identificado como *Cyathus triplex* apresentou algumas características que diferem parcialmente das descritas por Góis (2021) para materiais brasileiros. Segundo o autor, *C. triplex* é uma espécie comum no Brasil, frequentemente confundida com *C. striatus*, mas que se distingue por apresentar basidioma hirsuto de tamanho reduzido (até 7 mm de altura), exoperídio e endoperídio predominantemente lisos a inconspicuamente plicados, córtex duplo e tomentos do exoperídio com até 0,5 mm de altura (Brodie, 1975; Góis, 2021). No material analisado neste estudo, entretanto, foram observados basidiomas ultrapassando facilmente esse limite, alcançando até 9,84 mm de altura, além de tomentos de até 0,64 mm. Essas variações morfométricas, embora sutis, contrastam com os dados previamente descritos para a espécie, indicando que a morfologia de *C. triplex* no Brasil pode apresentar maior plasticidade do que a atualmente reconhecida.

Cyathus aff. limbatus Tul. & C. Tul. Annales des Sciences Naturelles Botanique (1884).

Substrato: Madeira em decomposição.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Natal. Parque Estadual Dunas do Natal. (UFRN – Fungos 3974).

Perídio infundibuliforme de 9,25 – 9,98 mm de altura, 5,38 - 7,29 mm de largura na porção superior, não expandido na boca, não afilando na base, nem formando pedicelo. Embasamento de 3,35 - 4,67 mm, conspicuo, de coloração marrom escuro (7F6). Exoperídio hirsuto, marrom escuro (6F8), com tomentos de 0,50 – 0,72 mm, arranjados em tufo regulares orientados para fora e flexíveis. Parede externa inconspicuamente plicada, Boca finamente fimbriada em padrão contínuo, 0,34 – 0,49 mm de altura, marrom escuro (6F8). Endoperídio conspicuamente plicado, cinza claro (7E2). Brilho perceptível contrastando com o exterior. Estipe de 1,16 – 1,74 mm, marrom claro (5D4). Epifragma da mesma cor do exoperídio, flexível. Peridíolo cinza escuro quase preto (8F2), cerca de 9 por basidioma, 1,88 - 2,04 mm × 1,55 - 2,19 mm, de formato circular, de textura lisa, túnica indistinta e córtex duplo, sendo exocórtex negro, endocórtex negro e mesocórtex branco. Hifas do mesocórtex compactas e não pulverulentas. Basidiosporos lisos, hialinos, numerosos, 14,67–18,14 µm × 6,00 – 8,95 µm (L = 16,33 µm; W = 7,41 µm; n = 30), alongado a cilíndrico (Q = 1,81–2,59), em média cilíndrico (Q = 2,22), apículo não presente e parede de 1,41–2,41 µm.

Figura 3 – *Cyathus aff. limbatus*. A. Exoperídio hirsuto. B. Córtex duplo. C. Peridíolos lisos. D. Basidiosporos cilíndricos.

Comentários: *Cyathus limbatus* apresenta ampla distribuição no Brasil e pode ser reconhecida por um conjunto de características diagnósticas bem definidas. O perídio possui coloração escura, com córtex duplo formado por exocórtex e endocórtex negros e mesocórtex de tonalidade marrom. Os peridíolos geralmente apresentam formato angular, enquanto os tomentos dispostos na margem da boca formam um padrão contínuo, ainda que ocorram interrupções ao longo das estrias do perídio (Tulasne & Tulasne, 1844; Brodie, 1975; Góis et al., 2020). Outras particularidades importantes para sua identificação incluem a presença de estrias visíveis em ambas as paredes do basidioma, peridíolos de superfície lisa e tomentos que podem atingir até 0,70 mm de comprimento, o que facilita a diferenciação dessa espécie entre os materiais brasileiros.

Conclusão

A predominância de *C. earlei*, presente em quatro amostras, evidencia sua provável adaptação às condições locais, embora sua semelhança morfológica com *C. limbatus* e *C. triplex* ressalte a necessidade de cautela na identificação taxonômica. Além disso, a confirmação da ocorrência de *C. limbatus* e *C. triplex* amplia os registros do gênero na região, demonstrando a diversidade ainda pouco explorada desses fungos em ambientes de Mata Atlântica.

Esses resultados reforçam a importância de estudos continuados para esclarecer os limites taxonômicos entre espécies próximas e para consolidar o conhecimento sobre a distribuição de *Cyathus* no Nordeste brasileiro. Apesar dos avanços, permanecem lacunas significativas na compreensão da diversidade e da ecologia do grupo, o que evidencia a necessidade de ampliar as coletas em diferentes áreas e de integrar análises morfológicas com abordagens moleculares. A realização de coletas em remanescentes de Mata Atlântica mostra-se fundamental, pois gera material de referência que pode subsidiar investigações futuras em taxonomia, ecologia e biotecnologia fúngica. Nesse sentido, o presente estudo contribui para o registro do gênero em fragmentos de Mata Atlântica potiguar e fornece subsídios para pesquisas voltadas à conservação e manutenção da biodiversidade fúngica regional.

Referências

- ANKe, T. Antibiotics and other biologically active secondary metabolites from Basidiomycetes. In: Advances in Biochemical Engineering. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 131-177, 1977.
- BASEIA, I. G.; SILVA, B. D. B.; GÓIS, J. S. Fungos agaricoides (Basidiomycota) da Mata Atlântica do Nordeste brasileiro. Rodriguésia, v. 65, n. 1, p. 205-217, 2014.
- BRODIE, H. J. The Bird's Nest Fungi. Toronto: University of Toronto Press, 1975.
- BRODIE, H. J. Contributions to the development of bird's nest fungi. Canadian Journal of Botany, v. 62, n. 3, p. 575-579, 1984.
- EL-FALLAL, A. A.; MOUSSA, T. A. A. Antimicrobial activities of some bird's nest fungi (Nidulariaceae, Basidiomycota). World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 24, p. 2297-2301, 2008.
- FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. São Paulo: Instituto de Botânica, 1984.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2020-2021. São Paulo, 2022.
- GÓIS, J. S. Fungos agaricoides do Rio Grande do Norte: diversidade e taxonomia. 2021. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

KANG, J. S.; KIM, C. J.; KIM, J. S. Bioactive secondary metabolites from bird's nest fungi (Nidulariaceae, Basidiomycota). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 123-128, 2007.

KORNERUP, A.; WANSCHER, J. H. *Methuen Handbook of Colour*. 3. ed. London: Eyre Methuen, 1978.

LLOYD, C. G. *The Nidulariaceae of North America*. Cincinnati Museum Center Publications, v. 1, p. 1-88, 1906.

MONEY, N. P. Circus Fungorum: The Aesthetics of Fungal Movement. *FUNGI*, v. 6, p. 36-39, 2014.

SÁNCHEZ, R. M. *Cyathus* (Agaricales, Nidulariaceae) en México: especies conocidas y nuevos registros. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 88, n. 3, p. 611-620, 2017.

SHINNERS-CARNELEY, A.; et al. Enzymatic activities of bird's nest fungi in lignocellulose degradation. *Mycological Research*, v. 106, n. 3, p. 345-352, 2002.

SILVA, B. D. B.; et al. Fungos agaricoides (Basidiomycota) em fragmentos de Mata Atlântica no estado da Paraíba, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 28, n. 2, p. 254-264, 2014.

TOLEDO, R. A.; et al. Fungos agaricoides em fragmentos de Mata Atlântica: novos registros para o Nordeste do Brasil. *Mycosphere*, v. 5, n. 4, p. 654-662, 2014.

TULASNE, L. R.; TULASNE, C. *Selecta Fungorum Carpologia*. Paris: Imperial Press, 1844.

YIN, Y. Potential applications of bird's nest fungi metabolites in medicine and agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 5, p. 1853-1862, 2020.

Anexos

Figura 2 – *Cyathus triplex*. A. Exoperídio hirsuto. B. Cortex duplo. C. Peridiólos liso. D. Basiódiosporos alongados.

Figura 3 – *Cyathus* aff. *limbatus*. A. Exoperídio hirsuto. B. Cortex duplo. C. Peridiólos liso. D. Basiódiosporos cilíndricos.

Figura 1 – *Cyathus earlei*. A. Exoperídio hirsuto. B. Cortex duplo. C. Peridiólos liso. D. Basiódiosporos alongados.

CÓDIGO: SB0935

AUTOR: SAMARA VANESSA DIAS ALEXANDRE

ORIENTADOR: VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do amido da semente de *Artocarpus heterophyllus* sobre comportamentos associados à depressão

Resumo

O Transtorno Depressivo Maior é uma doença crônica, que tem sido bastante prevalente. Assim, tem se buscado formas de mitigar os seus efeitos na população por meio de substâncias exógenas. Com isso, sabendo que o uso de antidepressivos causa diversos efeitos adversos, busca-se a utilização de produtos naturais com a proposta de promover efeito terapêutico e reduzir ou, quem sabe, evitar os efeitos adversos que alguns fármacos convencionais podem promover. O presente estudo buscou avaliar se o extrato da semente da jaca pode ser eficaz na alteração de respostas comportamentais relacionadas à depressão. Ratas Wistar foram submetidas a teste comportamentais após duas semanas de tratamento com o extrato da semente da jaca por meio da gavagem na dose de 125mg/Kg. Neste trabalho, foi avaliado o efeito do extrato sobre o comportamento das fêmeas no teste do nado forçado, bem como nos teste hematológicos e bioquímicos, que são fundamentais para essa avaliação da segurança dessa nova proposta terapêutica. Os dados mostraram que o efeito do amido da jaca no teste do nado forçado não obteve o resultado desejado, assim, não sendo relevante para ser utilizado como antidepressivo, mas apresentou dados bioquímicos relevantes na redução no valor dos triglicerídeos .

Palavras-chave: *Artocarpus heterophyllus*, Transtorno Depressivo Maior, Antidepressivos

TITLE: Evaluation of the Effects of *Artocarpus heterophyllus* Seed Starch on Depression-Related Behaviors.

Abstract

Major Depressive Disorder is a chronic disease that has been highly prevalent. Thus, efforts have been made to mitigate its effects on the population through the use of exogenous substances. Since antidepressants can cause various adverse effects, the search for natural products aims to provide therapeutic benefits while reducing or potentially avoiding the side effects associated with conventional drugs. The present study aimed to evaluate whether jackfruit seed extract could be effective in altering behavioral responses related to depression. Wistar female rats were subjected to behavioral tests after two weeks of treatment with jackfruit seed extract administered by gavage at a dose of 125 mg/kg. This study assessed the effect of the extract on female behavior in the forced swim test, as well as on hematological and biochemical parameters, which are essential for evaluating the safety of this new therapeutic approach. The data showed that the effect of jackfruit starch in the forced swim test did not yield the desired result, thus proving irrelevant for use as an antidepressant.

However, it did present relevant biochemical findings, particularly in reducing triglyceride levels.

Keywords: *Artocarpus heterophyllus*, Antidepressants, Rodents, Animal behavior.

Introdução

O Transtorno Depressivo Maior é um distúrbio psiquiátrico crônico e bastante recorrente, tendo como características sintomas de anedonia, humor constantemente deprimido, alterações cognitivas, além de distúrbios do sono, falta do apetite, e ideação suicida em casos mais graves. Uma causa de sobrecarga socioeconômica em saúde pública ao redor de todo o mundo por dados da OMS (2023) revela o número de mais de 280 milhões de pessoas afetadas, sendo importante destacar a prevalência desse transtorno de forma mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. Esse é o principal motivo do trabalho ser realizado em ratas, pois existe a necessidade de trabalhos com dados eficazes e seguros que reforcem novas estratégias terapêuticas nesse grupo da sociedade. A *Artocarpus heterophyllus* é o nome científico para a jaqueira, a planta que produz a jaca. Desse fruto, sua semente pode apresentar um papel de sustentabilidade bastante significativo para indústrias de alimentos, bem como farmacêuticas. No caso da semente da jaca, seu subproduto lastimosamente é frequentemente descartado, mesmo sendo um fruto tropical de continuamente cultivado no território brasileiro (Madruga et al., 2013). A jaca é uma das diversas plantas utilizadas que tem potencial para promover atividades neuromoduladoras, antioxidantes, anti-inflamatórias, hipoglicemiantes (Ajiboye et al., 2020) e sedativas em animais (Ratnasooriya & Jayakody, 2002); contudo não foi, ainda, observado seu efeito sobre respostas comportamentais associados a depressão. Na atualidade os fármacos antidepressivos disponíveis comumente tem ação em sistemas atuam, em sua maioria, sobre sistemas monoaminérgicos, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina, os tricíclicos, os inibidores da monoaminoxidase e as formulações atípicas. Contudo, existem limitações e desafios a serem considerados, pois a eficácia em parte dos pacientes que são tratados com esses fármacos persiste em causar efeitos adversos significativos, como insônia, ganho de peso, distúrbios gastrointestinais e outros que são fatores do tratamento ter uma adesão baixa (Fanelli et al., 2022). Urge a necessidade de trabalhos buscando a identificação de novas moléculas bioativas, preferencialmente de origem natural, com potencial efeito antidepressivo e melhor perfil de segurança, como é o caso da perspectiva que tem sido exposta pertinente a utilização do amido que foi extraído da semente do fruto em questão com baixo custo, menor incidência de efeitos adversos e aplicações tecnológicas e farmacêuticas na área (Kittipongpatana & Kittipongpatana, 2015).

Metodologia

Para realização dessa pesquisa, foram utilizadas 10 ratas Wistar com 90 ± 10 dias de idade, fornecidas pelo Departamento de Biofísica e Farmacologia da UFRN. Esses animais ficaram residindo o biotério do departamento (DBF) dentro de caixas de polipropileno ($41 \times 34 \times 18$ cm), distribuídos em grupos de 2-3 ratas, sendo 5 controles (grupo A) e 5 tratadas (grupo B), em condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), umidade (70–80%) e ciclo claro-escuro de 12h, com livre acesso à ração e água. Destacando que todos os procedimentos só foram realizados mediante a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRN). O amido das sementes de jaca foi extraído de acordo com Lawal et al. (2005), com adaptações e seguiu para solubilização em solução salina, utilizada como veículo nos grupos controle. As ratas tiveram o uso desse extrato por via oral uma vez ao dia, durante 14 dias consecutivos,

na dose de 125 mg/Kg (volume de 1 mL/Kg) (dose menor do que aquela que promoveu a sedação no estudo de Ratnasooriya e Jayakody (2002)). No que se refere ao teste comportamental, após 24 horas foi iniciado o teste do nado forçado, realizado em balde plástico contendo 20 L de água (20 ± 1 °C; profundidade de 30 cm). Anteriormente, ao teste propriamente dito houve a sessão do pré-teste na qual cada animal permaneceu por 15 minutos na água, sendo realizado, no dia seguinte, o teste, em que cada rata permaneceu durante 5 minutos. Para análise dos dados, consideramos o tempo de imobilidade (considerado como flutuar ou realizar apenas movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água) e os movimentos de climbing (descrever conforme foi feito para imobilidade) (Porsolt et al. 1977). Importante considerar que essa análise foi realizada manualmente pelo pesquisador. Vale acrescentar que os dados hematológicos e bioquímicos das ratas também foram levadas em consideração, e o fluido sanguíneo foi colhido de forma bastante responsável pelo método de gotejamento após decapitação em guilhotina, sendo esse considerado o método mais eficiente, rápido, objetivo e menos doloroso para o animal, cumprindo sua função para análise sem interferência de outras substâncias químicas (Holson, 1992).

Resultados e Discussões

Resultados Dados comportamentais - Nado forçado Apesar de não ser observada diferença estatisticamente significativa, a partir dos dados coletados foi possível observar que o tempo de imobilidade foi maior no grupo tratado (B), quando comparado ao grupo controle. O tempo de climbing foi menor no grupo tratado. **Teste Bioquímicos** Tivemos a glicemia com efeito hipoglicemiante não evidente como esperado, o colesterol não apresentou divergência relevante entre os grupos, triglicerídeos apresentou o grupo tratado com valores mais abaixo, podendo ser interpretado como um efeito positivo referente ao amido da jaca, as enzimas hepáticas não tiveram significativo aumento, o que apresenta uma ausência do efeito hepatotóxico, e os demais valores se mantiveram estáveis sem alterações relevantes para discorrer. **Teste Hematológicos** Na observação dos dados não tiveram alterações relevantes que destacasse um efeito tóxico do amido, como realmente se esperava que não tivesse. Sobre os valores, eles se encontravam todos dentro do referencial esperado (Madruga et al., 2013), sem alterações significantes e as que tinham alguma divergência possivelmente pode estar ligado a coágulos que foram formados, não sendo relevantes no que se refere ao benefício da jaca. **Discussão** No teste comportamental do nado forçado, o extrato da semente da jaca não apresentou efeitos antidepressivos consistentes; na análise foi visto uma hipótese contrária a inicial, em que o tempo de imobilidade teve aumento e o climbing reduziu quando comparados ao grupo controle. Em relação ao metabolismo, esse se apresentou um teste seguro seja na análise renal ou mesmo hepática das ratas, com um resultado nos triglicerídeos com redução, sendo um bom resultado quando se analisa o parâmetro do perfil lipídico. Não houve alterações significativas na análise hematológica, no qual todos os meios de análises, seja o eritrograma, leucograma e o plaquetograma, se mantiveram consistentes a resultados padrões.

Conclusão

Nessa pesquisa, observou que com a dose de 125 mg/Kg, o amido da jaca não obteve um efeito antidepressivo expressivo e esperado, mas se mostrou bastante seguro ao analisar dos dados bioquímicos e hematológicos. Dados extraídos que se enquadra de forma relevante no

cenário foi o fato dos triglicerídeos apresentaram redução no grupo tratado, podendo ser estudado com mais afinco podendo ser bastante contundente no quesito de ser um subproduto natural eficaz sem distúrbios metabólicos, contudo, não para o caso testado no transtorno depressivo para mulheres em fase reprodutivas, que foi a hipótese testada nas ratas.

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. Al-Harbi KS. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*, 2012, 369–388. APA - American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5-TR. 5.ed., texto revisado. Porto Alegre: Artmed, 2023. Fanelli G, Domschke K, Minelli A, Gennarelli M, Martini P, Bortolomasi M, et al. A meta-analysis of polygenic risk scores for mood disorders, neuroticism, and schizophrenia in antidepressant response. *Eur Neuropsychopharmacol* 55:86–95, 2022. Frisbee, J. C. et al. An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, n. 106, 2015. 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.; Adebawale, 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. Organização Mundial da Saúde, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>, 2023. Pellow, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 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 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. Sackeim HA. The definition and meaning of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*, 62:10–17, 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: JoVE*, 2015, n. 96, p. 52434. Holson RR. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. *Neurotoxicol Teratol*. 1992 Jul-Aug;14(4):253-257. doi:10.1016/0892-0362(92)90004-T. PMID:1522830. Madruga MS, de Albuquerque FS, Silva IR, do Amaral DS, Magnani M, Queiroga Neto V. Propriedades químicas, morfológicas e funcionais do amido de sementes de jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.). 2014 15 de janeiro;143:440-5. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.003. Epub 2013 9 de agosto. PMID: 24054264.

CÓDIGO: SB0942

AUTOR: MARIA BEATRIZ SILVA MALAFAIA

ORIENTADOR: SIMONE ALMEIDA GAVILAN

TÍTULO: Análise ultraestrutural de aparatos auditivos de golfinhos

Resumo

Golfinhos são mamíferos marinhos que dependem do som para forragear, estabelecer comunicação e detectar ameaças. Por esse motivo, a poluição sonora no ambiente aquático, gerada pelo aumento das atividades antrópicas no oceano, tem grande potencial de impactar seu modo de vida, implicando diversas respostas comportamentais, fisiológicas e até danos teciduais, podendo, em casos extremos, levar ao óbito do animal. Assim, a análise ultraestrutural do aparato auditivo de odontocetos apresenta-se como uma estratégia inovadora para avaliar possíveis impactos da superexposição de cetáceos a ruídos subaquáticos antropogênicos, de modo a aliar a conservação do grupo com o desenvolvimento sustentável. Para tanto, é necessário que os exemplares sejam necropsiados, seja realizado o protocolo de retirada do aparato auditivo e que este seja processado para posteriormente dissecar o osso periótico, expondo assim as células do epitélio coclear. Após a dissecação as amostras são preparadas para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de forma a analisar a existência de danos na cóclea dos indivíduos. Foi realizado o acompanhamento do processamento de 12 exemplares de odontocetos, incluindo necropsia, retirada do complexo tímpano-periótico, descalcificação e dissecação da cóclea. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas em 2 animais.

Palavras-chave: Bula timpânica. Cóclea. Dissecação. Odontocetos.

TITLE: Ultrastructural analysis of auditory apparatuses of dolphins

Abstract

Dolphins are marine mammals that rely on sound for foraging, establishing communication, and detecting threats. For this reason, noise pollution in the aquatic environment, generated by the increase of anthropogenic activities in the ocean, has a great potential to impact their way of life, leading to various behavioral, physiological, and even tissue damage responses, which in extreme cases can result in the death of the animal. Thus, the ultrastructural analysis of the auditory apparatus of odontocetes presents itself as an innovative strategy to evaluate possible impacts of the overexposure of cetaceans to anthropogenic underwater noise, aiming to combine the conservation of the group with sustainable development. To this end, it is necessary that the specimens be necropsied, the protocol of removal of the auditory apparatus is carried out and that it is processed to later dissect the periotic bone, thus exposing the cells of the cochlear epithelium. After dissection, the samples are prepared for Scanning Electron Microscopy, in order to analyze the existence of damage to the cochlea of individuals. The processing of 12 odontocetes specimens was monitored, including necropsy, removal of the tympanum-periotic complex, decalcification, and dissection of the cochlea. Scanning Electron Microscopy analyses were performed in 2 animals.

Keywords: Tympanic bulla. Cochlea. Dissection. Odontocetes.

Introdução

Golfinhos são mamíferos marinhos que dependem do som para forragear, comunicar e detectar ameaças. Por isso, a crescente poluição sonora nos oceanos causada por atividades antrópicas como o transporte marítimo, construção de infraestrutura *offshore* e pesquisas sísmicas, tem grande potencial de impactar seu modo de vida, implicando diversas respostas comportamentais, fisiológicas e danos teciduais, podendo, em casos extremos, levar à morte do animal.

Os disparos de canhões sísmicos, utilizados para prospecção geológica, emitem sons de altíssima intensidade (235–263 dB), comparáveis aos gerados por terremotos ou erupções vulcânicas submarinas. Esses pulsos acústicos ascendem rapidamente à superfície, provocando descompressão abrupta nos tecidos vivos, formação de bolhas de ar e, em casos extremos, perda da sensibilidade auditiva em mamíferos marinhos (Bailey et al., 2010, apud Corrêa, 2020).

Assim, estudar os possíveis impactos da superexposição de odontocetos a ruídos subaquáticos antropogênicos tem sido uma estratégia importante para a conservação desse grupo.

Para isso, utiliza-se a tecnologia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que permite avaliar o epitélio sensorial em toda a extensão do espiral coclear, em busca de identificar possíveis lesões nas células do órgão de Corti.

Metodologia

As análises foram realizadas com amostras de bulas timpânicas de odontocetos encalhados, mortos ou que vieram à óbito durante a reabilitação, registrados pelo Projeto Cetáceos da Costa Branca (Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia Potiguar - PMP-BP) e Centro de Estudos e Monitoramento Ambiental (CEMAM). Ambas as instituições possuem parceria com o Laboratório de Morfosiologia de Vertebrados da UFRN para o desenvolvimento deste projeto. O PMP-BP configura-se como um projeto de condicionantes ambientais exigidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) às empresas que exploram petróleo e gás no litoral brasileiro.

A necropsia para retirada do aparato auditivo foi amparada pelo protocolo descrito por Ketten (2007) e a perfusão da cóclea pelo protocolo proposto por Morell (2017).

Ainda, antes da descalcificação, com o auxílio de uma pinça-dente-de-rato foi feita a retirada de excesso de tecido muscular ao redor do osso periótico de forma a deixar o osso mais exposto possível e otimizar a ação do descalcificador.

Na sequência, as amostras foram submetidas a uma solução descalcificante preparada a partir de 14% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) hidrato de sal tetrassódico e solução tampão fosfato-salino (PBS) com pH ajustado para 7,4 através de ácido acético e mantida em temperatura ambiente (Morell, 2017). Cada amostra foi completamente submersa em uma quantidade padronizada da solução, de modo que o nível do líquido permanecesse aproximadamente um dedo acima do tecido, garantindo cobertura uniforme durante todo o processo de descalcificação.

As amostras tiveram a solução trocada semanalmente e foram avaliadas continuamente, de modo visual, pela equipe, considerando-se a translucidez do tecido (é possível observar o contorno da cóclea quando colocado contra a luz) para determinar a descalcificação completa do aparato auditivo, tornando-o apto à dissecação, a qual foi feita com o auxílio de lupa e pinças e tesouras para cirurgia oftálmica.

Ao fim, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e 100%), seguido por secagem em aparelho de ponto crítico (Quorum K 850) e metalização com ouro-paládio para realização da microscopia usando o equipamento TESCAN® MIRA 4.

Ainda, é válido informar que as etapas de necropsia e retirada dos aparatos foram realizadas no Laboratório de Monitoramento de Biota Marinha da UERN ou na Sala de preparação de peças do Museu de Ciências Morfológicas da UFRN; a descalcificação e dissecação das amostras aconteceram no Laboratório de Morfofisiologia de Vertebrados (LabMorVe) da UFRN; e a avaliação microscópica por varredura foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em Recife/PE.

Destaca-se que para a realização da Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura, é necessário que as amostras estejam em COD 2, ou seja, que o animal esteja na condição de recém óbito e a necropsia seja realizada, no máximo, até 6 horas após o óbito. Isso propicia que as células do Órgão de Corti possam ser avaliadas. Neste trabalho foram realizadas a sessão de MEV de duas amostras, estando as demais em processo de espera para serem avaliadas.

Resultados e Discussões

Desde o início de vigência deste projeto de pesquisa, foram processadas 12 amostras de bulas timpânicas das quais duas foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 2 exemplares, o primeiro da espécie *Stenella attenuata* e o segundo, espécime de *Stenella longirostris*.

A dissecação do aparato auditivo é uma etapa crucial e delicada da análise ultraestrutural. Com a amostra imersa em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x, fixa-se com uma agulha o osso periótico descalcificado à uma base de isopor, posicionando, da melhor maneira, a região da cóclea sob a lupa. Em seguida, diseca-se através da utilização de instrumentos cirúrgicos (tipo tesoura para cirurgia oftálmica) o tecido ósseo anterior, revelando assim a cóclea. Então, é realizada a dissecação da mesma, a partir da região da base, região medial até o ápice da cóclea, de forma a expor o órgão de Corti no interior da estrutura (Figura 1).

Na análise de MEV foram avaliadas as três regiões da cóclea (Figura 2): apical (1), medial (2) e basal (3). A primeira associada à percepção de frequências sonoras mais baixas, a segunda uma região de transição baixas e médias frequências e a terceira responsável pela captação de frequências mais altas.

Assim, para verificar possível impacto causado por atividades de pesquisas sísmicas no aparato auditivo, são avaliadas a presença ou ausência das células ciliadas internas e externas, bem como dos seus estereocílios e possível fusão e/ou desorganização dos mesmos (Figura 3). Além disso, também é verificada a presença de cicatrizes e/ou a variação das camadas de células ciliadas externas.

Conclusão

O desenvolvimento deste plano de trabalho permitiu o aprofundamento nas técnicas de necropsia de golfinhos, retirada de bulas timpânicas e processamento das amostras quanto à descalcificação, dissecação e análise de Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram avaliados 12 exemplares de odontocetos quanto aos impactos de ruídos subaquáticos no aparato auditivo desses animais.

Destaca-se a importância dos dados obtidos quando se leva em consideração que são espécies em estado de conservação preocupante de acordo com a International Union for Conservation of Nature (IUCN) e às quais pouco se tem acesso para estudos. Nesse contexto, o tipo de avaliação de impacto feita tem um caráter pioneiro no Brasil e busca contribuir como uma alternativa para o licenciamento ambiental e promoção de um desenvolvimento econômico mais sustentável ao mesmo tempo que assegura a preservação da biodiversidade e o equilíbrio dos ecossistemas.

Referências

- Corrêa, Gabriela Colombini. Morfologia do complexo tímpano-periótico de cetáceos. Orientador: Simone Almeida Gavilan. 2020. Dissertação(Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.
- Ketten, D. R.; Cramer, S. R.; Arruda, J. J. A Manual for the Removal, Fixation and Preservation of Cetacean Ears. Woods Hole Oceanographic Institution: Woods Hole. 2007.
- Morell, M., et al. Shadwick, R.E.; André, M. Implementation of a method to visualize noiseinduced hearing loss in mass stranded cetaceans. Scientific Reports 7, 41848, 2017.

Anexos

Figura 1: Cóclea dissecada. Arquivo pessoal.

Figura 2: Representação esquemática da cóclea, destacando suas diferentes regiões. A região apical abrange a área de 0 a 1, a região medial de 1 a 2 e a região basal de 2 a 3. Fonte: Relatório produzido por Simone Almeida Gavilan e Gabriela C. Corrêa.

Figura 3: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da região basal, evidenciando a presença de vários tipos celulares. Fonte: Relatório produzido por Simone Almeida Gavilan e Gabriela Colombini Corrêa.

CÓDIGO: SB0945

AUTOR: MARIA EDUARDA ARAÚJO RÊGO

COAUTOR: LUCIANA HELENA SILVA ROCHA

COAUTOR: TALITA CIBELE DE FARIAS OLIVEIRA

ORIENTADOR: RENATA SANTORO DE SOUSA LIMA

TÍTULO: DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DA AVIFAUNA EM ÁREA DE RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA DA CAATINGA (ASSÚ-RN)

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar a variação na riqueza de espécies de aves entre as estações seca e chuvosa na Floresta Nacional de Açu (RN), utilizando o Monitoramento Acústico Passivo (PAM) como método de amostragem. As coletas foram realizadas em 2023, em uma área em processo de restauração ecológica, dividida em parcelas, com gravações realizadas durante o período da manhã nas estações chuvosa (junho) e seca (dezembro). As vocalizações foram analisadas por meio de espectrogramas no software Raven Pro, a partir da detecção manual e posterior identificação das espécies. A riqueza e frequência dos registros foram posteriormente analisadas estatisticamente no software R. Nas 10 gravações analisadas da estação chuvosa, foram registrados 87 vocalizações de 32 espécies, enquanto na estação seca houve 136 registros de 40 espécies. Embora tenha sido observada uma tendência de maior riqueza na estação seca, a diferença não foi estatisticamente significativa. A análise das guildas alimentares mostrou variações nas espécies predominantes entre as estações, com maior presença de onívoros e insetívoros na estação seca. Esses resultados preliminares indicam a necessidade de ampliação temporal e espacial das amostragens, para uma análise mais robusta, e destacam a importância de considerar fatores ecológicos e metodológicos ao buscar entender melhor as dinâmicas ecológicas da avifauna na Caatinga.

Palavras-chave: caatinga. aves. sazonalidade. monitoramento acústico.

TITLE: DIVERSITY AND SEASONAL DISTRIBUTION OF BIRDS IN AN ECOLOGICAL RESTORATION AREA OF THE CAATINGA (ASSÚ-RN)

Abstract

This study aimed to investigate the variation in bird species richness between the dry and rainy seasons in the Floresta Nacional de Açu (RN), using Passive Acoustic Monitoring (PAM) as a sampling method. Data collection was carried out in 2023 in an area undergoing ecological restoration, divided into plots, with recordings conducted in the morning during the rainy season (June) and the dry season (December). Vocalizations were analyzed through spectrograms in Raven Pro software, based on manual detection and subsequent species identification. Species richness and record frequency were then statistically analyzed in R software. In the 10 recordings analyzed from the rainy season, 87 vocalizations of 32 species were recorded, whereas in the dry season there were 136 records of 40 species. Although a trend toward higher richness in the dry season was observed, the difference was not

statistically significant. The analysis of feeding guilds revealed variations in the predominant species between seasons, with a greater presence of omnivores and insectivores in the dry season. These preliminary results indicate the need for temporal and spatial expansion of sampling for a more robust analysis, and highlight the importance of considering ecological and methodological factors when seeking to better understand the ecological dynamics of bird communities in the Caatinga.

Keywords: caatinga. birds. seasonality. acoustic monitoring.

Introdução

Apesar do bioma Caatinga ser uma área importante para espécies endêmicas de aves sul-americanas (Cracraft, 1985; Ferri, 1980; Gil, 2002; Prado & Gibbs, 1993), ainda há escassez de conhecimento sobre sua biodiversidade, principalmente estudos voltados para a conservação de seus ambientes e sua biota. Esse bioma vem passando por diversas ameaças que afligem sua avifauna, dentre elas a degradação ambiental e a caça. A Caatinga é um ambiente semiárido que abrange aproximadamente 734.478 km² (ICMBio, s.d.) e se caracteriza por uma sazonalidade marcante, com duas estações bem definidas: uma longa estação seca e uma curta estação chuvosa (Buainain, Gaspar & Assis, 2015). Durante a estação chuvosa, de dezembro a junho, há um aumento na disponibilidade de recursos como água e alimento, incluindo insetos (Olmos et al., 2005), que constituem a principal fonte alimentar de grande parte dos passeriformes locais (Sick, 1997). Esse período, portanto, favorece comportamentos reprodutivos, de repouso e atrai uma maior diversidade de espécies. Em contraste, a estação seca reduz drasticamente os recursos, o que pode levar à migração ou à adaptação das aves (Silva, 2020). Espécies insetívoras e granívoras tendem a ser mais resistentes à estação seca, por apresentarem maior flexibilidade alimentar em resposta à disponibilidade de itens sazonais (Burbidge & Fuller, 2007; Tischler et al., 2013; Sánchez & Blendinger, 2014), sendo, portanto, mais frequentes nesta estação (Toledo-Lima & Pichorim, 2020). Por outro lado, há menor fidelidade local por parte de polinizadores, uma vez que a produção de néctar na estação seca ocorre em pulsos curtos e esporádicos, determinados por eventos de chuva (Vidiella et al., 1999; Schwinning & Sala, 2004). Isso sugere maior presença de polinizadores e frugívoros durante a estação chuvosa, quando há maior disponibilidade de néctar e frutos (Ogaya & Peñuelas, 2007; Butt et al., 2015). Diante da escassez de dados sobre a avifauna da Caatinga e da necessidade de compreender a variação na diversidade de aves em resposta à variação sazonal na FLONA de Assú (RN), torna-se essencial investigar como a comunidade de aves responde às mudanças ambientais entre os períodos seco e chuvoso. Esse tipo de estudo é especialmente relevante para orientar projetos de conservação e restauração ecológica, considerando que parte da área da FLONA se encontra em processo de restauração. Assim, compreender a dinâmica da avifauna nesse contexto pode contribuir significativamente para o monitoramento ambiental da área. O objetivo deste trabalho é investigar a variação na riqueza de espécies de aves entre as estações seca e chuvosa em uma área da FLONA de Assú (RN), utilizando o Monitoramento Acústico Passivo como método de amostragem. Espera-se que a estação chuvosa apresente maior riqueza de espécies, em razão da maior oferta de recursos alimentares, da intensificação da atividade vocal e do período reprodutivo das aves, fatores que favorecem tanto a presença quanto a detecção das espécies por meio da bioacústica.

Metodologia

Em 2023, foram realizadas duas coletas de dados por meio da instalação de gravadores autônomos na Floresta Nacional de Açu (RN), em uma área dividida em 155 parcelas de 8 x 13m, com a presença de uma lagoa nas proximidades. Essa área faz parte do projeto de Restauração Ecológica da Caatinga chamado de Brazildry e coordenado pela professora Gislene Ganade, da UFRN, no qual foram realizados plantios de espécies nativas da Caatinga, organizadas em diferentes graus de diversidade (tratamentos), enquanto as parcelas controle tiveram sua vegetação mantida em estado natural. Os equipamentos foram instalados de modo que gravassem uma hora de áudio por parcela durante o período da manhã, quando ocorre maior atividade vocal das aves. Para isso, foram utilizados tripés posicionados no centro de cada parcela, a fim de garantir a padronização das gravações. Como houve gravação feita sem a presença humana, foi um estudo feito por Monitoramento Acústico Passivo (PAM). As coletas foram realizadas nas duas estações: na coleta da estação chuvosa utilizaram-se 12 gravadores (4 Song Meters SM2 e 8 Audiomoths), e as gravações foram feitas em três horários: 05h às 06h, 06h30 às 07h30 e 08h às 09h, com gravações feitas nas 155 parcelas em junho. E na coleta feita na estação seca, foram utilizados 14 gravadores (4 Song Meters Micro, 7 Audiomoths e 3 Song Meters SM2), mantendo-se os mesmos horários de gravação feita na estação chuvosa, com gravações realizadas em 70 parcelas em dezembro. A análise dos dados foi realizada manualmente, a partir da inspeção dos sons através de espectrogramas (representações visuais dos sons) por meio do software Raven Pro 1.6. Foram testados diversos métodos e o mais eficaz se mostrou a análise de 20 subamostras de 1 minuto dentro de cada gravação de 1 hora, o que possibilitou a redução do tempo de análise e detectou as espécies vocalmente mais frequentes. Nessa etapa, foi feita uma triagem baseada no valor de SNR (razão sinal-ruído), a fim de determinar se as vocalizações das aves estavam dentro ou fora da parcela, com o objetivo de saber quais espécies estavam presentes em cada parcela. Após a detecção das vocalizações, procedeu-se à identificação das espécies em 10 parcelas por cada estação, por meio da escuta de seus cantos e chamados. Ainda foi realizada a verificação das guildas alimentares das espécies, a fim de relacioná-las à sazonalidade dos recursos. As informações relativas à riqueza de espécies foram posteriormente organizadas em planilhas no Microsoft Excel e analisadas no software R, para a geração dos gráficos e dos resultados finais.

Resultados e Discussões

Nas 10 amostras analisadas da estação chuvosa, foram feitos 87 registros de 32 espécies, enquanto na análise das 10 amostras da estação seca houve 136 registros de 40 espécies. As 10 espécies mais frequentes na estação chuvosa foram *Nystalus maculatus* (rapazinho-dos-velhos), *Cyanocorax cyanopogon* (gralha-cancã), *Cyclarhis gujanensis* (pitiguari), *Icterus jamacaii* (corrupião), *Pitangus sulphuratus* (bem-te-vi), *Lepidocolaptes angustirostris* (arapaçu-do-cerrado), *Aramus guarauna* (carão), *Rupornis magnirostris* (gavião-carijó), *Tapera naevia* (saci) e *Columbina minuta* (rolinha-de-asa-canela). As 10 menos registradas foram *Melanerpes candidus* (pica-pau-branco), *Mimus saturninus* (sabiá-do-campo), *Myiarchus swainsoni* (irré), *Myiarchus tyrannulus* (maria-cavaleira-do-rabo-enferrujado), *Pachyramphus polychopterus* (caneleiro-preto), *Picumnus limae* (picapauzinho-da-caatinga), *Poliophtila atricapilla* (balança-rabo-do-nordeste), *Pseudoseisura cristata* (casaca-de-couro), *Troglodytes musculus* (corruíra) e *Turdus rufiventris* (sabiá-laranjeira), como mostra a Figura 1. As 10 espécies mais registradas na estação seca foram *Aramus guarauna* (carão), *Cyclarhis gujanensis* (pitiguari), *Icterus jamacaii* (corrupião), *Pitangus sulphuratus* (bem-te-vi), *Camptostoma obsoletum* (risadinha), *Gallinula galeata* (galinha-d'água), *Troglodytes musculus* (corruíra), *Todirostrum cinereum* (ferreirinho-relógio), *Eupsittula cactorum*

(periquito-da-caatinga) e *Myiarchus tyrannulus* (maria-cavaleira-de-rabo-enferrujado). As 10 menos registradas foram *Rupornis magnirostris* (gavião-carijó), *Columbina minuta* (rolinha-de-asa-canela), *Guira guira* (anu-branco), *Molothrus bonariensis* (chupim), *Myiozetetes similis* (bentevizinho-de-penacho-vermelho), *Paroaria dominicana* (cardeal-do-nordeste), *Thraupis palmarum* (sanhaço-do-coqueiro), *Tyrannus melancholicus* (suiriri), *Vanellus chilensis* (quero-quero) e *Volatinia jacarina* (tiziú), conforme apresentado na Figura 2. Nas análises estatísticas, primeiramente foram testadas a normalidade e a homocedasticidade dos dados, com o objetivo de definir o teste mais adequado. Em seguida, foi aplicado o teste t de Student pareado, comparando a riqueza de espécies entre as estações chuvosa e seca. A média da riqueza foi de 8,7 espécies na estação chuvosa e 13,6 na estação seca. A diferença média entre as duas estações foi de 4,9, com menor riqueza na estação chuvosa. Apesar da tendência de maior riqueza durante a estação seca, a diferença não foi estatisticamente significativa ($t = -1,88$; $gl = 9$; $p = 0,092$; intervalo de confiança de 95%: -10,78 a 0,98), conforme ilustrado na Figura 3. É importante destacar que a maior quantidade de registros obtida na estação seca não está necessariamente relacionada apenas à presença física das aves na área. Considerando que foi utilizado o método de Monitoramento Acústico Passivo (PAM), as espécies mais registradas tendem a ser aquelas com maior atividade vocal. Dessa forma, aves com comportamento mais silencioso ou vocalizações menos frequentes tornam-se menos detectáveis. Além disso, fatores sazonais podem influenciar a detecção acústica não apenas por meio da disponibilidade de recursos alimentares, mas também por condições abióticas. Durante a estação chuvosa, por exemplo, o aumento do volume de precipitação pode gerar ruído ambiental (Lucena; Mariano; Araujo, 2025), se sobrepondo aos aspectos espectrais e temporais das vocalizações, causando mascaramento do sinal e dificultando a comunicação de forma eficaz entre os indivíduos (Brumm & Slabbekoorn, 2005). Como consequência, para evitar um maior gasto energético, as aves podem reduzir sua atividade vocal durante esse período. Outro fator relevante a ser considerado é a atividade vocal das aves. Na estação seca, foi observado um maior número de registros de predadores aquáticos, como *Aramus guarauna* e *Gallinula galeata*, por apresentarem vocalizações de alta intensidade, especialmente *A. guarauna*, cuja vocalização é forte e grave, essas espécies podem ter sido detectadas mesmo quando fisicamente ausentes das parcelas amostradas, devido ao alcance sonoro de sua vocalização. Considerando que ambas as espécies podem se agrupar em grupos maiores (WikiAves, 2025), a presença de mais indivíduos pode ter contribuído para uma maior taxa de vocalização. Destaca-se ainda a presença de uma lagoa nas proximidades da área de estudo, que, durante a estação seca, se torna um dos poucos pontos com disponibilidade de alimento e água. Esse local funciona como um ponto de dessedentação, servindo de refúgio para espécies da Caatinga, o que favorece a concentração de predadores na região. As espécies registradas foram agrupadas em sete guildas alimentares, cujas informações foram extraídas da base de dados AVONET—um conjunto de dados morfológicos, ecológicos e geográficos compilado para todas as espécies de aves (Tobias et al., 2022). É importante ressaltar que algumas espécies apresentaram características que as enquadram em mais de uma guilda, como *Eupsittula cactorum*, classificada como frugívora-granívora; no entanto, para os fins desta análise, essas espécies foram alocadas na guilda que melhor reflete sua dieta predominante. As guildas alimentares consideradas foram: Frugívoro, para espécies cuja dieta consiste em mais de 60% de frutos; Granívoro, para aquelas que se alimentam principalmente de sementes ou nozes; Nectarívoro, para as que consomem, predominantemente, néctar; Vertívoro, que inclui espécies que se alimentam de vertebrados terrestres; Predador aquático, formado por espécies que consomem vertebrados e invertebrados aquáticos; Onívoro, para aquelas que possuem uma dieta diversificada; e Insetívoro, composta por espécies cuja alimentação é voltada para invertebrados terrestres.

Ao analisar as guildas registradas em ambas estações, observou-se duas guildas mais representativas: a insetívora, que na estação seca apresentou 21 espécies e 17 na chuvosa, e a onívora, que registrou 10 espécies na estação seca e oito na chuvosa. Ao verificar as espécies exclusivas de cada estação, observou-se que sete espécies foram exclusivas da estação chuvosa e quinze da estação seca. Entre as espécies que ocorreram exclusivamente na estação seca, a maioria foi da guilda insetívora, como: *Hemitriccus margaritaceiventer*, *Cantorichilus longirostris*, *Tolmomyias flaviventris*, *Cariama cristata*, *Formicivora melanogaster*, *Guiraguira*, *Molothrus bonariensis* e *Myiozetetes similis*. A maior parte das espécies que ocorreram exclusivamente na estação chuvosa também são representantes da guilda insetívora, sendo estas: *Pachyrhamphus polychopterus*, *Tapera naevia*, *Turdus rufiventris* e *Myiarchus swainsoni*. É válido ressaltar que as espécies de guildas relacionadas à alimentação baseada em recursos vegetais foram detectadas quase que exclusivamente na estação seca (frugívoro: *Euphonia chlorotica*, nectarívoro: *Coereba flaveola* e granívoro: *Volatinia jacarina*). Enquanto na estação chuvosa, foi registrado apenas um granívoro: *Leptotila verreauxi*. As aves insetívoras são frequentemente classificadas como residentes durante todo o ano em ambientes similares à Caatinga, o que sugere uma maior resistência a secas prolongadas (Marone, 1992; Burbidge e Fuller, 2007; Tischler et al., 2013). Essas aves apresentam alta fidelidade local, o que poderia justificar a maior quantidade de registros dessa guilda na estação seca. A estação seca apresenta menor cobertura vegetal devido à perda das folhas pela maior parte das espécies vegetais, o que gera menos barreiras naturais para a propagação do som (Lucena; Mariano; Araujo, 2025) e facilita a detecção das aves por meio de gravações. Essa condição pode também ajudar a explicar a ausência de detecção de espécies na estação chuvosa. Embora na Caatinga ocorram eventos de frutificação tanto na estação seca quanto na chuvosa, esses eventos são mais intensos durante a última (Barbosa; Barbosa; Lima, 2003), o que aumenta a disponibilidade de frutos e, conseqüentemente, a presença de frugívoros nesse período. A ausência de registros dessas guildas na estação chuvosa pode ser atribuída ao ruído da chuva, que pode mascarar os cantos dessas aves, ou ao esforço amostral limitado. Vale ressaltar que as gravações foram realizadas em apenas um mês de cada estação (dezembro e junho). Portanto, a ausência de registros dessas guildas, mais comuns na estação chuvosa, não significa necessariamente que essas espécies não estejam presentes, mas sim que pode haver um viés metodológico relacionado ao esforço amostral reduzido.

Conclusão

O presente estudo contribuiu para uma compreensão inicial da resposta da avifauna ao processo de restauração ecológica na área de estudo, evidenciando variações na composição e frequência das espécies seca e chuvosa. Observou-se que, além da presença ou ausência das espécies, fatores como intensidade vocal e propagação sonora, como no caso de *Aramus guarauna*, influenciam diretamente os registros obtidos por meio do Monitoramento Acústico Passivo (PAM), destacando a importância de considerar as limitações metodológicas ao interpretar os dados, especialmente em relação à detecção ou não detecção de determinadas espécies. A análise das guildas alimentares também demonstrou uma diferença considerável na distribuição das espécies entre as estações, com destaque para as guildas onívora e insetívora na estação seca e a escassez de frugívoros e nectarívoros na estação chuvosa, fenômeno possivelmente relacionado ao ruído da chuva e ao esforço amostral. Esses fatores ressaltam a necessidade de um aprimoramento metodológico para futuras investigações. Para uma análise mais precisa da riqueza e diversidade das aves da Caatinga, recomenda-se o aumento da amostragem, tanto em termos do número de parcelas analisadas quanto da distribuição temporal das gravações, abrangendo diferentes períodos de cada estação. Além

disso, o monitoramento ao longo de vários anos se torna essencial para observar tendências de longo prazo e possíveis mudanças na comunidade de aves, associadas ao processo de sucessão ecológica na área em restauração da Caatinga.

Referências

Azevedo-Júnior, Severino Mendes de; Santos, Lilia D'ark Nunes dos; Pereira, Iolanda Maria da Silva; Pereira, Glauco Alves; Telino Júnior, Wallace Rodrigues; Lyra-Neves, Rachel Maria de. Estado da arte do conhecimento da avifauna da Caatinga. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 8, n. 2, p. 110-122, jun. 2023. DOI: 10.24221/jeap.8.2.2023.5234.110-122.

Barbosa, D. C. A.; Barbosa, M. C. A.; Lima, L. C. M. de. Fenologia de espécies lenhosas da Caatinga. In: Leal, I. R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (orgs.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. p. 371-398.

Brumm, H.; Slabbekoorn, H. Acoustic communication in noise. *Advances in the Study of Behavior*, v. 35, p. 151-209, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(05\)35004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(05)35004-2).

Buainain, N.; Gaspar, M. L.; de Assis, C. P. Descrição detalhada e variação sazonal na dieta da choca-de-bochecha-prateada *Sakesphorus cristatus* (Wied, 1831) (Aves: *Thamnophilidae*) em uma floresta semiárida brasileira. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 23, n. 4, p. 405-416, 2015. DOI: 10.1007/BF03544317.

Butt, N.; Seabrook, L.; Maron, M.; Law, B. S.; Dawson, T. P.; Syktus, J.; McAlpine, C. A. Cascading effects of climate extremes on vertebrate fauna through changes to low-latitude tree flowering and fruiting phenology. *Global Change Biology*, v. 21, p. 3267-3277, 2015. DOI: 10.1111/gcb.12869.

Burbidge, A. A.; FULLER, P. J. Gibson Desert birds: responses to drought and plenty. *Emu*, v. 107, p. 126-134, 2007. DOI: 10.1071/MU06044.

Cracraft, Joel. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. *Ornithological Monographs*, n. 36, p. 49-84, 1985.

Ferri, M. G. *A vegetação brasileira*. São Paulo: Editora Itatiaia/EDUSP, 1980.

Gil, P. R. *Wilderness – Earth's last wild places*. Cidade do México: CEMEX, 2002. 576 p.

Icmbio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação das aves da Caatinga. Brasília: ICMBio, s.d.

Lucena, Bruno Pinho de; Mariano, Erich de Freitas; Araújo, Helder Farias Pereira de. Acoustic niche partitioning in a bird assembly in Caatinga, northeastern Brazil. *Austral Ecology*, v. 50, n. 2, p. —, 20 fev. 2025. DOI: 10.1111/aec.70043.

Lucena, B. P., Mariano, E. F., & Araujo, H. F. P. (2025). Acoustic niche partitioning in a bird assembly in Caatinga, northeastern Brazil. *Austral Ecology*.

Maia, A. C. D. et al. Padrões locais de diversidade de *Cerambycidae* (Insecta, Coleoptera) em vegetação de Caatinga. In: Leal, I. R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (orgs.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. p. 239-250.

Olmos, Fábio; Silva, Weber Andrade de Girão; Albano, Ciro Ginez. Aves em oito áreas de Caatinga no sul do Ceará e oeste de Pernambuco, nordeste do Brasil: composição, riqueza e similaridade. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 45, p. 179-199, 2005.

Ogaya, R.; Peñuelas, J. Species-specific drought effects on flower and fruit production in a Mediterranean holm oak forest. *Forestry*, v. 80, p. 351-357, 2007. DOI: 10.1093/forestry/cpm009.

Pacheco, José Fernando. As aves da Caatinga: uma análise histórica do conhecimento. In: Silva, J. M. C.; Tabarelli, M.; Fonseca, M. T.; Lins, L. V. (orgs.).

Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: MMA; Universidade Federal de Pernambuco; Fundação de Desenvolvimento da UFPE; Conservation International do Brasil; Fundação Biodiversitas; Embrapa Semi-Árido, 2004. p. 189-250.

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.

Sánchez, R.; Blendinger, P. G. Trophic ecology of the ringed warbling-finches *Pooecetes gramineus* in Neotropical semi-arid scrublands. *Emu*, v. 114, p. 229-233, 2014. DOI: 10.1071/MU13082.

Schwinning, S.; Sala, O. E. Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia*, v. 141, p. 211-220, 2004. DOI: 10.1007/s00442-004-1520-8.

Sick, Helmut. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

Silva, Josiane Kelly da. Influência da sazonalidade em aves passeriformes em uma área de Caatinga no município de Santa Cruz do Capibaribe, Pernambuco. 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2020. Disponível em: <https://repositorio.uema.br/handle/123456789/3361>. Acesso em: 21 ago. 2025

Tischler, M.; Dickman, C. R.; Wardle, G. M. Avian functional group responses to rainfall across four vegetation types in the Simpson Desert, central Australia. *Austral Ecology*, v. 38, p. 809-819, 2013. DOI: 10.1111/aec.12065.

Tobias, J. A.; Sheard, C.; Pigot, A. L.; Devenish, A. J. M.; Yang, J.; Sayol, F. et al. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters*, v. 25, p. 581-597, 2022.

Toledo-Lima, Guilherme S.; Pichorim, Mauro. Local extinctions exceed colonization rates in a bird community during dry years in the Brazilian Caatinga. *Ornithology Research*, v. 28, p. 86-97, 2020. DOI: 10.1007/s43388-020-00016-z.

Vidella, P. E.; Armesto, J. J.; Gutiérrez, J. R. Vegetation changes and sequential flowering after rain in the southern Atacama Desert. *Journal of Arid Environments*, v. 43, p. 449-458, 1999. DOI: 10.1006/jare.1999.0565.

Wikiaves. *Aramus guarauna* (Carão). Disponível em: <https://www.wikiaves.com.br/wiki/carao>. Acesso em: 28 ago. 2025.

Wikiaves. *Gallinula galeata* (Galinha-d'água). Disponível em:
https://www.wikiaves.com.br/wiki/galinha-d_agua. Acesso em: 28 ago. 2025.

Anexos

Figura 1 - Frequência Relativa de Ocorrência das espécies da FLONA de Assú (RN), na estação chuvosa.

Figura 2 - Frequência Relativa de Ocorrência das espécies da FLONA de Assú (RN), na estação seca.

Figura 3 - Comparação de riqueza de espécies de aves registrada nas estações chuvosa e seca.

CÓDIGO: SB0949

AUTOR: WALDNEY SILVA MUNIZ

COAUTOR: MARCOS VINICIUS DE CARVALHO SOUSA ROSADO

COAUTOR: CAROLINE MEDEIROS LAFFITTE

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO GALVAO BARBOZA

TÍTULO: EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE FOTOBIMODULAÇÃO NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE PRÉ-OSTEOBLASTOS CULTIVADOS SOB CONDIÇÕES NUTRICIONAIS VARIADAS.

Resumo

A fotobiomodulação com laser de baixa intensidade (LBI) tem potencial para estimular a proliferação celular, mas ainda carece de padronização dos parâmetros de cultivo e irradiação. Este estudo avaliou os efeitos da condição nutricional e de diferentes protocolos de LBI na viabilidade e proliferação de pré-osteoblastos murinos MC3T3-E1. As células foram cultivadas em meio α -MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) ou sob carenciamento nutricional (0% SFB) e irradiadas com laser diodo InGaAlP (660 ou 790 nm) em doses de 1, 4 e 6 J/cm², aplicadas uma única vez. A viabilidade e a proliferação foram avaliadas pelo ensaio Alamar Blue em 24, 48 e 72 h, e o ciclo e a morte celular por citometria de fluxo (Anexina V/PI). Em condições nutricionais normais, não houve diferenças significativas entre os protocolos ($p > 0,05$). Sob estresse nutricional, entretanto, o laser infravermelho (790 nm) na dose de 6 J/cm² promoveu aumento significativo da viabilidade e proliferação após 72 h ($p < 0,05$), confirmado pelas análises complementares. Conclui-se que a LBI apresenta maior eficácia em condições de carenciamento nutricional, ressaltando a importância do estado metabólico celular em estudos in vitro envolvendo laserterapia e biologia óssea.

Palavras-chave: Cultivo celular; osteoblastos; fotobiomodulação; proliferação celular.

TITLE: EFFECT OF DIFFERENT PHOTOBIMODULATION PROTOCOLS ON THE VIABILITY AND PROLIFERATION OF PRE-OSTEOBLASTS CULTURED UNDER VARIABLE NUTRITIONAL CONDITIONS.

Abstract

Photobiomodulation (PBM) using low-level laser therapy (LLLT) has been widely investigated for its potential to stimulate cell proliferation, but standardization regarding culture conditions and irradiation parameters remains limited. This study evaluated the effects of nutritional status and PBM protocols on the viability and proliferation of murine pre-osteoblasts (MC3T3-E1). Cells were cultured in α -MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or under nutritional deprivation (0% FBS) and irradiated with an InGaAlP diode laser at 660 nm (red) or 790 nm (infrared), at doses of 1, 4, and 6 J/cm²,

applied once in continuous mode. Cell viability and proliferation were assessed using the Alamar Blue® assay at 24, 48, and 72 hours after irradiation. Cell cycle progression and cell death events were analyzed by flow cytometry using propidium iodide (PI) and Annexin V/PI staining. Under normal nutritional conditions, no significant differences were observed between irradiation protocols ($p > 0.05$). However, under nutritional stress, the infrared laser (790 nm) at 6 J/cm² significantly increased viability and proliferation after 72 hours ($p < 0.05$), findings further supported by cell cycle and apoptosis analyses. Overall, these results indicate that PBM is more effective under nutritional stress conditions, highlighting the importance of considering cellular metabolic status in in vitro laser therapy studies and potential applications in bone tissue engineering.

Keywords: Cell culture; osteoblasts; photobiomodulation; cell proliferation.

Introdução

O tecido ósseo é dinâmico e passa por constante remodelação, processo que garante sua capacidade de regeneração. Contudo, quando o potencial de auto reparação é insuficiente ou o dano é mais complexo, tornam-se necessárias intervenções cirúrgicas ou farmacológicas (Noba et al., 2018). Nesse contexto, a fotobiomodulação (FBM) com laser de baixa intensidade (LBI) tem se destacado como alternativa terapêutica promissora por induzir respostas biológicas que incluem a proliferação celular, a migração e a síntese de matriz extracelular (Fekrazad et al., 2019; Lu et al., 2024).

Embora os mecanismos moleculares da FBM ainda não estejam completamente elucidados, evidências apontam para o aumento da produção de ATP, a modulação de espécies reativas de oxigênio e a ativação de vias anti-inflamatórias e antiapoptóticas, favorecendo a regeneração tecidual (Da Silva et al., 2023; Khorsandi et al., 2020). Estudos in vitro têm demonstrado efeitos positivos do LBI sobre a viabilidade, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas (Deana et al., 2018; Garzón et al., 2022), mas não há consenso sobre os parâmetros ideais de irradiação. Doses elevadas podem ser ineficazes, enquanto baixas densidades de energia (1–10 J/cm²) geralmente promovem maior efeito bioestimulante (Incerti-Parenti et al., 2014).

Além disso, a FBM parece ser mais eficaz sob condições de estresse celular, como a privação nutricional, que aumenta a sensibilidade celular ao estímulo luminoso e pode simular ambientes de hipóxia ou lesão tecidual (Moura-Netto et al., 2016; Da Silva et al., 2018). Assim, este estudo avaliou, por meio de experimentos in vitro, a influência da FBM com diferentes parâmetros na viabilidade e proliferação de células MC3T3-E1 submetidas a distintas condições nutricionais de cultivo celular.

Metodologia

Cultivo celular

Foram utilizadas células pré-osteoblásticas MC3T3-E1, uma linhagem derivada da calvária de camundongos, amplamente empregada em estudos in vitro de biologia óssea (Addison et al., 2015). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco, EUA). As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, com troca de meio a cada três dias. Ao atingir aproximadamente 70% de confluência, as células foram submetidas a subcultivo. Considerando que a fotobiomodulação (FBM) apresenta maior eficácia sob condições de estresse celular, foram estabelecidos dois regimes de cultivo: (i) Condição nutricional normal — células mantidas continuamente em meio suplementado com 10% de SFB; e (ii)

Carenciamento nutricional — após 24 horas de adesão inicial em meio completo, o meio foi substituído por DMEM sem SFB (0%) para simular um estado de estresse nutricional (Moura-Netto et al., 2016).

Protocolos de irradiação

Após 24 horas de cultivo nas placas destinadas aos experimentos biológicos, as células foram irradiadas com laser diodo InGaAlP (Kondortech, Brasil) nos comprimentos de onda 660 nm (vermelho, V) ou 790 nm (infravermelho, IV), em dose única, com modulação contínua, utilizando doses de 1, 4 e 6 J/cm². Os grupos foram organizados de modo que poços vazios fossem intercalados entre os poços contendo células, visando evitar dispersão indesejada de luz durante a aplicação (Ginani et al., 2018). A sonda de irradiação foi posicionada perpendicularmente à superfície da placa, a 0,5 cm de distância das células. Células não irradiadas foram utilizadas como grupo controle.

Análise da viabilidade e proliferação celular

A viabilidade e a proliferação celular foram avaliadas pelo ensaio Alamar Blue (Invitrogen, EUA), um método colorimétrico baseado na redução da resazurina (corante azul, fracamente fluorescente) em resorufina (corante rosa, altamente fluorescente), refletindo a atividade metabólica mitocondrial. Para o ensaio, $3,5 \times 10^4$ células foram cultivadas por poço em cada grupo, com experimentos conduzidos em quintuplicata ($n = 5$).

As análises foram realizadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Em cada tempo, o meio de cultivo foi substituído por 10 µL de Alamar Blue® e 90 µL de α -MEM, seguido de incubação por 4 horas sob condições normais de cultivo. Após a incubação, o meio foi coletado e as leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 570 nm (forma oxidada) e 600 nm (forma reduzida). Os resultados foram calculados segundo a equação fornecida pelo fabricante e expressos em percentual de redução do reagente.

Análise do ciclo celular

Para avaliar os efeitos da fotobiomodulação (FBM) sobre o ciclo celular, as células foram cultivadas em triplicata ($n = 3$) em placas de seis poços, na densidade de 2×10^5 células/poço. Após 72 horas da irradiação, as células foram processadas e incubadas com 5 µL de iodeto de propídeo (25 mg/mL; Invitrogen, EUA) em 200 µL de PBS gelado. Em seguida, realizou-se a análise em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, EUA). Os dados obtidos permitiram determinar os percentuais de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular.

Análise dos eventos de morte celular

A viabilidade celular e os eventos de apoptose e necrose foram avaliados por dupla coloração utilizando o kit FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis para citometria de fluxo (Invitrogen, EUA). As células foram cultivadas em triplicata ($n = 3$) em placas de seis poços, na densidade de 2×10^5 células/poço. No último intervalo analisado (T72), as células foram processadas e incubadas com 3 µL de Annexin V-FITC e 1 µL de iodeto de propídeo (PI; 100 µg/mL), por 15 minutos à temperatura ambiente e sob proteção da luz. Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, registrando-se a fluorescência nos comprimentos de onda de 530 nm e 575 nm.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Como os dados não apresentaram distribuição normal, as diferenças entre os grupos em cada intervalo de análise (24, 48 e 72 h) foram avaliadas pelos testes não

paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

No ensaio de Alamar Blue, os grupos sem carenciamento nutricional (**Figura 1**) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos irradiados e o controle, independentemente da dose e do comprimento de onda, exceto o grupo V4 (660 nm; 4 J/cm²), que mostrou redução significativa da proliferação celular em 24 horas ($p < 0,05$).

Figura 1. Ensaio de Alamar Blue dos grupos sem carenciamento nutricional, nos intervalos de 24, 48 e 72 h (* $p < 0,05$ em relação ao controle — teste de Mann-Whitney).

Nos grupos com carenciamento nutricional (**Figura 2**), observou-se aumento significativo da proliferação celular no grupo irradiado com laser infravermelho (790 nm) na dose de 6 J/cm² (Ic6) após 72 horas ($p < 0,05$). Em contraste, os grupos irradiados com laser vermelho (Vc4 e Vc6) apresentaram redução significativa da proliferação nos intervalos de 48 h e 72 h, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 2. Ensaio de Alamar Blue dos grupos com carenciamento nutricional, nos intervalos de 24, 48 e 72 h (* $p < 0,05$ em relação ao controle — teste de Mann-Whitney).

Com base nos resultados do ensaio de Alamar Blue, apenas os grupos submetidos ao carenciamento nutricional foram avaliados por citometria de fluxo para análise dos eventos de morte celular com Anexina V/PI (**Figura 3**). Observou-se que o grupo controle não irradiado (Cc) apresentou 91,5% de células viáveis, enquanto todos os grupos irradiados exibiram percentuais de viabilidade mais elevados (entre 94,4% e 96,6%), indicando que a fotobiomodulação favoreceu a sobrevivência celular sob estresse nutricional.

Figura 3. Análise de morte celular por dupla marcação com Anexina V/PI após 72 h.

A análise do ciclo celular também foi realizada nesses grupos (**Figura 4**). Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos irradiados e o controle ($p > 0,05$), verificou-se uma tendência ao aumento da proliferação nos grupos submetidos à FBM, com percentuais maiores de células nas fases S e G2/M. Houve diferença significativa apenas entre os grupos Vc6 e Vc1 ($p < 0,05$).

Figura 4. Resultados da análise do ciclo celular nos diferentes grupos após 72 h ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney).

DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* é pioneiro ao avaliar os efeitos da fotobiomodulação (FBM) com laser de baixa intensidade (LBI) sobre células MC3T3-E1 submetidas a diferentes condições nutricionais e parâmetros de irradiação. A escolha por incluir grupos em carenciamento nutricional baseou-se em evidências de que a FBM apresenta melhores resultados quando aplicada em ambientes de estresse celular, simulando condições patológicas *in vivo* (Moura-Netto et al., 2016).

Os resultados mostraram que, em condições nutricionais normais, a FBM não promoveu alterações significativas na viabilidade ou proliferação celular, corroborando estudos prévios com a mesma linhagem (Renno et al., 2007; Asai et al., 2014; Garzón et al., 2022). Em contraste, sob carenciamento nutricional, o laser infravermelho (790 nm; 6 J/cm²) aumentou significativamente a proliferação celular após 72 horas. Por outro lado, o laser vermelho (Vc4 e Vc6) reduziu a proliferação nos intervalos de 48 h e 72 h, respectivamente, confirmando que a resposta celular depende tanto do comprimento de onda quanto da dose de energia. Esses achados estão alinhados à lei de Arndt-Schulz, que descreve a relação bifásica da FBM, segundo a qual baixas doses estimulam e altas doses podem inibir o crescimento celular (Crous & Abrahamse, 2021; De Freitas & Hamblin, 2016).

Os mecanismos moleculares sugerem que a FBM estimula cromóforos mitocondriais, como a citocromo c oxidase, promovendo aumento na produção de ATP e na geração controlada de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses eventos ativam vias de sinalização relacionadas à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Da Silva et al., 2023; Amaroli et al., 2019). Isso pode explicar os elevados percentuais de células viáveis observados em todos os grupos irradiados, bem como a tendência ao aumento da atividade proliferativa evidenciada no ensaio de ciclo celular.

Estudos prévios com outros tipos celulares corroboram a maior sensibilidade à FBM sob déficit nutricional, incluindo fibroblastos gengivais (Almeida-Lopes et al., 2001) e células-tronco de dentes decíduos (Da Silva et al., 2018), reforçando a importância de considerar o estado metabólico celular em protocolos *in vitro*.

Apesar dos resultados promissores, este estudo apresenta limitações: foram avaliados apenas três intervalos curtos (24, 48 e 72 h) e irradiação única. Futuros trabalhos devem investigar o impacto da FBM em períodos mais longos, múltiplas aplicações e na diferenciação celular, além de validar os achados em osteoblastos primários e modelos animais, visando futura aplicação clínica.

Conclusão

Os resultados demonstram que a fotobiomodulação (FBM) com laser de baixa intensidade (LBI) promove efeitos mais eficazes em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sob condições de deficiência nutricional. Entre os parâmetros avaliados, o laser infravermelho (790 nm) na dose de 6 J/cm² apresentou o melhor desempenho na estimulação da proliferação celular. Esses achados reforçam a importância de considerar a simulação de condições de estresse em estudos *in vitro* com laserterapia e apontam o potencial da FBM como ferramenta na engenharia tecidual óssea.

Referências

Addison WN, Nelea V, Chicatun F, Chien YC, Tran-Khanh N, Buschmann MD, Nazhat SN, Kaartinen MT, Vali H, Tecklenburg MM, Franceschi RT, McKee MD. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. *Bone*. 2015 Feb;71:244-56.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):179-84.

Amaroli A, Ferrando S, Benedicenti S. Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue. *Photochem Photobiol*. 2019 Jan;95(1):455-459.

Asai T, Suzuki H, Kitayama M, Matsumoto K, Kimoto A, Shigeoka M, Komori T. The long-term effects of red light-emitting diode irradiation on the proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Kobe J Med Sci*. 2014 Jun 18;60(1):E12-8.

Crous A, Abrahamse H. The Signalling Effects of Photobiomodulation on Osteoblast Proliferation, Maturation and Differentiation: A Review. *Stem Cell Rev Rep*. 2021 Oct;17(5):1570-1589.

Da Silva PCS, Marques NP, Farina MT, Oliveira TM, Duque C, Marques NCT, Sakai VT. Laser treatment contributes to maintain membrane integrity in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (shed) under nutritional deficit. *Lasers Med Sci*. 2019 Feb;34(1):15-21.

Da Silva TG, Ribeiro RS, Mencalha AL, de Souza Fonseca A. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. *Lasers Med Sci*. 2023 Jun 13;38(1):136.
De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016 May-Jun;22(3):7000417.

Deana AM, de Souza AM, Teixeira VP, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK, Fernandes KPS. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. *Lasers Med Sci*. 2018 Jul;33(5):1147-1158.

Fekrazad S, Sohrabi M, Fekrazad R. Angiogenetic and anti-inflammatory effects of photobiomodulation on bone regeneration in rat: A histopathological, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Photochem Photobiol B*. 2023 Jan;238:112599.

Garzón J, Baldion PA, Grajales M, Escobar LM. Response of osteoblastic cells to low-level laser treatment: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2022 Oct;37(8):3031-3049.

Ginani F, Soares DM, de Oliveira Rocha HA, de Souza LB, Barboza CAG. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Lasers Med Sci*. 2018 Jan;33(1):95-102.

Incerti-Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. *J Biomed Opt*. 2014;19(10):108002.

Khorsandi K, Hosseinzadeh R, Abrahamse H, Fekrazad R. Biological Responses of Stem Cells to Photobiomodulation Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2020;15(5):400-413.

Lu P, Peng J, Liu J, Chen L. The role of photobiomodulation in accelerating bone repair. *Prog Biophys Mol Biol*. 2024 May;188:55-67.

Moura-Netto C, Ferreira LS, Maranduba CM, Mello-Moura ACV, Marques MM. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz Oral Res*. 2016 May 31;30(1):S1806-83242016000100265.

Noba C, Mello-Moura ACV, Gimenez T, Tedesco TK, Moura-Netto C. Laser for bone healing after oral surgery: systematic review. *Lasers Med Sci*. 2018 Apr;33(3):667-674.

Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2007 Aug;25(4):275-80.

Anexos

Figura 1. Ensaio de Alamar Blue dos grupos sem carenciamento nutricional, nos intervalos de 24, 48 e 72 h.

Figura 2. Ensaio de Alamar Blue dos grupos com carenciamento nutricional, nos intervalos de 24, 48 e 72 h.

Figura 3. Análise de morte celular por dupla marcação com Anexina V/PI após 72 h.

Figura 4. Resultados da análise do ciclo celular nos diferentes grupos após 72 h.

CÓDIGO: SB0958

AUTOR: MARIA TEREZA GUERRA DE SOUZA

ORIENTADOR: RIVA DE PAULA OLIVEIRA

TÍTULO: Efeitos da inibição da acetilcolinesterase (AChE) pelo óleo essencial da *Lippia origanoides* no comportamento neuromuscular e na memória olfativa no nematodo *Caenorhabditis elegans*

Resumo

A Doença de Alzheimer (DA) é uma das principais causas de demência, associada à perda de memória e déficits cognitivos. A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) é uma estratégia terapêutica utilizada para amenizar seus sintomas. O óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO), rico em carvacrol e timol, apresenta propriedades antioxidantes e potencial atividade anticolinesterásica. Este trabalho avaliou os efeitos do OELO no comportamento neuromuscular e na memória olfativa do nematodo *Caenorhabditis elegans*. Animais foram cultivados em meio NGM com *Escherichia coli* OP50 e tratados a partir do estágio L4 com diferentes concentrações de OELO durante 24 horas. O comportamento neuromuscular foi analisado por batimento faríngeo e memória olfativa por ensaio de quimiotaxia. Observou-se diminuição do batimento faríngeo em todas as concentrações testadas, sugerindo possível efeito sobre a neurotransmissão colinérgica. Os testes de quimiotaxia não produziram resultados conclusivos devido à necessidade de ajustes no protocolo. Os achados reforçam o potencial do OELO como modulador de funções neuromusculares, indicando a importância de estudos futuros para avaliar seu impacto sobre funções cognitivas.

Palavras-chave: Óleo essencial; *Lippia origanoides*; *Caenorhabditis elegans*; AChE.

TITLE: Study of the antioxidant and neuroprotective properties of *Lippia origanoides* essential oil (OELO) in the model organism *Caenorhabditis elegans*.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a leading cause of dementia, associated with memory loss and cognitive deficits. Inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) is a therapeutic strategy used to alleviate its symptoms. *Lippia origanoides* essential oil (OELO), rich in carvacrol and thymol, has antioxidant properties and potential anticholinesterase activity. This study evaluated the effects of OELO on the neuromuscular behavior and olfactory memory of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Animals were cultured in NGM medium with *Escherichia coli* OP50 and treated from the L4 stage with different concentrations of OELO for 24 hours. Neuromuscular behavior was analyzed by pharyngeal flaring and olfactory memory by chemotaxis assay. A decrease in pharyngeal flaring was observed at all concentrations tested, suggesting a possible effect on cholinergic neurotransmission. Chemotaxis tests did not produce conclusive results due to the need for protocol adjustments. The findings reinforce OELO's potential as a modulator of neuromuscular functions, indicating the importance of future studies to evaluate its impact on cognitive functions.

Keywords: Essential oil; *Lippia origanoides*; *Caenorhabditis elegans*; AChE.

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal forma de demência presente no mundo atualmente e está rapidamente a tornar-se uma das doenças mais caras, letais e onerosas deste século (Scheltens, et al., 2021), com projeção de alcançar 139 milhões até 2050, segundo a Alzheimer's Disease International. Dentre as consequências da doença, pode-se destacar o prejuízo da memória (amnésia) e em déficits de linguagem (afasia), de função motora (apraxia), de reconhecimento (agnosia) ou de função executiva, como memória de trabalho e resolução de problemas. (Stahl, 2011). Ainda não existe cura para a DA, as intervenções disponíveis visam diminuir o quadro clínico e retardar a sua progressão, mas todos os tratamentos para a Doença de Alzheimer atualmente em uso clínico foram desenvolvidos com base na hipótese da colina e são medicamentos desenvolvidos para maximizar a ação da acetilcolina, neurotransmissor que atua na neurotransmissão dos neurônios colinérgicos (Kim, 2024). A *Lippia origanoides*, que é uma espécie nativa de alguns países da América Central e norte da América do Sul, especialmente da região Amazônica (Ribeiro, et al., 2021), produz óleos essenciais que mostram atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos patogênicos, atividade repelente, efeitos protetores de DNA e atividade antioxidante (Sarrazin, et al., 2015). O óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) teve análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa indicou que os principais componentes do OELO são o carvacrol e o timol (Moniz et al., 2023), esses compostos possuem várias propriedades biológicas importantes, sendo comumente utilizados como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico (Almeida, 2015). Outra atividade farmacológica já descrita para timol e carvacrol é a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Baldisserotto, 2017), enzima que é responsável por hidrolisar a acetilcolina na fenda sináptica, mostrando assim um desempenho anticolinesterásico. O nematodo de vida livre *Caenorhabditis elegans* consolidou-se como modelo biológico por uma série de características favoráveis ao seu uso na pesquisa, como um ciclo de vida rápido, fácil expansão populacional e criação em laboratório. Ademais, é um eucarioto multicelular simples cujo processo de desenvolvimento e comportamento pode ser facilmente monitorado (Rajini, Melstrom e Williams, 2008). Devido à linhagem celular invariante do tipo selvagem e a neuroanatomia do *C. elegans*, as mutações que dão origem a defeitos de desenvolvimento e comportamentais são facilmente identificadas em rastreios genéticos. Em *C. elegans*, cada célula muscular da parede corporal recebe inervação excitatória e inibitória de motoneurônios colinérgicos e GABAérgicos (Zhou et al., 2021), portanto, há ensaios em que os fenótipos da parede corporal de *C. elegans* foram utilizados para compreender a inibição da acetilcolinesterase e foi correlacionado com a quantificação da atividade da enzima (Izquierdo et al.). Deste modo, o nematodo pode ser um bom modelo para avaliar atividade de compostos anticolinesterásicos. Foi relatado que o óleo essencial da *Lippia origanoides* (OELO), cujo compostos como o carvacrol e o timol, como já descritos anteriormente, possuem fortes atividades antimicrobianas e em nosso laboratório observamos que o OELO tem um efeito antioxidante (Moniz et al., 2023) e anticolinesterásica. Entretanto, o impacto dessa ação sobre a memória em modelos de DA ainda não está esclarecido. Considerando que a acetilcolina é crucial para a modulação da memória olfativa, levantamos a hipótese de que a inibição da AChE pelo OELO poderia aumentar a capacidade de *C. elegans* de evitar compostos aversivos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do OELO sobre o comportamento neuromuscular e a memória olfativa em *C. elegans*,

por meio de ensaios de batimento faríngeo e quimiotaxia, investigando seu potencial como candidato terapêutico para a DA.

Metodologia

As cepas de *C. elegans* utilizadas foram obtidas do Caenorhabditis Genetic Center (CGC) e mantidas a 20 °C em meio sólido NGM (Nematode Growth Medium) semeado com *E. coli* OP50 como fonte de alimento (Brenner, 1974). Animais com idade sincronizada foram obtidos pelo tratamento de adultos grávidos com solução de lise (50% hipoclorito de sódio; 2,5 mM NaOH). Após a sincronização, os animais foram mantidos em placas NGM convencionais até atingirem o estágio larval L4, quando foram transferidos para placas contendo o tratamento por 24 horas. Ao completarem 72 h, os animais foram submetidos aos ensaios. O tratamento consistiu na mistura de diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL) de OELO à cultura de *E. coli* OP50 antes da semeadura no NGM, sendo as placas utilizadas em até uma semana. Para a análise do comportamento neuromuscular, avaliou-se o batimento faríngeo e a memória olfativa. No ensaio de batimento faríngeo, grupos tratados (OELO) e controle com animais adultos com um dia de idade foram transferidos para placas NGM sem bactérias, aguardando 2–3 minutos antes da observação. O batimento faríngeo foi contado três vezes, por 20 segundos cada, em dez animais por condição experimental. A memória olfativa dos animais foi avaliada por meio de ensaio de quimiotaxia com álcool isoamílico (AI). Após atingirem o estágio L4, os grupos tratados (com e sem OELO) e o controle não tratado (com e sem AI) foram expostos ao tratamento por 24 horas e, em seguida, condicionados ao odorante, adicionando 10 µL de AI puro na parte interna da tampa da placa, incubando a 20–22 °C por 90–120 minutos em placas sem alimento. Após o condicionamento, os animais foram transferidos para placas de descanso contendo alimento (*E. coli* OP50) por 30 minutos. Para o ensaio de quimiotaxia, as placas foram marcadas conforme um triângulo isósceles, com os pontos de início (S), armadilha (T) e teste com álcool isoamílico (IA) equidistantes (4,5 cm) do ponto inicial. Quinze minutos antes da transferência dos animais para as placas de ensaio, 15 µL de azida de sódio foram adicionados nos pontos IA e T. Os animais foram lavados com tampão M9, transferidos para tubos Eppendorf e, em seguida, depositados no ponto S da placa de quimiotaxia. No ponto IA, foi colocado um pequeno quadrado de parafilme sobre o qual se adicionaram 4 µL do AI diluído 1:50 em água. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 20–22 °C por 1 hora. Após a incubação, foi registrado o número de animais em cada ponto e calculado o índice de quimiotaxia (IQ) utilizando a fórmula:
$$IQ = (n^{\circ}IA - n^{\circ}T) / (n^{\circ}IA + n^{\circ}T + n^{\circ}S)$$
 onde $n^{\circ}IA$, $n^{\circ}T$ e $n^{\circ}S$ correspondem ao número de animais nos pontos de teste, armadilha e início, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com análise comparativa entre grupos tratados e controles.

Resultados e Discussões

O tratamento de *C. elegans* com OELO resultou em redução significativa da taxa de batimento faríngeo em todas as concentrações testadas (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL) em relação aos grupos controle e DMSO. Essa diminuição foi observada já após 24 horas de exposição iniciada no estágio L4 e foi consistente nas três repetições independentes realizadas. O batimento faríngeo é um parâmetro fisiológico relacionado à atividade neuromuscular e à eficiência alimentar do nematodo. A redução observada sugere que o OELO interfere na neurotransmissão colinérgica, possivelmente pela inibição da AChE,

efeito já descrito para o carvacrol e o timol. Resultados semelhantes foram reportados em outros modelos biológicos, indicando ação anticolinesterásica de compostos fenólicos presentes no OELO. Os ensaios de quimiotaxia para avaliação da memória olfativa foram conduzidos, porém não produziram resultados conclusivos, devido à necessidade de otimização do protocolo experimental. A ausência de dados consistentes nesta etapa impede conclusões sobre o potencial efeito do OELO na modulação de funções cognitivas em *C. elegans*. Apesar dessa limitação, os resultados obtidos para o batimento faríngeo indicam que o OELO pode modular parâmetros neuromusculares, reforçando seu potencial como objeto de estudo para desenvolvimento de agentes anticolinesterásicos de origem natural.

Conclusão

O óleo essencial de *Lippia origanoides* reduziu de forma consistente o batimento faríngeo de *C. elegans* em todas as concentrações testadas, sugerindo efeito sobre a neurotransmissão colinérgica, possivelmente via inibição da acetilcolinesterase. Ensaios de memória olfativa foram iniciados, mas não resultaram em dados conclusivos devido a ajustes necessários no protocolo. Esses achados reforçam o potencial do OELO como modulador de funções neuromusculares e indicam a importância de estudos futuros para investigar seu impacto sobre funções cognitivas e seu possível uso como agente terapêutico de origem natural.

Referências

ALMEIDA, R. Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol. [s.l.: s.n.]. BALDISSEROTTO, A. E. Mecanismo de ação de monoterpenoides com atividade sedativa e anestésica em jundiás (*Rhamdia quelen*). [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2 fev. 2017. CAO, Shu-Qin; WANG, He-Ling; PALIKARAS, Konstantinos; TAVERNARAKIS, Nektarios; FANG, Evandro Fei. Chemotaxis assay for evaluation of memory-like behavior in wild-type and Alzheimer's-disease-like *C. elegans* models. *STAR Protocols*, v. 4, n. 2, p. 102250, 2023. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102250. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10154957/>. IZQUIERDO, P. G. et al. *C. elegans* pharyngeal pumping provides a whole organism bio-assay to investigate anti-cholinesterase intoxication and antidotes. Elsevier. KIM, Y. J. Pharmacotherapy for patients with Alzheimer's disease. *Journal of The Korean Medical Association*, 10 Março 2024. MONIZ, A. M. et al. *Lippia origanoides* essential oil increases longevity and ameliorates β -amyloid peptide-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Natural Product Research*, 2 Dezembro 2023. RAJINI, P. S.; MELSTROM, P.; WILLIAMS, P. A comparative study on the relationship between various toxicological endpoints in *Caenorhabditis elegans* exposed to organophosphorus insecticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 6 novembro 2008. RIBEIRO, F. P. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia origanoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 19 outubro 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2021/9930336>. SARRAZIN, S. L. F. et al. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules*, 20 Fevereiro 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/2/1860>. SCHELTENS, et al. Alzheimer's disease, 2 Março 2021. STEIN, Geneva M.; MURPHY, Coleen T. *C. elegans* positive olfactory associative memory is a molecularly conserved behavioral paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 115, p. 86–94, nov. 2014. DOI: 10.1016/j.nlm.2014.07.011.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25108196/> . STAHL, S. M.
Psicofarmacologia Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas. 3a. ed. Rio de Janeiro:
Guanabara Koogan, 2011. ZHOU, X. et al. The HSPG syndecan is a core organizer of
cholinergic synapses. Journal of Cell Biology, 2 julho 2021.

CÓDIGO: SB0959

AUTOR: ROBECIA MARIA DA SILVA

ORIENTADOR: RENATA DE FÁTIMA PANOSSO

TÍTULO: Crescimento de *Sphaerospermopsis torques-reginae* em condições laboratoriais e perspectivas de uso no controle de mosquitos do gênero *Aedes*

Resumo

Cianobactérias planctônicas produzem metabólitos bioativos, como cianotoxinas capazes de afetar o desenvolvimento de insetos por ação neurotóxica, efeito que pode ser explorado no controle de vetores de arboviroses, como o gênero *Aedes*, frente à resistência e aos impactos ambientais associados a inseticidas sintéticos. Nesse contexto, bioinseticidas despontam como alternativa promissora. A cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* produz guanitoxina, um organofosforado neurotóxico. Este estudo avaliou seu crescimento *in vitro* e buscou estabelecer colônias de *Aedes* para futuros bioensaios. O cultivo em meio artificial, com luz e temperatura controladas, apresentou fase lag até o 5º dia e crescimento exponencial até o 15º dia, atingindo $3,97 \times 10^6$ células/mL, com taxa média de $0,12 \mu\text{.dia}^{-1}$, inferior à de outras cianobactérias filamentosas. Para o estabelecimento de colônias de *Aedes*, armadilhas foram instaladas no campus da UFRN. A primeira tentativa falhou possivelmente devido à salinidade da água de poço utilizada; após substituição por água mineral, obteve-se desenvolvimento até a fase adulta, embora a colônia ainda esteja em consolidação. Conclui-se que *S. torques-reginae* apresenta crescimento viável em cultivo, mas requer otimização de parâmetros para exploração biotecnológica. Ajustes metodológicos permitiram a domesticação de uma população de *A. albopictus*, atualmente em fase de estabilização.

Palavras-chave: Cianotoxinas. Dengue. Chikungunya. Inseticida natural. Ovicida. Fase larval

TITLE: Growth of *Sphaerospermopsis torques-reginae* under laboratory conditions and prospects for use in the control of mosquitoes of the genus *Aedes*

Abstract

Planktonic cyanobacteria produce bioactive metabolites, such as cyanotoxins capable of affecting insect development through neurotoxic action, an effect that can be exploited for the control of arbovirus vectors, such as the *Aedes* genus, in light of resistance and environmental impacts associated with synthetic insecticides. In this context, bioinsecticides emerge as a promising alternative. The cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* produces guanitoxin, a neurotoxic organophosphate. This study evaluated its *in vitro* growth and aimed to establish *Aedes* colonies for future bioassays. The culture in artificial medium, under controlled light and temperature conditions, exhibited a lag phase until the 5th day and exponential growth until the 15th day, reaching 3.97×10^6 cells/mL, with an average growth rate of $0.12 \mu\text{.day}^{-1}$, lower than that of other filamentous cyanobacteria. For the establishment

of *Aedes* colonies, traps were installed on the UFRN campus. The first attempt likely failed due to the salinity of the well water used; after replacing it with mineral water, development up to the adult stage was achieved, although the colony is still under consolidation. It is concluded that *S. torques-reginae* shows viable growth in culture but requires optimization of parameters for biotechnological exploitation. Methodological adjustments enabled the domestication of an *A. albopictus* population, currently in the stabilization phase.

Keywords: Cyanotoxins. Dengue. Chikungunya. Natural insecticide. Ovicidal.

Introdução

Cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes e importantes componentes do fitoplâncton de ecossistemas aquáticos continentais, como lagos, rios e açudes. Tais microrganismos são conhecidos por produzirem compostos bioativos com uma ampla gama de aplicações nas áreas de bioenergia, biotecnologia, produtos naturais, medicina, agricultura e meio ambiente (Zahra et al. 2020). Entre esses compostos destacam-se as neurotoxinas (cianotoxinas), que podem afetar o desenvolvimento de insetos, provocando mortalidade ao interferirem no sistema nervoso das larvas (Kiviranta et al., 1993). A exposição a essas toxinas também pode ocasionar deformidades, redução na taxa de crescimento e atraso no desenvolvimento. *Sphaerospermopsis torques-reginae*, por exemplo, é uma cianobactéria potencialmente produtora da cianotoxina guanitoxina (Werner et al., 2011), um composto organofosforado natural de ação neurotóxica, que atua como inibidor irreversível da enzima acetilcolinesterase. Essa característica confere à espécie relevância como fonte potencial para o desenvolvimento de inseticidas (Fiore et al., 2020). Os mosquitos *Aedes aegypti* e *A. albopictus* são importantes espécies vetoras de arbovírus, incluindo o vírus da dengue (DENV, Flaviviridae, Flavivirus), o vírus chikungunya (CHIKV, Togaviridae, Alphavirus), o vírus Zika (ZIKV, Flaviviridae, Flavivirus), e o vírus Oropuche. Somente em relação à dengue, o Brasil registrou mais de 6 milhões de casos em 2024, com 6.321 óbitos confirmados, destacando-se como um problema de saúde pública. Além disso, populações de *Aedes* têm se expandido para países onde não eram encontrados no passado, provavelmente devido às mudanças climáticas (Ryan et al. 2019). O combate à disseminação dos vetores é geralmente realizado por meio de um conjunto de estratégias, que incluem a eliminação de criadouros de água parada e na proteção pessoal, como o uso de repelentes e telas, além da aplicação de inseticidas sintéticos. No entanto, o uso de inseticidas organoclorados e organofosforados tem enfrentando limitações, sobretudo devido ao risco de impactos ambientais adversos (Jacups et al., 2013). Ademais, a aplicação contínua desses produtos tem favorecido o desenvolvimento de resistência dos mosquitos, reduzindo a eficiência dessa estratégia de controle (Vale et al., 2019). No combate aos mosquitos adultos, são frequentemente utilizados inseticidas organofosforados e piretróides, principalmente durante surtos de dengue. Para o controle das larvas de *Aedes*, o principal larvicida empregado no país tem sido o organofosforado temefós. Embora larvicidas biológicos, como aqueles baseados na bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* e *Wolbachia*, venham sendo usados para minimizar a resistência a inseticidas, essas abordagens apresentam algumas limitações (Pavan et al., 2023). Dessa forma, a aplicação de inseticidas ainda deve ser combinada com o uso de larvicidas biológicos. Diante da necessidade de desenvolver inseticidas biodegradáveis com menor impacto ambiental para o controle dos vetores de arbovirose, o presente trabalho está inserido em um projeto mais amplo, que busca avaliar o uso de cianotoxinas no controle dos vetores de arbovirose. A cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* é uma

espécie potencialmente produtora da cianotoxinas guanitoxina (Werner et al., 2011), um composto organofosforado natural, de ação neurotóxica, que atua como um inibidor irreversível da enzima acetilcolinesterase, o que a torna uma fonte potencial para o desenvolvimento de inseticidas (Fiore et al., 2020). Para tanto, esta pesquisa teve como objetivos: 1. quantificar a taxa de crescimento de *S. torques-reginae* in vitro para avaliar as condições de cultivo que favorecem a obtenção de biomassa da cianobactéria; 2. estabelecer uma colônia de *A. aegypti* e *A. albopictus*. para utilização nos futuros bioensaios utilizando os extratos da cianobactéria.

Metodologia

1.1 Cultivo e curva de crescimento de *S. torques-reginae*

Um cultivo de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024; Universidade Federal do Agreste de Pernambuco), mantido no Laboratório de Microbiologia Aquática em meio de cultivo ASM-1, foi aclimatado em novo meio - o Wright's Cryptophyte (WC), em frascos de Erlenmeyer, sob iluminação de 50 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 horas dos ciclos claro:escuro, em temperatura entre $23 \pm 1^\circ\text{C}$. A aclimação foi necessária para que os ensaios futuros com indivíduos de *A. aegypti*, venham também a ser realizados com o meio WC, já testado previamente em ensaios utilizando outras espécies de cianobactérias.

A partir do cultivo estoque, foi iniciado um novo cultivo em meio WC para a determinação da taxa de crescimento da cepa. Para tanto, inóculos do cultivo estoque foram transferidos para três frascos erlenmeyer, em volume de 50 mL de meio WC, utilizando-se técnicas de manobras assépticas. Os cultivos foram mantidos sob condições de cultivo previamente descritas, e agitação manual periódica para evitar a formação de agregados de filamentos, além de minimizar o auto-sombreamento (Fotos 1 e 2, em anexo). Ao atingir biomassa elevada, foi realizado um novo repique do cultivo adaptado ao novo meio de cultivo (WC), em três réplicas.

Para construir a curva de crescimento da cepa *S. torques-reginae* em meio WC, uma alíquota ($\sim 100 \mu\text{L}$) foi coletada diariamente de cada uma das três réplicas do cultivo, durante 16 dias. A contagem de células para determinação diária da densidade celular dos inóculos foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer (Foto 3, em anexo). A presença de heterocitos e acinetos nas amostras também foi registrada. A taxa de crescimento de *S. torques-reginae*, expressa por unidade de tempo nos diferentes tratamentos e na média de cada tratamento, foi calculada utilizando a fórmula: $\mu = \ln(C_f/C_i)/t$, onde C_f corresponde à densidade celular final, C_i corresponde à densidade celular inicial, e t é o intervalo de tempo em que o crescimento se manteve exponencial (Fogg & Thake, 1987).

1.2 Obtenção das larvas dos *Aedes*

Para a obtenção das larvas de espécies do gênero *Aedes*, foram instaladas armadilhas que capturam os ovos das fêmeas através da atração do inseto à uma fonte hídrica, conhecida como Ovitampa (Foto 12). Foram feitas duas tentativas de obtenção de ovos. As armadilhas foram instaladas quatro ovitrampas em diferentes locais no Campus Central da UFRN: na área externa do Laboratório de Entomologia; no corredor externo ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP); próximo à Casa de Vegetação do Centro de Biociências; no jardim da reitoria da UFRN. Após sete dias, as armadilhas foram retiradas e os ovos foram colocados para eclosão no Laboratório de Insetos e Vetores. Na primeira tentativa de obtenção da colônia, os ovos foram colocados para eclosão em bandejas plásticas contendo aproximadamente 500 mL de água de poço artesiano e mantidos em condições

controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($80 \pm 10\%$), e com fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro). Já na segunda tentativa, os ovos coletados nas armadilhas foram alocados nas bandejas contendo água mineral, nas mesmas condições laboratoriais descritas anteriormente.

Resultados e Discussões

2.1 Curva de crescimento *S. torques-reginae*

Observou-se um crescimento inicialmente lento dos cultivos de *S. torques-reginae*, até o quinto dia, caracterizando a fase lag do crescimento microbiano. O número de células atingiu seu pico máximo no 15º dia de incubação, com uma densidade de aproximadamente 3.970.833 células/mL (Gráfico 1, em anexo). Todas as amostras apresentaram uma diminuição no crescimento no 16º dia de incubação, caracterizando declínio da população. A cada análise microscópica, foi realizada uma inspeção para verificar a presença de heterocitos e acinetos, que são células especializadas em garantir a sobrevivência da espécie em condições ambientais desfavoráveis ao seu crescimento. Em todas as análises, houve ausência de heterocitos e acinetos, indicando provável ausência de limitação por nitrogênio (He et al., 2021).

A taxa de crescimento média do cultivo de *S. torques-reginae* foi $0,12 \mu\text{.dia}^{-1}$, considerando a fase de crescimento exponencial entre o 5º e 15º dia de cultivo. Isto significa que, nas condições de cultivo do presente estudo, *S. torques-reginae* leva aproximadamente de 5 dias para dobrar a quantidade de células. Tal taxa de crescimento é inferior aos valores reportados para outras cianobactérias filamentosas (valor típico de 0,6 a 0,9, incubadas na temperatura de 25°C). (Lurling et al. 2012).

2.3 Obtenção das larvas dos *Aedes Albopictus*

Na primeira tentativa de obtenção de ovos, exceto as armadilhas instaladas na reitoria do campus, as demais receberam ovoposição de *Aedes*. Apesar das armadilhas conseguirem capturar alguns ovos, eles não se desenvolveram sob condições de laboratório nesta primeira tentativa. Provavelmente este insucesso ocorreu devido à critérios físico-químicos, como a qualidade da água para a criação das larvas de *Aedes*, que inicialmente foi utilizada água da torneira do Laboratório de Insetos e Vetores, que vem de um poço artesiano, aparentemente sem tratamentos químicos para a cloração da água ou uso de larvicidas. Porém, a água de poços subterrâneos em Natal pode apresentar conteúdo salino (Melo et al., 2011), o que causa toxicidade à *A. aegypti* (Silva et al. 2019).

Na segunda tentativa de estabelecimento da colônia, foi usada água mineral para a obtenção de ovos e larvas, tendo sido bem sucedida. Após a substituição da água de poço artesiano por água mineral comercial, as larvas conseguiram se desenvolver até a fase de pupa e depois adulto. Porém, a consolidação da colônia de *Aedes* ainda está em curso para a obtenção de novas gerações, idealmente contando com emergência de pelo menos 70% (Anjolette et al. 2016), para posterior realização dos testes.

Conclusão

Apesar do insucesso inicial na obtenção da colônia de *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, foram feitos ajustes nos métodos visando a domesticação da população silvestre que foi capturada a partir dos indivíduos imaturos, garantindo a implantação da colônia.

O cultivo de *S. torques-reginae* revelou um padrão clássico de crescimento: fase lag prolongada até o 5º dia, crescimento exponencial até o 15º dia, seguido de declínio populacional. O crescimento mais lento detectado no presente trabalho pode refletir características específicas da espécie ou das condições de cultivo utilizadas, mas não desqualifica seu potencial biotecnológico, especialmente no contexto de produção de toxinas naturais com aplicação como bioinseticida. Futuras investigações que variem parâmetros ambientais (como luz, nutrientes e temperatura) podem otimizar a dinâmica de produção e viabilizar aplicações práticas de *S. torques-reginae*.

Referências

4. REFERÊNCIAS

Fiore, M. F., de Lima, S. T., Carmichael, W. W., McKinnie, S. M. K., Chekan, J. R., & Moore, B. S. (2020). Guanitoxin, re-naming a cyanobacterial organophosphate toxin. *Harmful Algae*, 92, 101737. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101737>

Saario, E., Abdel-Hameed, A., & Kiviranta, J. (1992). Larvicidal effects of toxic cyanobacteria on yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Acta Pharmaceutica*.

Li, Z.; Zhu, X.; Wu, Z.; Sun, T.; Tong, Y. Recent Advances in Cyanotoxin Synthesis and Applications: A Comprehensive Review. *Microorganisms* 2023, 11, 2636. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112636>.

MONTELLA, I.; MARTINS, A.; VIANA-MEDEIROS, P.; LIMA, J.; BRAGA, I.; VALLE, D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, n. 3, p. 467–477, set. 2007. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.467>.

BERRY, J. P.; GANTAR, M.; PEREZ, M. H.; BERRY, G.; NORIEGA, F. G. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Marine Drugs*, v. 6, n. 2, (2008).DOI: 10.3390/md20080007

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279-293, (2007) <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>

BOROTLI, S.; PINTO, E. Cianotoxinas: Características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. *Ecologia de reservatórios e interfaces*, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, cap. 21, (2015).

CARMICHAEL, W.W.; GORHAM, P.R. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of Western Canada. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, Heidelberg, v. 21, p. 285-295, 1978.

COOK, W.O.; BEASLEY, V.R.; DAHLEM, A.M.; DELLINGER, J.A.; HARLIN, K.S.; CARMICHAEL, W.W. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine

and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. *Toxicon*, Oxford, v. 26, n. 8, p. 750–753, (1988).

de Tezanos Pinto, P., Kust, A., Devercelli, M. et al. Morphological traits in nitrogen fixing heterocytous cyanobacteria: possible links between morphology and eco-physiology. *Hydrobiologia* 764, 271–281, (2016).

Farja I. Ayala¹, Laura M. Becerra², Jairo Quintana¹, Lina M. Bayona¹, Freddy A Ramos¹, Mónica Puyana³, Fredy Duque³, Leonardo Castellanos¹,. Environmental and cultured cyanobacteria as sources of *Aedes aegypti* larvicides. *Universitas Scientiarum*. Vol. 24 Issue 3, p465-496. 32p. (2019).

Ferreira D. A. da C.; Degener C. M.; Marques-Toledo C. de A.; Bendati M. M.; Fetzer L. O.; Teixeira C. P.; Eiras Á. E. *Parasitas e Vetores*, 10, 78 (2017).

Harada K, Suomalainen M, Uchida H, Masui H, Ohmura K, Kiviranta J, Ikemoto T. Compostos inseticidas contra larvas de mosquitos de *Oscillatoria agardhii* Cepas 27, *Toxicologia Ambiental*, 15: 114-119, (1999).

Jacinavicius, Fernanda & Junior, Watson & Azevedo, Maria & Anna, Celia. *MANUAL PARA CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS*, (2013).

J. Kiviranta, A. Abdel-Hameed, K. Sivonen, S. I. Niemelä, G. Carlberg. Toxicity of cyanobacteria to mosquito larvae—screening of active compounds. *Environmental Toxicology and Water Quality*. Volume 8-1, (1993).

NICOLAU, E. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C L. Atividade inseticida de óleo essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Quimica Nova*, Piracicaba, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, (2013).

SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.133, p.1-12, (2016).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Mosquito Larvicides. Disponível em: http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_Sept_2012.pdf. (2012).

PIRALI-KHEIRABADI, K.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control. *Experimental Parasitology*, v. 126, n. 2, p. 184–186, (2010).

RAI, K. *Aedes albopictus* in the america. *Annual review of entomology*, v. 36, p. 459–484, (1991).

Rezende, G. L.; Martins, A. J.; Gentile, C.; Farnesi, I. C.; Pelajo-machado, M.; Peixoto, A. A.; valle, d. *Bmc developmental biology*. 8(1), 1-1, (2008).

REY, J.; HARGRAVES, P.; O'CONNELL, S. Effect of selected marine and freshwater microalgae on development and survival of the mosquito *Aedes aegypti*. *AQUATIC ECOLOGY*, v. 43, n. 4, p. 987–997, (2009).

SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.133, p. 1-12, (2016).

Werner, Vera & Laughinghouse IV, H. & Fiore, Marli & C.L, Sant'Anna & Hoff-Risseti, Caroline & Santos, Kleber Renan De Souza & Neuhaus, Emanuel & Molica, Renato & Honda, R. & Echenique, Ricardo. SPHAEROSPERMOPSIS TORQUES-REGINAE

(CYANOBACTERIA,NOSTOCALES)COMB.NOVFROMSOUTHAMERICAN

WATER BLOOMS. Journal of Phycology. 47. S77-S77, (2011).

WorldHealthOrganization.Dengueandserevedengue,(2019).Disponívelem:

<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/dengue-and-severe-dengue>

Alkenani, N.A. (2017). Influence of the mixtures composed of slow-release insecticide formulations against *Aedes aegypti* mosquito larvae reared in pond water. Saudi Journal of Biological Sciences, 24(5), 1181-11

MELO, José Geraldo; VASCONCELOS, Mickaelon B.; ALVES, Rafaela da Silva; SOARES, Nadia C. Problemas de manejo de águas subterrâneas em ambientes urbanos: o caso do Município de Natal, RN. Natal, RN: Departamento de Geologia – UFRN, 19
SILVA, Denilma Lima da; ARAÚJO, Camila Rafaela Queiroz de; SIQUEIRA, Cícero Vinícius da Silva; et al.

Anexos

ANEXOS

Foto 1 e 2: Células de *S. torques-reginae* (Fotografia realizada em laboratório sob microscopia em aumento de 200 vezes). Três réplicas do cultivo. Foto 3 : Câmara de Neubauer utilizada para realizar contagem de células.

Gráfico 1: Curva de crescimento de células da *S. torques-reginae* (Cels.ml⁻¹ x10⁴) no meio de cultivo ASM-

ARMADILHAS

CÓDIGO: SB0967

AUTOR: ARTHUR HENRIQUE DANTAS DE AZEVEDO

COAUTOR: LEONARDO LUIZ DE SENA FERNANDES

COAUTOR: JOÃO VITOR SANTOS DE FRANÇA

ORIENTADOR: JOAO PAULO MATOS SANTOS LIMA

TÍTULO: Plumieridina e Quitinases: Ação, Estrutura e Importância

Resumo

A plumieridina, um iridoide produto do metabolismo da planta *Allamanda polyantha*, possui atividade antifúngica previamente atribuída à inibição de enzimas do tipo quitinases. No entanto, estudos *in silico* anteriores, utilizaram ferramentas que foram superadas por tecnologias mais recentes que utilizam abordagens de Inteligência Artificial (IA). Assim, este trabalho teve como principal objetivo reavaliar os modelos e as interações moleculares entre a plumieridina e quitinases do táxon *Cryptococcus*. Modelos tridimensionais de quitinases de *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. wingfieldii* e *C. deutorogattii* foram gerados e avaliados por meio do desenvolvimento de uma ferramenta, chamada *RevelioPlots*. Em seguida, a ligação com a plumieridina foi analisada por técnicas de simulação computacional de interação entre moléculas. Os resultados revelaram que, para todas as quitinases analisadas, a plumieridina ligou-se em uma parte adjacente ao segmento DIDxE, concordando com os estudos anteriores. Portanto, constata-se nesse estudo que os métodos mais modernos validaram os achados antecedentes, reforçando um potencial antifúngico mais abrangente da plumieridina para o táxon *Cryptococcus*.

Palavras-chave: Plumieridina; quitinases; antifúngicos; *Cryptococcus*.

TITLE: Plumieridin and Chitinases: Action, Structure, and Importance

Abstract

Plumieridin, an iridoid product of the metabolism of the *Allamanda polyantha* plant, possesses antifungal activity previously attributed to the inhibition of chitinase-type enzymes. However, previous *in silico* studies used tools that have been surpassed by more recent technologies that utilize Artificial Intelligence (AI) approaches. Thus, this work had as its main objective to re-evaluate the models and molecular interactions between plumieridin and chitinases from the *Cryptococcus* taxon. Three-dimensional models of chitinases from *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. wingfieldii*, and *C. deutorogattii* were generated and evaluated through the development of a tool called *RevelioPlots*. Subsequently, binding with plumieridin was analyzed by computational simulation techniques of molecular interaction. The results revealed that, for all analyzed chitinases, plumieridin bound to a part adjacent to the DIDxE segment, agreeing with previous studies. Therefore, this study concludes that the more modern methods validated the antecedent findings, reinforcing a more comprehensive antifungal potential of plumieridin for the *Cryptococcus* taxon.

Keywords: Plumieridin; chitinases; antifungals; *Cryptococcus*.

Introdução

As quitinases são enzimas que degradam quitina (HARTL et al., 2012), um polissacarídeo composto por monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) encontrado em carapaças de crustáceos, exoesqueletos de insetos, cutículas de invertebrados e paredes celulares de células fúngicas (ZHANG et al., 2021). Em fungos, as quitinases atuam juntamente às quitinas sintases, enzimas que sintetizam quitina (RONCERO, 2002), contribuindo para a remodelagem desse polissacarídeo estrutural, um processo fundamental para a manutenção da integridade da célula fúngica.

Dado esse papel vital na biogênese da parede celular, a inibição da atividade quitinásica representa uma estratégia antifúngica promissora. Além disso, mamíferos não sintetizam quitina, embora apresentem quitinases ácidas de mamíferos (AMCase) que possuem um papel na resposta imune de doenças respiratórias humanas (BOOT et al., 2001; ZHU et al., 2004). Todavia, foi relatado que a inibição de AMCase em humanos reduziu a resposta inflamatória em pacientes asmáticos (ZHU et al., 2004), sugerindo que esse tipo de inibição pode ser usada no tratamento de infecções fúngicas sem causar danos ao paciente. Diante do crescente desafio da resistência a antifúngicos convencionais, a busca por inibidores específicos para quitinases emergiu como uma área de substancial investigação, culminando na descoberta de novas alternativas terapêuticas (SILVA E SOUZA et al., 2020).

Nesse sentido, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa identificaram que a plumieridina, um iridoide produto do metabolismo da planta *Allamanda polyantha* (BRESCIANI, 2013), é capaz de se ligar a quitinases e exercer atividade fungicida contra *C. neoformans* (SILVA E SOUZA et al., 2020). Tal estudo também investigou, utilizando técnicas convencionais de "docking" molecular, a interação entre a plumieridina e as quitinases, revelando que a inibição causada pelo iridoide provavelmente resulta da sua ligação próxima ao sítio ativo das quitinases.

Entretanto, nos últimos 5 anos, novas ferramentas baseadas em aprendizado profundo (deep learning) foram desenvolvidas, possibilitando uma maior acurácia na predição de estruturas moleculares tridimensionais, tanto no âmbito da modelagem de proteínas, como na área de simulação das interações entre moléculas (JUMPER et al., 2021). Um marco dessa nova era é o AlphaFold, que expandiu as fronteiras estabelecidas por seus predecessores ao prever com exatidão similar à experimental, não apenas em estruturas proteicas isoladas, mas em complexos inteiros envolvendo proteínas, ácidos nucleicos, íons e pequenos ligantes (ABRAMSON et al., 2024). Em paralelo, a etapa de avaliação dessas interações também evoluiu com o surgimento de ferramentas de simulação de ligação que integram IA, como o AlphaFold3 e o Boltz, para desenvolver funções de pontuação mais precisas e métodos de busca conformacional mais eficientes (ABRAMSON et al., 2024; WOHLWEND et al., 2025).

Considerando que essas novas abordagens baseadas em IA permitem uma caracterização mais confiável da interação entre a plumieridina e as enzimas do tipo quitinases do táxon *Cryptococcus*, o objetivo principal deste trabalho é utilizar métodos computacionais de vanguarda para reavaliar essa interação, comparando os achados com os dados previamente relatados na literatura.

Metodologia

Obtenção e Preparação das Estruturas Moleculares

A estrutura bidimensional do ligante de interesse, a plumieridina, foi obtida a partir do banco de dados ChemSpider (ID: 28285757). Com base no código SMILES da molécula, a ferramenta web Rictusempira (<https://rictusempira.streamlit.app/>) foi utilizada para a visualização, confirmação estrutural e verificação do seu estado de protonação em pH 7, assegurando a conformação quimicamente relevante para as simulações subsequentes.

As proteínas alvos - quitinases -, por sua vez, foram selecionadas a partir da base de dados específica para busca de proteínas (Proteins) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A busca foi direcionada para as espécies de interesse criptocócicas: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* H99, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus wingfieldii* e *Cryptococcus deuterogattii*. A sequência de aminoácidos de cada uma delas foi utilizada, subsequentemente, para o alinhamento múltiplo das sequências realizado com o auxílio de um conjunto de ferramentas bioinformáticas, incluindo Geneious para gerenciamento de sequências, AliView para visualização e edição de alinhamentos, e ChimeraX em conjunto com o Conserved Domain Database (CDD) para a identificação e análise de domínios estruturais conservados.

Modelagem Molecular e Análise de Interação

Para a predição da estrutura tridimensional das quitinases, foi empregado o modelo de inteligência artificial AlphaFold3. As sequências de aminoácidos, previamente obtidas e alinhadas, foram submetidas ao servidor do AlphaFold3 para gerar os modelos estruturais que serviram de base para os estudos de interação.

A simulação de acoplamento molecular (docking) entre a plumieridina e os modelos tridimensionais das quitinases foi conduzida utilizando a ferramenta Boltz-1 (Wohlwend et al., 2025). Este procedimento permitiu prever as possíveis poses de ligação do ligante no sítio ativo das enzimas, bem como estimar a afinidade de interação entre as moléculas.

Validação de Modelos

A análise crítica e comparativa dos complexos proteína-ligante gerados foi realizada utilizando a RevelioPlots (<https://revelioplots.streamlit.app/>) - ferramenta online projetada para comparar múltiplos modelos estruturais a partir do cálculo e visualização de métricas estatísticas do pLDDT (predicted Local Distance Difference Test), como média, mediana e desvio padrão e correlacionando os escores de confiabilidade do pLDDT com a análise de gráficos de Ramachandran, permitindo uma verificação aprofundada da viabilidade biológica e estereoquímica das conformações previstas pelo AlphaFold3.

Resultados e Discussões

A estrutura canônica da plumieridina A foi obtida em formato SMILES a partir do banco de dados ChemSpider (ID: 28285757). A verificação da estrutura, bem como a análise do seu estado de protonação em pH 7, foi realizada com a ferramenta web RictumSempra, a qual indicou que a molécula permanece em sua forma neutra. A partir do código SMILES, a estrutura tridimensional do ligante foi então gerada diretamente pela ferramenta de docking Boltz-1 para as subseqüentes simulações de interação com as quitinases.

Inicialmente, os modelos das quitinases realizados pelo AlphaFold3 mostraram que todas elas possuíam regiões com confiabilidade predominantemente baixa (pLDDT muito baixo, < 50) no início da sequência (Figura 1), característica que aponta para uma provável clivagem dessas regiões no processamento pós-traducional. Após isso, os modelos primários foram submetidos a uma análise por meio do RevelioPlots, que destacou com um nível maior de detalhamento os segmentos de confiabilidade baixa. Então, tendo em vista que a interação da plumieridina com as quitinases ocorre quando elas estão na sua forma final, as quitinases foram novamente modeladas, mas dessa vez sem os aminoácidos que apresentaram pLDDT < 50, gerando proteínas significativamente mais confiáveis (Figura 2). O melhor modelo da quitinase XM_012192586.1, de *C. neoformans*, teve seu pLDDT médio aumentado de 77,34 para 94,91 após a retirada da região com confiabilidade baixa (Figura 3). Um aumento semelhante foi relatado para todas as sete quitinases estudadas (Tabela 1).

A simulação computacional da ligação entre a plumieridina e as quitinases revelou que, para todas as quitinases analisadas, a interação ocorreu próximo ao segmento DIDxE (Figura 4). Tal achado concorda diretamente com os achados do estudo de Silva e Souza et al., o qual também relatou essa proximidade à sequência DIDxE. Para mais, é importante lembrar que o fragmento DIDxE é uma região evolutivamente conservada das quitinases. Como sequências preservadas geralmente são partes importantes para a estrutura e para a função das proteínas (ASHKENAZY et al., 2016), sugere-se que o DIDxE é um sítio de ligação ou um domínio catalítico essencial para essas quitinases. Adicionalmente, os gráficos de cobertura de sequência gerados pelo Boltz exibiram um pico de cobertura consistente para todas as quitinases entre as posições 100 e 150 (Figura 5), que compreende a região em que DIDxE está. Portanto, essas reflexões ajudam a explicar por que a localização da interação entre a plumieridina e as quitinases, no geral, esteve sempre adjacente à sequência DIDxE.

Conclusão

Este estudo revalidou e reforçou os achados anteriores sobre a interação entre a plumieridina e as quitinases do táxon *Cryptococcus*, utilizando métodos computacionais avançados baseados em IA. Os resultados demonstraram que a plumieridina se liga de forma consistente em uma região adjacente ao segmento DIDxE em todas as quitinases analisadas, o que corrobora a hipótese de sua atividade antifúngica por inibição dessas enzimas. A aplicação de ferramentas como o AlphaFold3 para modelagem molecular e o Boltz-1 para simulação de interação, juntamente com o Rictusempra para visualização da estrutura e estudo de protonação além do desenvolvimento do RevelioPlots para avaliação, permitiu uma análise mais precisa e confiável, superando as limitações de estudos *in silico* anteriores. A conservação evolutiva do segmento DIDxE e sua relevância funcional reforçam a importância dessa interação para o potencial antifúngico da plumieridina.

Assim, a plumieridina emerge como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos antifúngicos contra infecções causadas por *Cryptococcus*, em um cenário de crescente resistência aos tratamentos convencionais. Adicionalmente, um próximo passo crucial para

aprofundar a compreensão desse mecanismo de ação seria a análise detalhada das redes de interação de resíduos (RINs) dessas ligações por meio da ferramenta RING.

Referências

Silva e Souza, Eden; Barcellos, Vanessa de Abreu; Sbaraini, Nicolau; Reuwsaat, Júlia Catarina Vieira; Schneider, Rafael de Oliveira; da Silva, Adriana Corrêa; Garcia, Ane Wichine Acosta; von Poser, Gilsane Lino; Barbosa, Euzébio Guimarães; Lima, João Paulo Matos Santos; Vainstein, Marilene Henning. A Plumieridine-Rich Fraction From *Allamanda polyantha* Inhibits Chitinolytic Activity and Exhibits Antifungal Properties Against *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*. Volume 11 - 2020.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02058>

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>

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. ChemSpider: The free chemical database. Cambridge, 2025. Disponível em: <https://www.chemspider.com/>. Acesso em: 27 ago. 2025.

HARTL, L., ZACH, S., & SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 533-543. 2012.

RONCERO, C. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current genetics*, 41(6), 367-378, 2002.

BRESCIANI, F. R. Caracterização da atividade antifúngica de extrato aquoso de sementes. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

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>

BOOT, R. G. et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 9, p. 6770-6778, 2001.

ZHU, Z. et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, v. 304, n. 5677, p. 1678-1682, 2004.

Wohlwend J, Corso G, Passaro S, Getz N, Reveiz M, Leidal K, Swiderski W, Atkinson L, Portnoi T, Chinn I, Silterra J, Jaakkola T, Barzilay R. Boltz-1 Democratizing Biomolecular Interaction Modeling. *bioRxiv [Preprint]*. 2025 May 6:2024.11.19.624167. doi: 10.1101/2024.11.19.624167. PMID: 39605745; PMCID: PMC11601547.

Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(W1):W344-50. doi: 10.1093/nar/gkw408. Epub 2016 May 10. PMID: 27166375; PMCID: PMC4987940.

Anexos

Figura 1 – Modelos de quitinases obtidos por meio do AlphaFold3.

Figura 2 – Modelos ajustados de quitinases obtidos por meio do AlphaFold3.

Figura 3 – Análise das estatísticas de pLDDT dos modelos da quitinase XM_012192586.1.

Tabela 1 – Comparação do pLDDT médio dos modelos de quitinases gerados antes e depois da análise por meio do RevelioPlots.

Figura 4 – Representação feita através do ChimeraX dos modelos gerados após o “docking” molecular realizado pelo Boltz.

CÓDIGO: SB0972

AUTOR: ESTER DE MEDEIROS ROCHA

COAUTOR: ALESSANDRA DANIELE DA SILVA

COAUTOR: SARAH DE SOUSA FERREIRA

COAUTOR: GUNTHINEIA ALVES DE LIRA

COAUTOR: BEATRIZ KETLYN DA CUNHA BATISTA

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DA APITOXINA: ENSAIOS ENZIMÁTICOS E ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Resumo

A abelha *Apis mellifera* produz a apitoxina, uma peçonha de grande interesse clínico devido às suas diversas atividades farmacológicas, atribuídas a enzimas como proteases, hialuronidases e fosfolipases. Este estudo caracterizou in vitro o perfil enzimático e hemolítico da apitoxina. Foram realizados ensaios de atividade proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica, além de teste de hemólise com eritrócitos humanos (aprovado pelo Comitê de Ética, CAAE 06999519.3.0000.5292). Os resultados revelaram baixa atividade proteolítica ($5,4 \pm 0,4$ U/mL em 10 μ g), sem relação dose-dependente. A atividade fosfolipásica foi de $49,3 \pm 1,35\%$ (10 μ g), também não dose-dependente. A atividade hialuronidásica foi a mais proeminente, atingindo 100% a partir de 20 μ g, indicando alta concentração desta enzima, responsável pela espalhabilidade da peçonha. A fosfolipase A2 (PLA2), um dos principais componentes imunogênicos, atua sinergicamente com a melitina para danificar membranas e desencadear inflamação. O ensaio hemolítico confirmou alto potencial citotóxico, com hemólise superior a 80% nas concentrações entre 250 e 31,2 μ g/mL. Conclui-se que a apitoxina possui alta atividade hialuronidásica e fosfolipásica, mas baixa atividade proteolítica. Seu elevado potencial hemolítico reforça a necessidade de estratégias para minimizar efeitos adversos, como o uso de nanopartículas de quitosana para liberação direcionada, aumentando a segurança e eficácia de sua aplicação terapêutica.

Palavras-chave: Apitoxina. Atividades enzimáticas. Atividade hemolítica. Nanopartícula

TITLE: CHARACTERIZATION OF APITOXIN: ENZYMATIC ASSESSMENTS AND HEMOLYTIC ACTIVITY

Abstract

The honeybee *Apis mellifera* produces apitoxin, a venom of great clinical interest due to its diverse pharmacological activities, attributed to enzymes such as proteases, hyaluronidases, and phospholipases. This study characterized the enzymatic and hemolytic profile of apitoxin in vitro. Proteolytic, phospholipase, and hyaluronidase activity assays were performed, as well as a hemolysis test with human erythrocytes (approved by the Ethics Committee, CAAE

06999519.3.0000.5292). The results revealed low proteolytic activity (5.4 ± 0.4 U/mL at 10 μ g), with no dose-dependent relationship. Phospholipase activity was $49.3 \pm 1.35\%$ (10 μ g), also not dose dependent. Hyaluronidase activity was the most prominent, reaching 100% from 20 μ g, indicating a high concentration of this enzyme, responsible for the spreadability of the venom. Phospholipase A2 (PLA2), one of the main immunogenic components, acts synergistically with melittin to damage membranes and trigger inflammation. The hemolytic assay confirmed high cytotoxic potential, with hemolysis greater than 80% at concentrations between 250 and 31.2 μ g/mL. It is concluded that apitoxin has high hyaluronidase and phospholipase activity but low proteolytic activity. Its high hemolytic potential reinforces the need for strategies to minimize adverse effects, such as the use of chitosan nanoparticles for targeted delivery, increasing the safety and efficacy of its therapeutic application.

Keywords: Apitoxin. Enzymatic Activities. Hemolytic activity. Nanoparticles.

Introdução

A *Apis mellifera* pertence à ordem Hymenoptera, e sua peçonha tem sido utilizada cada vez mais para fins medicinais. Estudos têm demonstrado que essa peçonha apresenta diversas atividades farmacológicas relevantes, como ação antimicrobiana *in vitro*, antitumoral e antiviral *in vitro* e *in vivo*, antifúngica, citotóxica, atribuídas à sua composição rica em enzimas, proteínas, aminoácidos e aminas (Carpena et al., 2020; FangZhang et al., 2017). De acordo com dados do Ministério da Saúde, as abelhas ocupam o terceiro lugar entre os animais peçonhentos que mais causam mortes de humanos no Brasil. Em 2023, houve mais de 340 mil notificações de acidentes envolvendo esses animais, resultando em 451 óbitos. No período de 2019 a 2023, os principais responsáveis por óbitos foram, respectivamente: serpentes, escorpiões e abelhas. Esse aumento é impulsionado pela expansão de espécies adaptadas ao ambiente urbano, o avanço desordenado das cidades e as mudanças climáticas. Estas últimas, sob a perspectiva do conceito "Uma Só Saúde", alteram a distribuição das abelhas, que buscam alimento em áreas urbanas e ampliam o risco de acidentes (Ministério da Saúde, 2024). A composição da peçonha, no entanto, pode variar de acordo com fatores como origem geográfica, variação sazonal e dieta. Somado a isto, é evidente o crescente número de casos com animais peçonhentos mundialmente, sobretudo no Brasil. Apesar de se tratar de uma espécie altamente defensiva, isso facilita a coleta de peçonha, além dela ser uma das eficientes produtoras de mel e própolis (Blema, et al, 2025; Ministério da Agricultura e Agropecuária, 2023). O envenenamento causado por múltiplas picadas de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) é um problema que vem sendo cada vez mais recorrente no Brasil. Os protocolos atuais para envenenamento por picada de abelha concentram-se em analgesia e no tratamento de reações alérgicas agudas, como a anafilaxia. Contudo, faltam diretrizes para complicações graves, como insuficiência renal, lesões cardíacas e hemólise, o que deixa lacunas no manejo de casos severos. Somado a isto, há ausência de um soro antiapílico específico, dificultando a neutralização rápida das toxinas. Outrossim, a falta de padronização e segurança na produção de formas farmacêuticas à base de apitoxina compromete seu uso terapêutico e aumenta os riscos de efeitos adversos (Cavalcante, 2024). Estudos têm evidenciado inúmeros benefícios em aplicações terapêuticas da apitoxina, no entanto, um dos desafios são seus inúmeros efeitos adversos, devido algumas substâncias presentes em sua composição, como algumas enzimas, peptídeos e aminas, responsáveis por inúmeras reações alérgicas, inflamação, dores. Devido a isso, a associação com nanopartículas é uma excelente solução (Delgado, 2023). Além disso, estudos extensivos têm sido evidenciados sobre a apitoxina e seus constituintes, como a melitina, como potenciais agentes terapêuticos e inibidores para vários tipos de tumores. Essas investigações

revelaram múltiplos mecanismos moleculares por meio dos quais a peçonha e seus componentes exibem potenciais propriedades anticancerígenas e agentes citotóxicos com um amplo espectro de atividade contra diferentes tipos de células tumorais (Orsilic, 2012). A exploração terapêutica da peçonha depende fundamentalmente de duas etapas cruciais: primeiro, a completa caracterização de sua composição variável é essencial para identificar seus princípios ativos. Em seguida, a nanoencapsulação com a quitosana surge como solução indispensável para contornar a variabilidade e a toxicidade da peçonha, permitindo uma liberação controlada e segura dos compostos bioativos. (Jahdav, et al, 2025; Sharaf, et al, 2024). O objetivo deste estudo foi caracterizar a apitoxina in vitro, avaliando seu conteúdo enzimático e perfil hemolítico. Para isso, foram conduzidos ensaios de atividade proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica, utilizando como substratos azocaseína, gema de ovo e ácido hialurônico, respecti

Metodologia

O procedimento a seguir descreve a preparação da amostra de apitoxina, que foi utilizada nos testes de atividades enzimáticas. A amostra de apitoxina coletada foi retirada do freezer (-20 °C). Sua massa foi quantificada em uma balança analítica, em seguida, foram preparadas amostras de 1 mg/mL e de apitoxina em água miliq e foi acondicionada em freezer. Os ensaios foram realizados com as concentrações crescentes da peçonha de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL (Silva, 2025). A atividade fosfolipásica foi realizada em triplicata, avaliando o efeito da apitoxina em concentrações de 10 a 50 µg/mL. Inicialmente, uma suspensão de gema de ovo foi preparada na proporção de 1:3 em tampão fosfato-salino (PBS), utilizando 3 mL de gema para 9 mL de PBS. Em seguida, foi selecionada a solução substrato a 15% de suspensão de gema de ovo. A amostra de suspensão de gema de ovo a 15% foi incubada com concentrações crescentes de apitoxina. Para simular as condições fisiológicas, a reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora. A leitura dos resultados foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) a 925 nanômetros (Liu, et al, 2015; Marinetti, et al, 1965). Para o estudo da atividade proteolítica da apitoxina foi utilizada a azocaseína como substrato. Inicialmente, foram preparadas em tubos Eppendorf soluções com concentrações crescentes de apitoxina, variando de 10 a 50 µL, em PBS, para um volume final de 100 µL. Um controle contendo apenas PBS também foi incluído. As amostras foram pré-incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 100 µL de azocaseína a 1% foram adicionados aos tubos de teste. Para cada amostra, foi adicionado 100 µL de tampão Tris-HCl, e a reação foi incubada por 90 minutos em banho-maria. Para interromper a reação, 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) foram adicionados a todos os tubos, que foram então colocados em repouso por 30 minutos na geladeira. A seguir, os tubos foram centrifugados a 1500 g ou 10 rpm por 5 minutos a 22°C. Após a centrifugação, 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL de NaOH. A placa foi deixada em repouso por 10 minutos, e a leitura da absorbância foi realizada em um leitor de ELISA a 440 nm. A absorbância média dos controles (brancos) foi subtraída da média de cada teste para correção. A atividade proteolítica foi calculada, e os resultados foram expressos em média e desvio padrão para cada concentração de apitoxina testada (Pereanez, et al, 2014). Com relação à concentração mínima hialuronidásica (CMH) foi determinada por meio de um ensaio de turbidimetria. As amostras foram preparadas em tubos Eppendorf, e a peçonha bruta (PB) foi diluída com água Milli-Q para um volume final de 80 µL (20 µL de PB + 60 µL de água), sendo pré-incubadas a 37 °C por 30 minutos. O controle foi preparado com 20 mL de PBS e 60 mL de água Milli-Q. Em um segundo momento, foi preparado um novo conjunto de amostras com concentrações crescentes de

peçonha (10, 20, 30, 40 e 50 μL). Cada tubo continha 60 μL de solução de acetato, 10 μL de PBS, e a respectiva concentração de peçonha. Após o preparo, 80 μL de cada solução foram transferidos para poços de uma placa. Aos poços de teste foram adicionados 20 μL de ácido hialurônico, enquanto 20 μL de tampão fosfato e PBS foram adicionados aos poços de controle (branco). A placa foi incubada a 37 °C por 60 minutos em uma estufa, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 200 μL de HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) a todos os poços. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm após 10 minutos de repouso (Cavalcanti, et al, 2015). A citotoxicidade da peçonha foi analisada por meio de ensaio hemolítico com eritrócitos humanos, obtidos de doadores saudáveis mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CAAE 06999519.3.0000.5292). Neste ensaio, foi coletado 2 tubos de sangue com EDTA, centrifugado a 1500 rpm por 10 min. O plasma foi descartado e a camada celular superior. Depois, foi lavada a camada interior de eritrócitos 3 vezes em PBS da seguinte maneira: Foi ressuscitado os eritrócitos a 10% em PBS (em tubo falcon de 15mL). Foi homogeneizado levemente por inversão, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. o Sobrenadante foi descartado e repetir o processo duas vezes (até sobrenadante ficar límpido após centrifugação). Após a última lavagem, os eritrócitos foram ressuscitados a 10% em PBS, realizando assim uma suspensão de eritrócitos. Ensaio hemolítico: Em microtubos de 1,5 mL, misturar a amostra (dissolvida em PBS, em diferentes concentrações, no volume de 230 μL com suspensão de eritrócitos de 20 μL por inversão. A concentração final de eritrócitos no meio reacional $b = 0,8\%$. Foi expressada a concentração da amostra como concentração final no meio reacional final de 250 μL . Para o controle, foi misturado 230 μL de solução hipotônica (água purificada) com 20 μL de suspensão de eritrócitos. Como controle positivo de hemólise, foi misturado 230 μL de cada amostra (em cada concentração) com 20 μL de PBS. Em seguida, foi incubado a 37° C por 60 minutos. Depois, foi centrifugado a 1300 g por 3 minutos a temperatura ambiente. Depois foi lido 100 μL do sobrenadante em leitor de microplacas a 540 nm. Cada amostra, preparou-se 3 testes e 3 brancos. A porcentagem de hemólise foi calculada (Gauthier, et al, 2009).

Resultados e Discussões

A identificação e quantificação das atividades biológicas presentes na peçonha são de suma importância, uma vez que elas podem exibir propriedades tanto tóxicas quanto benéficas, dependendo do contexto e da dosagem e estão representadas na Figura 1.

Na atividade fosfolipásica, o ensaio foi realizado utilizando as concentrações da peçonha de 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura A). Obteve-se resultados satisfatórios, demonstrando uma atividade de $49,3 \pm 1,35\%$ e também não apresentou concentração dose-dependente (Figura 1A). Verifica-se forte relevância das fosfolipases no envenenamento. A fosfolipase A2 (PLA2), catalisa a hidrólise de fosfolipídios da membrana plasmática, além de desencadear respostas inflamatórias. Trata-se de um dos principais componentes imunogênicos da apitoxina, cuja toxicidade é potencializada por interação sinérgica com a melitina, o peptídeo majoritário da peçonha. A PLA2 em associação com a melitina pode danificar membranas biológicas e causar hemólise (Gealh, et al, 2024; Modanesi, et al, 2012).

Um estudo realizado por Blema, et al. (2025) a fim de verificar a ação da fosfolipase na peçonha bruta da *A. mellifera* por uma titulação potenciométrica, em triplicata, utilizando NaOH 1N, mostrou que a atividade fosfolipásica média para a peçonha de *A. mellifera* de

24,93 mEqde NaOH por mg de peçonha bruta, sendo evidente que há semelhança de resultados comparado ao estudo atual.

Apesar da fosfolipase A2 ser uma das substâncias em maior quantidade na peçonha, por volta de 12% em relação ao peso seco, possui uma atividade menor que a hialuronidase, onde esta última representa apenas de 1 a 3%. Isso pode ser explicado devido esta peçonha possuir algumas isoformas distintas dessa substância. Entre elas, existem as fosfolipases Ca²⁺ dependentes, que necessitam desse íon para sua atividade enzimática e as com potencial miotóxico que apresentam baixa atividade enzimática (Blema, et al, 2025; Orsolic, 2012).

Conforme a classificação das PLA2 dependentes de Ca²⁺, a apitoxina apresenta um espectro potencial que inclui sPLA2 dos grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV. Entretanto, evidências bibliográficas demonstram que a sua composição é majoritariamente representada por fosfolipases A2 do grupo III. Portanto, conclui-se que, devido à predominância dessa fosfolipase, a sua atividade pode variar. Fatores como a presença de cálcio potencializam sua ação, e a existência de diversas isoformas – em quantidades variáveis e estados ativos ou inativos – influencia diretamente os resultados das atividades testadas in vitro, mesmo que ela seja o segundo principal componente da peçonha da abelha. (Lee et al, 2016; Blema, et al, 2025).

Com relação a atividade proteolítica (Figura 1B), os resultados demonstraram que a apitoxina apresenta baixa atividade proteolítica sobre a azocaseína, sem relação dose-dependente, registrando $5,4 \pm 0,4$ U/mL na concentração de 10 µg. Já a atividade fosfolipásica, na mesma concentração, foi de $49,3 \pm 1,35\%$ e também não apresentou concentração dose-dependente. Em comparação com o estudo realizado por Yaacoub, (2022) foi verificado que mesmo utilizando metodologia distinta, o método de ágar-leite para o ensaio proteolítico, a conclusão foi a mesma, a peçonha apresenta uma concentração naturalmente muito baixa de proteases e peptidases.

A maior atividade observada foi a hialuronidásica, apresentando 100% nas concentrações de 20, 40 e 50 µg, mostrando que essa enzima pode estar presente em elevada concentração na peçonha (Figura 1C). Essa enzima é responsável pela hidrólise do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina presentes no tecido conjuntivo e conferindo à peçonha a característica de espalhabilidade, que favorece a difusão dos demais componentes bioativos. Ela é caracterizada por ser o alergênico mais emergente entre os componentes do veneno de abelha.

A hialuronidase compõe de 1 a 3% da apitoxina e possui massa molar em torno de 45 kDa. Essa enzima tem um caráter alergênico, além de ser facilitadora da difusão de líquidos. Está associada à hipersensibilidade e a ocorrência de reação anafilática à picada de abelha. Ela ataca os polímeros de ácido hialurônico presente no tecido conjuntivo, catalisa a hidrólise de proteínas permitindo a diminuição da viscosidade do tecido e assim a penetração do veneno para o mesmo (Orsolic, 2012).

Com isso, pode-se inferir que a alta atividade da hialuronidase, mesmo em baixa concentração na peçonha, deve-se à sua excepcional eficiência catalítica e à natureza estratégica de sua função: atuar como uma "facilitadora" que potencializa a ação enzimática. Sua capacidade de degradar rapidamente polímeros de ácido hialurônico, diminuindo a viscosidade e facilitando a entrada de outras substâncias, justifica-se porque essas quantidades são suficientes para atingir atividade máxima em ensaios. Assim, a efetividade biológica do veneno depende menos da quantidade individual de cada enzima e mais da

sinergia entre seus componentes, entre a fosfolipase A2 e melitina, por exemplo, e a ação da hialuronidase com sua ação efetiva na distribuição de toxinas (Pucca, et al, 2019).

O ensaio hemolítico foi realizado para avaliar a citotoxicidade da peçonha frente a eritrócitos humanos. O ensaio evidenciou que a apitoxina induziu hemólise significativa em todas as concentrações avaliadas (250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$), sendo superior a 80% entre 250 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1D). Demonstrando uma potente atividade hemolítica dose-dependente em nosso estudo. Foi observada uma curva de resposta característica, na qual o efeito hemolítico aumentou proporcionalmente à concentração do veneno, estabilizando-se em um platô de saturação a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Nossos resultados corroboram os achados de Frangieh (2019), utilizando a peçonha da *Apis mellifera syriaca*, demonstrou que há uma curva dose-resposta característica com a estabelecimento de um claro efeito platô na atividade hemolítica. Em nosso modelo experimental, utilizando a peçonha da *A. mellifera*, o platô foi consistentemente atingido a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$. A ligeira variação na concentração de saturação, quando comparada à literatura, pode ser atribuída a diferenças na potência específica da peçonha utilizado e/ou nas condições experimentais, como o tipo de eritrócito e o protocolo de incubação. Esta variação ressalta a importância de caracterizar a peçonha de acordo com sua origem específica para aplicações farmacológicas e toxicológicas.

Conclusão

Este estudo caracterizou com sucesso o perfil enzimático e o potente efeito hemolítico do veneno de *Apis mellifera*, confirmando sua alta atividade hialuronidásica e fosfolipásica, esta última potencializada pela ação sinérgica com a melitina. A baixa atividade proteolítica observada sugere um limitado teor de proteases na amostra analisada. O elevado potencial citotóxico, a dualidade inerente à apitoxina: um composto de grande valor biotecnológico, mas com significativos efeitos adversos que limitam sua aplicação terapêutica direta. Diante desse desafio, reforça-se a necessidade de estratégias farmacológicas adicionais para minimizar seus efeitos adversos, como o uso de nanopartículas de quitosana, um polissacarídeo biodegradável e biocompatível, como sistema de liberação direcionada, ampliando a segurança e eficácia da aplicação terapêutica da apitoxina e consolidando-a como uma promissora fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Este sistema de liberação controlada e direcionada tem o potencial de atenuar a toxicidade não específica da apitoxina, transformando um produto natural potente, mas perigoso, em uma terapia segura e eficaz. A nanotecnologia representa um avanço não apenas por abrir um caminho para o desenvolvimento de novos fármacos baseados em produtos naturais, mas também contribui para uma abordagem mais sustentável e tecnologicamente avançada na utilização de recursos da biodiversidade. Portanto, a integração da apitoxina com nanoestruturas posiciona-se na vanguarda da pesquisa que busca harmonizar inovação em saúde com a gestão responsável de recursos naturais, promovendo bem-estar e segurança no desenvolvimento de terapias futuras.

Referências

BLEMA, Matheus. Análise da composição da peçonha de *Apis mellifera* do Mato Grosso do Sul e os efeitos cinéticos da melitina na atividade da Na, K- ATPase. Mestre em Ciências, 2024. BORDON, K. al. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and

potential applications in medicine and biotechnology. DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals), 1 nov. 2015. Bordon, Karla. Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus*. Doutorado em Ciências. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2012. CAMPOS, E. et al. Fracionamento de melitina a partir da apitoxina por ultrafiltração com escoamento tangencial. Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019. CARPENA, M. et al. Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients*, v. 12, n. 11, p. 3360, 1 nov. 2020. CAVALCANTE, Joeliton S. et al. Clinical complications in envenoming by *Apis* honeybee stings: insights into mechanisms, diagnosis, and pharmacological interventions. *Frontiers in immunology*, v. 15, p. 1437413, 2024. D. Paixao-Cavalcante, ~ A.K. Kuniyoshi, F.C.V. Portaro, W.D. Silva, D.V. Tambourgi, African adders: partial characterization of snake venoms from three *Bitis* species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003419>. FRANGIEH, J. et al. First Characterization of The Venom from *Apis mellifera syriaca*, A Honeybee from The Middle East Region. *Toxins*, v. 11, n. 4, p. 191, 30 mar. 2019. FRANGIEH, Jacinthe et al. First Characterization of The Venom from *Apis mellifera syriaca*, A Honeybee from The Middle East Region. *Toxins*, v. 11, n. 4, p. 191, 30 mar. 2019. G.V. Marinetti, The action of phospholipase A on lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 98 (1965) 554–565, [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(65\)90152-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(65)90152-9). GAJSKI, G et al. Bee Venom: Composition and Anticancer Properties. *Toxins*, v. 16, n. 3, p. 117, 29 fev. 2024. GAJSKI, Goran. Bee Venom: Composition and Anticancer Properties. *Toxins*, v. 16, n. 3, p. 117, 29 fev. 2024. GAUTHIER, Charles et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 17, n. 5, p. 2002–2008, 2009. GEALH, G, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana da apitoxina de *Apis mellifera* e das suas frações obtidas por salting out. Doutorado em Engenharia Química. Curitiba, 2024. J.A. Pereanez, A.C. Patino, V. Núñez, E. Osorio, The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase A2, *Chem. Biol. Interact.* 220 (2014) 94–101, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.015>. JADHAV, Vikram et al. Bee venom loaded nanomaterials for cancer therapy: a novel approach. *Discover materials*, v. 5, n. 1, 2025. KLOTH, Marcela. Avaliação da viabilidade da extração de proteína a partir de subproduto agroindustrial. Mestrado em Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, 2021. LEE, G.; BAE, H. Bee Venom Phospholipase A2: Yesterday's Enemy Becomes Today's Friend. *Toxins*, v. 8, n. 2, p. 48, 22 fev. 2016. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Manual de doenças das abelhas. Boas Práticas aplicadas à Prevenção, controle e erradicação de doenças das abelhas direcionado ao serviço veterinário oficial. Brasília, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/ManualdeDoencasdasAbelhaswebcomprimido.pdf#page=16.99>>. MODANESI, M. Produção de apitoxina por abelhas *Apis mellifera* L. e seu efeito na expressão de genes relacionados ao estresse. 2012. PÉREZ, Delgado. Antimicrobial Activity of *Apis mellifera* Bee Venom Collected in Northern Peru. v. 12, n. 4, p. 779–779, 19 abr. 2023. PUCCA, Manuela et al. Bee updated: Current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 2090, 2019. SHARAF, Mohamed et al. Bee chitosan nanoparticles loaded with apitoxin as a novel approach to eradication of common human bacterial, fungal pathogens and treating cancer. *Frontiers in microbiology*, v. 15, p. 1345478, 2024. SILVA,

Thais. Avaliação in vitro de atividades biológicas da apitoxina coletada de *Apis mellifera* no agreste do RN. 2025. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) – Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2025. Y. Liu, et al, High-resolution hyaluronidase inhibition profiling combined with HPLC–HRMS–SPE NMR for identification of anti-necrosis constituents in Chinese plants used to treat snakebite, *Phytochemistry* 119 (2015) 62–69, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.000> ZHANG, S. Melittin exerts an antitumor effect on non-small cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 16, n. 3, p. 3581–3586, mar. 2017.

Anexos

Figura 1: Atividades fosfolipásica A), proteolítica B), hialuronidásica C) e perfil hemolítico D) da peçonha da *Apis mellifera*. Fonte: resultados experimentais.

CÓDIGO: SB0983

AUTOR: PEDRO LUCAS SOARES COSTA

ORIENTADOR: MAGNOLIA FERNANDES FLORENCIO DE ARAUJO

TÍTULO: PEIXES DO SEMIÁRIDO: NADANDO NO SECO

Resumo

A divulgação científica é ferramenta crucial para a valorização da biodiversidade e o desenvolvimento do pensamento crítico. Este trabalho visa o desenvolvimento e avaliação de uma exposição imersiva sobre o ciclo de vida de peixes do semiárido brasileiro. Utilizando tecnologias de realidade virtual, a exposição busca criar uma experiência educativa e sensorial em um espaço não escolar de ensino. A percepção de 82 participantes foi coletada por meio de um questionário que avaliou o perfil do público, recepção da proposta e seu impacto na aprendizagem. Os resultados indicam alta aceitação e eficácia pedagógica, com parte significativa dos participantes alegando ter adquirido novo aprendizado ou perspectiva.

Palavras-chave: Realidade Virtual, Tecnologias Imersivas, Parque das Ciências

TITLE: Semiarid Fish: Swimming in the Dry

Abstract

Scientific dissemination is a crucial tool for valuing biodiversity and developing critical thinking. This work aims to develop and evaluate an immersive exhibition on the life cycle of fish from the Brazilian semiarid region. Using virtual reality technologies, the exhibition seeks to create an educational and sensory experience in a non-formal educational space. The perceptions of 82 participants were collected through a questionnaire that assessed the audience's profile, their reception of the proposal, and its impact on learning. The results indicate high acceptance and pedagogical effectiveness, with a significant portion of participants stating they acquired new knowledge or a new perspective.

Keywords: Virtual Reality, Immersive Technologies, Science Park

Introdução

O incentivo a estudantes e ao público em geral à pesquisa e ao conhecimento científico favorece a ampliação de saberes e auxilia no desenvolvimento do pensamento crítico, seja no contexto da relação professores - estudantes, fundamental nos processos do ensino por investigação, ou na construção e disseminação de ideias e conhecimentos que se relacionam com o cotidiano das pessoas.

Nessa conjuntura, a divulgação científica, enquanto campo de conhecimento e estratégia de ação voltada ao processo de ensinar e aprender, ganha cada vez mais importância no mundo, funcionando como resposta intuitiva dos cientistas aos movimentos anticiência (cada vez mais presentes na atualidade). Ela colabora, de maneira especial, para a discussão e compreensão dos interesses políticos e econômicos relacionados ao questionamento das

evidências científicas (Mansur et al., 2021).

Assim, a divulgação científica é parte da democratização do conhecimento científico, trazendo em seu conjunto a reiteração das práticas científicas, legitimando e reforçando o perfil ideológico da Ciência (Gonzalez, 1992). Isso deixa claro que ações de divulgação da Ciência têm sido a motivação de pesquisadores das mais diferentes áreas, além de estarem constantemente nas pautas de discussão de governos internacionais, nacionais e regionais, de instituições de ensino e centros de pesquisa das diversas áreas do conhecimento.

Os peixes representam um dos grupos de vertebrados mais diversos e com maior relevância no que se refere à relação entre a humanidade e a natureza (Rosa; Lima, 2008). Tal dado está relacionado diretamente com o fato de o Brasil fazer parte da região Neotropical, considerada a mais rica e diversa do mundo para grupos animais (Marques; Lamas, 2006), o que inclui a fauna ictiológica. Oliveira e Bemvenuti (2006) reforçam a riqueza e variedade da fauna ictiológica brasileira, ao destacarem sua importância para as populações humanas, visto ser responsável pelo fornecimento de alimento e meio de subsistência para milhões de pessoas. Diante de tamanha importância, estudos de natureza diversas somam esforços para entender, descobrir e divulgar a diversidade e complexidade faunística do grupo, fazendo uso de mecanismos modernos como a citogenética, que constitui uma ferramenta poderosa e indispensável na caracterização da biodiversidade ainda oculta da ictiofauna (Cioffi et al., 2018).

É perceptível, com isso, a necessidade de estimular, no ensino de ciências, o entendimento claro sobre as Classes de Vertebrados - neste caso destacado os Peixes -, com especial atenção para espécies características da região onde se encontram. Isso pode estimular o interesse no processo de ensino e aprendizagem e estimular a formação de novos cientistas na área (Formigosa et al., 2017). Como fator favorável, é oportuno destacar que o grupo zoológico dos peixes permite uma abordagem interdisciplinar, visto se relacionar diretamente com outros grupos animais, incluindo a espécie humana, além de exercer forte influência na ecologia, economia e modo de vida de diversas comunidades. Assim, a valorização do conhecimento empírico dos estudantes correlacionado com os conhecimentos de pesquisas científicas, se mostra uma forte estratégia pedagógica a ser utilizada pelos professores (Silva; Silva, 2020) e em espaços não escolares de ensino, como museus ou centros de ciências. Nesse contexto, pensar em estratégias, possibilidades e perspectivas que estreitam a relação entre a comunidade acadêmica e a população em geral, significa refletir sobre a influência que a pesquisa científica exerce na vida das pessoas, podendo influenciar positivamente as relações socioambientais.

A tecnologia da realidade virtual consiste na imersão em realidades diversas, sejam elas possíveis ou fictícias, sendo considerada um ponto chave de aproximação com o público, uma vez que as inúmeras possibilidades reproduzem o efeito inesperado e surpreendente durante a experiência imersiva.

Metodologia

A exposição combina elementos do design, modelagem 3D e demais ferramentas digitais utilizadas para criar uma vivência verdadeiramente imersiva. Ao visitar a sala projetada, o usuário é transportado para um mundo virtual dentro da exposição projetada, sobre o qual poderá se mover livremente, interagindo com a proposta visual sobre os peixes de forma mais próxima e pessoal e experimentando a ampliação dos conhecimentos oferecidos, com a sensação de estar presente fisicamente no ambiente projetado na exposição.

As exposições interativas compreendem uma maneira moderna de promover conhecimento e

a acepção de conceitos e ideias para o público que as visitam. Elas permitem uma participação ativa das pessoas, na medida em que elas podem interagir com as exibições, sentindo-se protagonistas naquele momento, o que gera uma experiência memorável e educacionalmente construtiva. Exposições interativas e imersivas reconhecidamente geram maior engajamento, entusiasmo e aquisição de conhecimentos, a partir da ludicidade e da experimentação sensorial.

A divulgação científica pode ser relacionada à educação formal na medida em que colabora com a alfabetização científica da sociedade, contribuindo para a formação em ciências e tecnologias do público estudantil e geral. Espaços de educação não escolar como museus e centros de ciências são fundamentais nesse sentido, desde que apresentem temáticas de interesse em um formato que cativa o público. A necessária crítica à tecnologia e ao modo como ela impacta o ambiente nas sociedades atuais podem ser o foco de discussão nessas exposições, auxiliando os professores com alternativas fora da sala de aula que mantenham seus estudantes motivados para a aprendizagem de conceitos que culminem em atitudes positivas para a sociedade como a de conservação da biodiversidade e a sustentabilidade em vários aspectos.

O instrumento de avaliação utilizado foi um formulário anônimo feito através da plataforma do google forms. O formulário foi composto por 10 perguntas fechadas que contemplaram faixa etária, gênero, escolaridade, conhecimento adquirido sobre o tema e os impactos e aprendizagens adquiridos através da exposição imersiva, além disso, havia também uma seção de comentários para sugestões e/ou elogios.

Resultados e Discussões

Essa seção se dedicará à apresentação e análise dos dados referentes a esta pesquisa, os quais foram coletados por meio de um questionário de opinião aplicado aos visitantes da exposição imersiva sobre o ciclo de vida dos peixes do semiárido, foram coletadas ao total 82 respostas que visam compreender o perfil do público, a recepção da experiência e o seu impacto educacional

A análise inicial das 82 respostas revela um grupo predominantemente do gênero feminino que compôs 58,5% da amostra, enquanto o grupo masculino correspondeu a 39%. Em relação ao nível de escolaridade, os dados mostram que maior parte do público possui pós graduação (especialização, mestrado ou doutorado) com 43,9% compondo este grupo, enquanto que 25,6% possuem o ensino superior e 24,4 estão cursando o ensino superior, somados mais de 93% dos participantes tem ou estão em processo de obter formação acadêmica superior.

A avaliação geral da experiência imersiva foi notavelmente positiva. Ao serem questionados sobre a impressão geral, 92% participantes a classificaram como positiva (36,6%) ou muito positiva (56,1%). Esse alto índice de satisfação mostra que o uso de tecnologias imersivas, como a realidade virtual e a holografia, funcionaram como uma estratégia eficaz para gerar engajamento no tema e se tornar uma experiência memorável, o que corrobora diretamente com o que a literatura aponta sobre exposições interativas para cativar o público.

Conforme os dados indicam, a exposição também obteve sucesso em comunicar os temas centrais envolvidos, a grande maioria dos visitantes (80,5%) conseguiu perceber que o ambiente representava o semiárido. Somando-se as respostas ‘concordo totalmente’ (62,2%)

e ‘concordo parcialmente’ (18,3%). A clareza sobre o ciclo de vida dos peixes também foi avaliada de forma similar com 79,3% dos participantes concordando totalmente (54,9%) ou parcialmente (24,4%) que a representação foi clara.

Ainda no espectro do entendimento da exposição imersiva, alguns pontos, embora com índice de concordância ainda alto em relação ao entendimento sobre o que estava sendo visto, mostraram uma leve queda. Esses pontos abrangem eventos como desova, desenvolvimento e mortandade dos peixes causada pela seca, houve 43,9% de concordância total e 29,3% de concordância parcial sobre a clareza do que estava sendo visto, enquanto que 18,3% do público indicou que discorda parcial ou totalmente da clareza das informações. Isso indica que, apesar do contexto geral ser entendido, detalhes visuais mais específicos como a desova dos peixes podem passar despercebidos por uma parte do público, indicando que talvez haja a necessidade de refinamento dos elementos ou algum tipo de apoio para tornar a exposição mais intuitiva para todos.

Abrangendo o espectro de impacto na aprendizagem, um dos principais objetivos da divulgação científica é e sempre será a promoção da aprendizagem, nesse quesito a exposição demonstrou impacto significativo para os participantes. Um total de 84,1% dos participantes revelou que aprenderam algo novo ou obtiveram uma nova perspectiva do que estava sendo mostrado, com 56,1% concordando totalmente e 28% concordando parcialmente. Esse resultado positivo é reforçado pela percepção da compreensão do ecossistema representado na exposição, 78% consideraram que a exposição impactou sua compreensão sobre o semiárido e a vida dos peixes, sendo 54%, de concordância total e 23,2% de parcial. Esses dados reforçam o papel de espaços não escolares de ensino como ferramentas eficazes e indispensáveis para a alfabetização científica, e neles, o uso de tecnologias imersivas se torna um recurso que colabora com a aprendizagem de conceitos. .

Outro ponto que também merece destaque é a identificação das espécies de peixes, cerca de 73,2% dos visitantes conseguiram identificar ‘algumas’ (37,8) ou ‘várias’ (35,4) das espécies apresentadas, porém um grupo relevante de 14,6 afirmou não ter conseguido identificar espécies. Esse dado quantitativo dialoga diretamente com alguns dados qualitativos: dos 32 comentários acerca da exposição, um deles destaca: : “Vi no final que tinham alguns peixes e seus nomes, mas não estava bem visível. Seria legal de melhorar até pensando em quem tem baixa visão e visitaria o museu”. O visitante, aqui, aponta uma necessidade de melhora na acessibilidade e na disposição das informações que ajudariam diretamente na identificação das espécies.

Apesar de existir um contexto introdutório na porta de entrada da exposição indicando ambientes típicos do semiárido como rios temporários e açudes, alguns visitantes apontaram na seção de comentários que pode ser um contexto em que moradores de outras regiões do Brasil e de outros países podem não entender completamente devido a falta de conhecimento prévio acerca destes ecossistemas. Essa informação é de grande importância pois mesmo havendo contexto introdutório antes de entrar na sala algumas pessoas não identificam de primeira o que há ali, indicando a necessidade de incentivar a leitura do contexto prévio na porta da sala ou de uma explicação após visualização da exposição. Possivelmente, esse deslize para a leitura de apresentação na entrada da exposição, a despeito da beleza do painel que deveria chamar a atenção, indique que a mediação da exposição deva pedir que os visitantes leiam ou ela mesma deve ler com eles, essa introdução.

Em suma, os resultados demonstram sucesso da exposição imersiva em criar uma experiência educativa significativa, positiva e marcante para o público. As tecnologias usadas foram

eficientes na representação do ecossistema e na promoção da aprendizagem. A discussão evidencia pontos específicos para aprimoramento da exposição, especialmente em relação a informações visuais mais detalhadas como identificação das espécies e desova dos peixes, mas ao mesmo tempo comprova que os participantes da pesquisa conseguiram compreender o que estava sendo observado, desde o local, espécies, desova, e períodos de cheia e de seca.

Conclusão

O presente trabalho se propôs a desenvolver e avaliar o potencial de uma exposição imersiva como ferramenta de divulgação científica em um contexto não escolar de ensino, com o objetivo central de investigar se a aplicação dessas tecnologias de realidade aumentada poderia engajar o público e promover aprendizagem significativa sobre os peixes do semiárido, contribuindo para a democratização do conhecimento científico e valorização da biodiversidade regional.

Os resultados obtidos a partir das 82 respostas coletadas evidenciaram que a abordagem foi bem sucedida, sendo a maioria das respostas positivas ou muito positivas. Observa-se que a exposição não foi apenas utilizada como entretenimento pelos visitantes, mas também como ferramenta de aprendizagem, de forma que foram obtidos também dados positivos em relação à compreensão do ecossistema ali abordado como mostram os dados de 84% sentiram ter aprendido algo novo e 78% tiveram a compreensão sobre o ecossistema impactada positivamente.

Conclui-se que a união entre pesquisa científica, arte e tecnologia demonstraram ser um caminho promissor para a divulgação científica, tendo o projeto conseguido cumprir o seu papel de levar conhecimento acadêmico específico para a sociedade de forma clara e memorável. A experiência reafirma o potencial de exposições interativas como pontes entre a ciência e o cidadão, construindo o pensamento crítico e a conscientização ambiental.

Referências

MANSUR, V.; GUIMARÃES, C.; CARVALHO, M. S.; LIMA, L. D.; COELI, C. M. Da publicação acadêmica à divulgação científica. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, p. e00140821, 2021

OLIVEIRA, A. F.; BEMVENUTI, M. A. 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.

ROSA, R.; LIMA, F. Peixes: Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. *Livro Vermelho Da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. MMA, Brasília, p. 285, 2008.

SILVA, K. V. W. de S.; SILVA, L. A. de M. Sequência didática para o estudo de peixes em turmas de ensino médio. *Experiências em Ensino de Ciências*, v. 15, n. 02, p. 678-706, 2020.

FORMIGOSA, A. da S. et al. Intervenção no ensino-aprendizagem e elaboração de um material didático em Zoologia com ênfase em peixes para alunos do Ensino Fundamental,

Santana/AP. Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota), v. 7, n. 4, p. 48-54, 2017.

CIOFFI, M. B.; et al. Conventional Cytogenetic Approaches-Useful and Indispensable Tools in Discovering Fish Biodiversity. Current Genetic Medicine Reports, p. 176-186, 2018.

MARQUES, A. C.; LAMAS, C. J. E. Taxonomia zoológica no Brasil: estado da arte, expectativas e sugestões de ações futuras. Papéis Avulsos de Zoologia, v. 46, p. 139-174, 2006.

CÓDIGO: SB1007

AUTOR: SUAMY BEATRIZ DA SILVA OTAVIANO

COAUTOR: MARIA CLARA CANUTO DA COSTA

COAUTOR: ANA LUIZA FERREIRA DE ARAUJO

COAUTOR: HADASSA LOUYSE DANTAS MARQUES

ORIENTADOR: DANIELLA REGINA ARANTES MARTINS SALHA

TÍTULO: MODULAÇÃO DA FERROPTOSE EM GESTANTES: Aspectos Clínicos e Futuro da Farmacologia.

Resumo

A ferroptose, uma forma de morte celular dependente de ferro e estresse oxidativo, está associada ao diabetes mellitus gestacional (DMG), afetando a integridade placentária. O acúmulo de ferro e a peroxidação lipídica comprometem células materno-fetais, sugerindo a necessidade de modulação dessa via para prevenção e tratamento do DMG. Compostos naturais como 1,8-cineol, ácido rosmarínico, curcumina e gengibre exibem propriedades antioxidantes e quelantes de ferro, reduzindo o estresse oxidativo e a resistência à insulina. Farmacologicamente, vitamina C, N-acetilcisteína e melatonina mostram potencial para prevenir ferroptose e proteger a região uterina. A modulação da ferroptose surge como uma abordagem promissora para melhorar a saúde materno-fetal em gestações complicadas pelo DMG.

Palavras-chave: ferroptose. diabetes gestacional. estresse oxidativo. modulação.

TITLE: Ferroptosis Modulation in Pregnancy: Clinical Aspects and Future Perspectives in Pharmacology

Abstract

Ferroptosis, a form of cell death dependent on iron and oxidative stress, is associated with gestational diabetes mellitus (GDM), affecting placental integrity. Iron accumulation and lipid peroxidation compromise maternal–fetal cells, suggesting the need for modulation of this pathway for the prevention and treatment of GDM. Natural compounds such as 1,8-cineole, rosmarinic acid, curcumin, ginger, and vitamin E exhibit antioxidant and iron-chelating properties, reducing oxidative stress and insulin resistance. Pharmacologically, vitamin C, N-acetylcysteine, and melatonin show potential to prevent ferroptosis and protect the uterine region and placenta. Modulating ferroptosis emerges as a promising approach to improve maternal–fetal health in pregnancies complicated by GDM.

Keywords: ferroptosis. gestational diabetes. oxidative stress. modulation.

Introdução

A ferroptose é uma forma distinta de morte celular regulada, caracterizada pela dependência de ferro e peroxidação lipídica excessiva. Diferente da apoptose e outras formas clássicas, não depende de caspases, mas de disfunção na homeostase redox, com acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos a membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados¹. Esse processo pode ser iniciado pelo excesso de ferro intracelular, que promove formação de radicais livres e ativa enzimas como as lipoxigenases (LOXs), catalisadoras da peroxidação lipídica. A regulação inadequada desses mecanismos contribui para o estresse oxidativo e a inflamação, centrais em diversas doenças humanas². Na gestação, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é ainda mais sensível, exigindo regulação precisa para o desenvolvimento fetal adequado. Em condições normais, o ferro é essencial para o transporte de oxigênio, síntese de DNA e respiração mitocondrial. Porém, em excesso ou em estados de regulação alterada, torna-se um fator de risco para processos mediados pela ferroptose, intensificando o estresse oxidativo e a inflamação sistêmica³.

Nesse contexto, destaca-se o diabetes mellitus gestacional (DMG), uma das complicações metabólicas mais comuns da gravidez. O DMG é caracterizado por hiperglicemia, geralmente associada à resistência à insulina⁴. Estudos recentes sugerem que o estado do ferro materno tem papel importante em seu desenvolvimento. Níveis elevados de ferritina sérica – marcador indireto de ferro intracelular – foram associados a maior risco da doença. A sobrecarga de ferro pode induzir estresse oxidativo nas células beta pancreáticas, altamente vulneráveis, favorecendo sua disfunção e a perda progressiva da capacidade de secreção de insulina. Assim, a ferroptose pode representar um elo mecanístico entre metabolismo do ferro e fisiopatologia do DMG³. Além disso, gestantes com ou sem DMG podem apresentar inflamação subclínica e alterações redox que favorecem a ferroptose em tecidos maternos ou fetoplacentários⁵. Isso levanta preocupações quanto ao papel dessa via de morte celular em desfechos obstétricos como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento fetal e parto prematuro, além do próprio DMG, e sugere novas possibilidades terapêuticas⁶.

A modulação farmacológica da ferroptose tem ganhado destaque. Compostos que inibem a peroxidação lipídica, como antioxidantes lipofílicos (ferrostatina-1, lipoxstatina-1), ou que reduzem o ferro lábil intracelular, como quelantes (ex.: deferoxamina), mostraram potencial em modelos experimentais⁷. Produtos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias – como ácido rosmarínico e curcumina – também demonstraram capacidade de inibir a ferroptose por diferentes vias, bloqueando ROS ou preservando enzimas protetoras como a GSH-PX^{8,9}. A compreensão desses moduladores pode abrir caminho para intervenções eficazes e seguras durante a gestação, visando mitigar os efeitos do estresse oxidativo e da ferroptose em contextos como o DMG. Entender os mecanismos da ferroptose e suas interações com o ferro, o estresse oxidativo e a inflamação é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, especialmente em condições gestacionais. A abordagem farmacológica, aliada ao uso racional de produtos naturais, representa um campo promissor para melhorar os desfechos materno-fetais.

Metodologia

3.1 Levantamento Bibliográfico

Foi realizado um levantamento bibliográfico sistematizado com o objetivo de reunir evidências científicas recentes sobre o papel da ferroptose em gestantes, especialmente na presença de diabetes mellitus gestacional (DMG), e sobre as estratégias farmacológicas e

naturais capazes de modular essa via. A busca foi conduzida nas bases de dados científicas PubMed, Scopus e LILACS, utilizando como descritores e palavras-chave os seguintes termos: ferroptosis, pregnancy, gestational diabetes, oxidative stress, pharmacological modulation.

Para garantir a atualidade e relevância dos achados, foram aplicados filtros para limitar os resultados nos últimos 7 anos.

3.2 Análise Crítica

Após a etapa de busca, foi realizada uma análise crítica dos artigos encontrados, com base em critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. Os critérios de inclusão foram: estudos que abordassem a ferroptose em contexto gestacional, especialmente em pacientes com DMG; artigos que discutissem o estresse oxidativo e inflamação relacionados à ferroptose; e publicações que apresentassem resultados sobre modulação farmacológica ou por produtos naturais no estresse oxidativo. Os critérios de exclusão incluíram: artigos duplicados, estudos realizados unicamente in vitro e revisões narrativas.

Os dados extraídos dos artigos selecionados foram organizados em tabelas, agrupando as informações sobre os medicamentos ou compostos naturais utilizados que podem atuar na modulação dos mecanismos de ação envolvidos na ferroptose e no estresse oxidativo em gestantes, especialmente com DMG. Essa estruturação permitiu uma análise comparativa entre os diferentes estudos, destacando padrões, lacunas no conhecimento e possíveis aplicações clínicas.

Resultados e Discussões

A ferroptose tem sido amplamente investigada, e estudos recentes indicam que essa forma de morte celular pode estar intimamente relacionada ao desenvolvimento do DMG⁵. Já foi evidenciado que os principais fatores associados à ferroptose são o estresse oxidativo e o acúmulo excessivo de ferro, que provocam danos às membranas celulares por meio da peroxidação lipídica². Dessa forma, torna-se evidente que estratégias capazes de modular esses mecanismos podem oferecer novas abordagens terapêuticas. Portanto, uma medida promissora para prevenir os efeitos deletérios dessa via é o uso racional de fármacos e substâncias naturais que inibam o processo oxidativo, por meio da proteção de enzimas antioxidantes, regulação dos níveis intracelulares de ferro e eliminação de radicais livres⁷. A seguir, discutem-se os compostos analisados e seus impactos sobre o estresse oxidativo e a ferroptose em modelos associados à DMG.

Produtos Naturais com Potencial Antiferroptótico

Diversos compostos vêm demonstrando capacidade de modular mecanismos associados à ferroptose, principalmente através da atividade antioxidante e da quelagem de ferro⁷. O 1,8-cineol (eucaliptol), presente tanto no óleo essencial quanto nas folhas de eucalipto, mostrou-se eficaz na redução do estresse oxidativo e da resistência à insulina em modelos de diabetes⁸, sugerindo possível aplicação na proteção celular durante a gestação. O ácido rosmarínico, abundante no alecrim, atua como quelante de ferro e eliminador de radicais livres⁹, sendo especialmente relevante em contextos de sobrecarga férrica durante a gravidez.

A curcumina, extraída da cúrcuma, apresentou efeitos positivos na melhora da resistência à insulina e no aumento da atividade da glutathione peroxidase^{10,11}, enquanto os compostos ativos do gengibre (gingerol, zingerona e paradol) mostraram capacidade de aumentar os níveis de GSH e reduzir a peroxidação lipídica¹² além de promover melhora para os quadros de náusea gravídica¹³. Já o óleo de cártamo, fonte de vitamina E, promoveu ação antioxidante significativa, além de atuar na modulação do ferro intracelular e na proteção contra a resistência à insulina^{14,15}.

Fármacos com Potencial Antiferroptótico e Antioxidante

Entre os fármacos analisados, o ácido ascórbico (vitamina C) demonstrou eficácia em modelos de lesão hepática ao prevenir a ferroptose por meio da modulação da via SLC7A11/GPX4. Durante a gravidez, esse composto ainda favorece a reparação de tecidos epiteliais e contribui para a saúde óssea materno-fetal^{16,17}.

A N-acetilcisteína (NAC), um composto tiólico, demonstrou importante ação antiferroptótica dose-dependente em modelos animais com alterações reprodutivas semelhantes à síndrome dos ovários policísticos. A NAC repôs os níveis de glutathione reduzida (GSH), inibiu a peroxidação lipídica e normalizou a expressão de genes relacionados à receptividade uterina e diferenciação celular placentária, sugerindo grande potencial terapêutico em casos de DMG associados ao fenótipo HAIR (hiperandrogenismo, resistência à insulina e obesidade) e Ferroptose¹⁸.

O α -tocoferol (vitamina E) demonstrou prevenir o dano oxidativo em tecidos placentários expostos ao agente oxidante TBH, mantendo a integridade funcional da vascularização trofoblástica¹⁹. A melatonina, por sua vez, atua continuamente na eliminação de radicais livres na placenta, sendo considerada essencial para manter a integridade placentária e possivelmente eficaz na prevenção de complicações gestacionais induzidas pelo estresse oxidativo²⁰.

Integração dos Efeitos e Perspectivas Terapêuticas

Em geral, os compostos avaliados apresentam ações convergentes que incluem a reposição de glutathione reduzida, a ativação de enzimas antioxidantes (GPX4, GSH-PX), a inibição da peroxidação lipídica e a modulação do ferro intracelular. Tais ações contribuem para a proteção contra a ferroptose, restaurando a homeostase redox e a função celular nos tecidos uteroplacentários.

Essas evidências sugerem que tanto substâncias naturais quanto agentes farmacológicos podem representar alternativas viáveis na modulação da ferroptose em gestantes com DMG, especialmente se aplicadas de maneira preventiva ou como adjuvantes no manejo de comorbidades. Contudo, grande parte dos estudos disponíveis ainda se encontra em estágios pré-clínicos, utilizando modelos animais ou análises in vitro. Estudos em modelos humanos ainda são escassos, o que limita a generalização dos achados para a prática clínica.

Portanto, há uma necessidade urgente de mais investigações clínicas robustas para avaliar a eficácia, segurança e aplicabilidade terapêutica desses compostos em gestantes. A caracterização precisa das vias moleculares envolvidas na ferroptose durante a gestação e sua relação com o DMG pode abrir caminho para novas estratégias terapêuticas personalizadas e mais seguras.

Dessa forma, este trabalho reforça a importância de integrar abordagens farmacológicas e naturais na prevenção e tratamento de complicações gestacionais, destacando o potencial translacional dos compostos analisados. No entanto, apenas com o avanço de estudos clínicos controlados será possível consolidar essas estratégias no contexto da prática obstétrica.

Conclusão

A ferroptose, caracterizada pelo acúmulo de ferro e pela peroxidação lipídica dependente de radicais livres, tem emergido como um mecanismo central na fisiopatologia do DMG. Neste trabalho, foi possível observar que diversos fármacos e compostos naturais apresentam algum potencial terapêutico ao atuarem como moduladores da ferroptose, principalmente por meio da atenuação do estresse oxidativo, da reposição de glutathione reduzida (GSH), da ativação de enzimas antioxidantes (como GPX4), da inibição da peroxidação lipídica e do controle da homeostase férrica.

Entre os produtos naturais, destacaram-se o 1,8-cineol, o ácido rosmarínico, a curcumina, os compostos ativos do gengibre, o óleo de cártamo e a melatonina. Esses compostos demonstraram capacidade antioxidante significativa, atuando em diferentes alvos celulares relevantes para a prevenção da ferroptose e para a melhora da resistência à insulina, um dos principais fatores associados ao DMG.

Do ponto de vista farmacológico, a N-acetilcisteína (NAC), o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) mostraram efeitos protetores importantes em modelos experimentais. A NAC, em especial, apresentou resultados promissores em modelos com fenótipos HAIR, sugerindo um papel direto na regulação epigenética e funcional da placenta em condições de estresse oxidativo.

Embora os dados disponíveis sejam encorajadores, grande parte das evidências ainda provém de estudos pré-clínicos. A extrapolação desses achados para a clínica requer cautela, visto que os modelos experimentais não reproduzem completamente a complexidade da gestação humana. Além disso, ainda são escassos os ensaios clínicos que avaliem de forma sistemática a eficácia e segurança desses compostos em gestantes com DMG.

Dessa forma, os resultados apresentados reforçam a relevância de explorar intervenções antioxidantes como estratégia adjuvante para prevenir complicações gestacionais associadas à ferroptose. Contudo, é imprescindível a realização de estudos clínicos bem delineados que envolvam biomarcadores específicos, avaliação longitudinal das gestantes e desfechos materno-fetais. Apenas com essa base será possível validar o potencial translacional dos agentes analisados e incorporá-los de maneira segura e eficaz na prática obstétrica.

Referências

1. **JIANG, X.; STOCKWELL, B. R.; CONRAD, M.** Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 22, n. 4, p. 266-282, abr. 2021.
2. **TANG, D. et al.** Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*, v. 31, n. 2, p. 107-125, fev. 2021.

3. **ZHANG, Y.; LU, Y.; JIN, L.** Iron metabolism and ferroptosis in physiological and pathological pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 16, p. 9395, 20 ago. 2022.
4. **MACK, L. R.; TOMICH, P. G.** Gestational diabetes: diagnosis, classification, and clinical care. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, v. 44, n. 2, p. 207-217, jun. 2017
5. **ZHAO, Y. et al.** Ferroptosis and its potential role in gestational diabetes mellitus: updated evidence from pathogenesis to therapy. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, v. 14, p. 1177547, 18 ago. 2023.
6. **AMERICAN DIABETES ASSOCIATION.** Standards of care in diabetes—2024. *Diabetes Care*, v. 47, supl. 1, p. S1–S291, 2024.
7. **CHEN, F. et al.** **Ferroptosis**: principles and significance in health and disease. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 17, n. 1, p. 41, 6 jun. 2024.
8. **LIU, Z. et al.** 1,8-Cineole ameliorates diabetic retinopathy by inhibiting retinal pigment epithelium ferroptosis via PPAR- γ /TXNIP pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 164, p. 114978, ago. 2023.
9. **NIETO, G.; ROS, G.; CASTILLO, J.** Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): a review. *Medicines (Basel)*, v. 5, n. 3, p. 98, 4 set. 2018.
10. **LIN, X. et al.** Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS ONE*, v. 14, n. 5, p. e0216711, 21 maio 2019.
11. **TOSSETTA, G. et al.** The multifaced actions of curcumin in pregnancy outcome. *Antioxidants (Basel)*, v. 10, n. 1, p. 126, 17 jan. 2021.
12. **AYUSTANINGWARNO, F. et al.** A critical review of Ginger's (*Zingiber officinale*) antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities. v. 11, p. 1364836, 6 jun. 2024.
13. **HU, Y. et al.** Effect of ginger in the treatment of nausea and vomiting compared with vitamin B6 and placebo during pregnancy: a meta-analysis. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 35, n. 1, p. 187-196, jan. 2022.
14. **RUYVARAN, M. et al.** Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil could improve abdominal obesity, blood pressure, and insulin resistance in patients with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 282, p. 114590, 10 jan. 2022.
15. **LIN, D. et al.** Chemical structures and antioxidant activities of polysaccharides from *Carthamus tinctorius* L. *Polymers (Basel)*, v. 14, n. 17, p. 3510, 26 ago. 2022.
16. **SUN, G. et al.** Metabolomics reveals ascorbic acid inhibits ferroptosis in hepatocytes and boosts the effectiveness of anti-PD1 immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell International*, v. 24, n. 1, p. 192, 31 maio 2024.

17. **PODOLSKA, K. et al.** Ascorbic acid intake during pregnancy. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic, v. 167, n. 3, p. 213-218, set. 2023.
18. **HU, M. et al.** Suppression of uterine and placental ferroptosis by N-acetylcysteine in a rat model of polycystic ovary syndrome. Molecular Human Reproduction, v. 27, n. 12, p. gaab067, 27 nov. 2021.
19. **PINTO-RIBEIRO, L. et al.** α -tocopherol prevents oxidative stress-induced proliferative dysfunction in first-trimester human placental (HTR-8/SVneo) cells. Reproductive Biology, v. 22, n. 1, p. 100602, mar. 2022.
20. **JOSEPH, T. T. et al.** Melatonin: the placental antioxidant and anti-inflammatory. Frontiers in Immunology, v. 15, p. 1339304, 1 fev. 2024.

Anexos

Tabela 1: compostos naturais com potencial de modulação da ferroptose 1

Tabela 1: compostos naturais com potencial de modulação da ferroptose 2

Tabela 2: fármacos com potencial de modulação da ferroptose 1

Tabela 2: fármacos com potencial de modulação da ferroptose 2

CÓDIGO: SB1013

AUTOR: MARIA EDUARDA GALVAO FERNANDES

ORIENTADOR: JOSELIO MARIA GALVAO DE ARAUJO

TÍTULO: Identificação dos arbovírus circulantes no Estado do Rio Grande do Norte.

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. Esses dados permitem conhecer melhor as áreas de introdução e dispersão viral e auxiliam no planejamento de ações de combate à dengue.

Palavras-chave: Dengue e Rio Grande do Norte

TITLE: Identification of circulating arboviruses in the State of Rio Grande do Norte.

Abstract

Dengue is a reemerging infectious disease in Brazil, where it has persisted for approximately four decades. In both Brazil and the state of Rio Grande do Norte (RN), arboviruses continue to exert a substantial impact on public health and remain a major concern for health authorities. The present study investigated the epidemiological profile of circulating arboviruses in RN and conducted a phylogenetic analysis of a newly identified lineage of Dengue Virus Type 2 (DENV-2) in 2025. Phylogeographic reconstruction revealed that this novel lineage of the Cosmopolitan genotype of DENV-2, detected in Rio Grande do Norte, most likely originated in the city of Limpio, Paraguay. From Paraguay, the virus disseminated to São Paulo (specifically to the municipalities of Guarulhos and Piracicaba) before being detected in Tibau do Sul, Rio Grande do Norte. These findings enhance the understanding of viral introduction and dispersal pathways and provide critical insights for the development and implementation of dengue control strategies.

Keywords: Dengue and 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. 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.

Metodologia

O estudo da situação epidemiológica dos arbovírus circulantes no estado do Rio Grande do Norte foi possível a partir da análise dos boletins epidemiológicos disponíveis no site da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Norte. 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. 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.

Resultados e Discussões

Análise da situação epidemiológica dos arbovírus circulantes no Rio Grande do Norte, anos 2024 e 2025 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. 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. 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. Quadro 1. Este quadro apresenta a qualidade do ajuste para modelos de substituição múltipla, incluindo suas estimativas de parâmetros. As pontuações do Critério de Informação Bayesiano (BIC) e o Critério de Informação de Akaike (AICc) são utilizadas para a escolha do melhor modelo. Figura 1. Análise evolutiva pelo método da Máxima Verossimilhança. A filogenia foi inferida utilizando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) de substituições de nucleotídeos, e a árvore com o maior logaritmo de verossimilhança (-6.855.47) é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam (1.000 replicações) é mostrada ao lado dos ramos (Felsenstein,1985). As diferenças na taxa evolutiva entre os sítios foram modeladas usando uma distribuição gama discreta em 5 categorias (+G, parâmetro = 1,2853), com 51,78% dos sítios considerados evolutivamente invariantes (+I). O procedimento analítico abrangeu 116 sequências de nucleotídeos codificadores usando 1ª, 2ª, 3ª e posições não codificadoras, com 1485 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA12 (Kumar et al. 2024), utilizando até 3 threads de computação paralela. 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, Paraguai. 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. Figura 2. Origem e dispersão do genótipo Cosmopolita do DENV-2 identificado no estado do Rio Grande do Norte no ano de 2025.

Conclusão

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 (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.

Referências

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791. 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. Samir Bhatt, Gething W, Brady J, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):504-7. 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. 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. 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

Quadro 1.

Figura 1.

Figura 2.

CÓDIGO: SB1022

AUTOR: GUILHERME SOUZA SITKAUSKAS

ORIENTADOR: MIRIAM PLAZA PINTO

TÍTULO: Variação temporal na disponibilidade de recursos vegetais em habitats do Bugio-Mãos-Ruiva (*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, Paraíba, um fragmento de floresta cercado por monoculturas de cana-de-açúcar, o estudo monitorou mensalmente (fevereiro a junho) 154 indivíduos arbóreos com DAP ≥ 10 cm em nove parcelas. Foram registradas presença e intensidade de folhas (novas e maduras), floração e frutificação, utilizando o índice de Fournier. A análise focou em espécies da dieta de *A. belzebul*. Os resultados parciais mostraram que a emissão de folhas novas atingiu o pico em fevereiro e março, enquanto folhas maduras mantiveram-se constantes. A floração teve seu auge em fevereiro e a frutificação em abril, seguindo a floração. Espécies como *Didymopanax morototoni* e *Tapirira guianensis* 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. Fragmentação. *Alouatta belzebul*.
Conservação

TITLE: Temporal variation in the availability of plant resources in habitats of the Red-handed Howler Monkey (*Alouatta belzebul*)

Abstract

This scientific initiation report investigated the phenology of arboreal vegetation in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil, specifically in the Pernambuco Endemism Center (PEC), a highly fragmented region. The study aimed to understand the availability of resources for the red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a Neotropical primate classified as Vulnerable. Conducted at the Gargaú Private Natural Heritage Reserve (RPPN), Paraíba, a forest fragment surrounded by sugarcane monocultures, the study monitored 154 tree individuals (DBH ≥ 10 cm) across nine plots on a monthly basis (February to June). The presence and intensity of leaves (new and mature), flowering, and fruiting were recorded using the Fournier index. The analysis focused on species included in the diet of *A. belzebul*.

Partial results showed that leaf flushing peaked in February and March, while mature leaves remained constant throughout the period. Flowering peaked in February, followed by fruiting in April. Species such as *Didymopanax morototoni* and *Tapirira guianensis* were recorded. These findings are crucial for understanding ecological strategies in fragmented environments and for assessing the availability of resources for *A. belzebul*, contributing to the conservation of native flora in the PEC.

Keywords: Phenology. Atlantic Forest. Fragmentation. *Alouatta belzebul*. Conservation

Introdução

Devido ao aumento da exploração de recursos naturais e atividades pecuárias de grandes empresas, grande parte da Mata Atlântica foi desmatada (Gelain et al. 2012). No Nordeste do Brasil, encontra-se o Centro de Endemismo de Pernambuco (CEP), uma sub-região de Mata Atlântica acima do Rio São Francisco, com particular importância do ponto de vista da diversidade e conservação (Tabarelli et al., 2005). Atualmente, a floresta nesta região é escassa e fragmentada, 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 ao longo da Mata Atlântica favorece ciclos de produção de folhas, frutos e flores ao longo do ano, garantindo alimento aos animais durante diferentes estações do ano (Morellato et al., 2000). A fenologia é a ciência que estuda os eventos recorrentes do ciclo de vida dos organismos, como o brotamento das folhas, a floração e a frutificação, e suas relações com fatores climáticos e ambientais (Lieth, 1974). A análise fenológica é essencial para compreender como a vegetação responde às variações climáticas e quais são os padrões de disponibilidade de recursos ao longo do tempo (Morellato, 2003). A coleta e análise contínua de dados fenológicos permitem verificar, entre outras coisas, a consistência dos padrões observados ao longo dos anos, garantindo a identificação de variações anuais associadas a eventuais flutuações ambientais. Em ambientes afetados por desmatamento, como o CEP – por exemplo, ocorrem mudanças nos padrões reprodutivos (Tabarelli et al., 2010) em que se a frutificação ocorre em momentos distintos, em que alguns animais dispersores podem ter um período de escassez alimentar. Assim, o estudo fenológico pode identificar o processo de reprodução e regeneração das plantas (Reznik et al., 2012), e avaliar se os indivíduos estão mantendo seus ciclos ao longo dos anos e os impactos durante o tempo. Os estudos fenológicos das plantas também podem ser úteis para avaliar e compreender a disponibilidade de recursos para espécies frugívoras e folívoras, como o Guariba-de-Mãos-Ruivas (*Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766)).

Alouatta belzebul é um primata Neotropical que tem distribuição disjunta, sendo grande parte na floresta amazônica, e uma pequena parcela na Mata Atlântica do Nordeste brasileiro, ao longo do CEP. No CEP, 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 guariba-de-mãos-ruivas é dependente de florestas, possui hábitos arborícolas e é classificado como Vulnerável tanto internacionalmente pela IUCN (Valença-Montenegro et al., 2021), como nacionalmente pelo Ministério do Meio Ambiente (Valença-Montenegro et al., 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 desses organismos 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). A vocalização territorial típica dos guaribas, 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, socialização e disputa territorial.

Metodologia

Este estudo fenológico está associado a um projeto de pesquisa maior sobre fenologia e ecologia sonora de *A. belzebul*, conduzido em dois fragmentos florestais ao longo do CEP. Foram estabelecidos cinco pontos amostrais, distantes pelo menos 2 km entre si, cada um possuindo três parcelas associadas, totalizando 15 parcelas fenológicas. O atual relatório apresenta dados de um plano de trabalho relacionado a uma das áreas, que contém três pontos amostrais (P1, P2, e P3), e, portanto, com um total de nove parcelas fenológicas (Figura 1).

Assim, o estudo foi realizado em um fragmento de Mata Atlântica no estado da Paraíba, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Gargaú (7°00'44"S, 34°57'25"W), que tem 1.059 ha), localizada no município de Santa Rita. A área representa um remanescente de floresta ombrófila e semidecidual inseridos em uma matriz fortemente antropizada, com predominância de monoculturas de cana-de-açúcar.

O processo de instalação das parcelas para amostragem da fenologia ocorreu em expedições a campo nos meses de outubro e novembro de 2024 e fevereiro de 2025. Para a instalação das parcelas foi estendida a trena de 50m em linha reta e foram usados barbantes de 2m de comprimento (em cada lado) para definir a largura de 4m, permitindo identificar quais indivíduos estariam inseridos na parcela (Figura 2). A distância aproximada entre parcelas é de 100 m. Para a amostragem em si, foram incluídos apenas indivíduos com porte arbóreo com diâmetro de fuste à altura do peito (DAP) ≥ 10 cm. Cada indivíduo incluído no monitoramento fenológico foi marcado com etiquetas numeradas, permitindo sua identificação individual e acompanhamento ao longo do tempo.

As coletas de dados em campo foram conduzidas mensalmente, preferencialmente realizadas na primeira semana de cada mês. Cada expedição contou com o mínimo de dois observadores por parcela, garantindo maior confiabilidade na identificação das fenofases. Durante as coletas, para cada indivíduo, registrou-se a presença e a intensidade das seguintes fenofases: folhas (jovens e maduras), floração (botões florais e flores abertas) e frutificação (frutos imaturos e maduros). 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 estruturas reprodutivas ou folhas recém-caídas, as quais auxiliaram na identificação dos indivíduos e das fenofases registradas. Para a análise no presente relatório, foram considerados os

indivíduos de espécies reconhecidas na dieta de *Alouatta belzebul* disponível em Ludwig et al. (2020).

Os indivíduos das plantas 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 sobre fenologia (Fortunato & Quirino, 2016; Nobre et al., 2016), levantamento de flora na região do CEP (Pereira et al., 2017; Barbosa et al., 2011; Amazonas & Barbosa, 2011), além de artigos voltados à dieta do *A. belzebul* (Ludwig et al., 2020).

Resultados e Discussões

A partir de fevereiro de 2026, foi iniciado o monitoramento fenológico dos indivíduos arbóreos previamente marcados. Ao todo, foram marcados 154 indivíduos, pertencentes 53 ao P1, 62 ao P2 e 39 ao P3. O estudo fenológico durou cinco meses, ocorrendo de fevereiro a junho, e apesar de não possuímos um ano completo de dados, com os dados que possuímos foi feita uma análise de estatística circular de fenofases das plantas que fazem parte da dieta de *Alouatta belzebul* (Ludwig et al., 2020). A partir desse levantamento de dados, criamos uma prancha de plantas, para uso particular, com indivíduos 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 ou folhas, como determinadas estruturas visualizadas, como botão floral, flor, fruto imaturo ou maduro. Já foram identificados indivíduos das espécies *Didymopanax morototoni* (Aubl.), *Tapirira guianensis* (Aubl.), *Xylopia frutescens* (Aubl.), *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.), *Protium heptaphyllum* (Aubl.), *Bowdichia virgilioides* (Kunth.), *Inga thibaudiana* (DC.), *Eschweilera ovata* (Cambess.), *Lecythis pisonis* (Cambess.), *Byrsonima sericea* (DC.), *Manilkara salzmannii* (A.DC.).

Durante os meses de expedições a campo, foi possível observar a ocorrência da floração em algumas espécies, como *Didymopanax morototoni* (Aubl.) e *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.), além de outros indivíduos cuja identificação específica ainda não foi plenamente confirmada. Também foi possível acompanhar a frutificação de espécies como *Tapirira guianensis* (Aubl.) e *Byrsonima sericea* (DC.). No entanto, devido à limitação temporal do estudo, não foi possível registrar completamente os eventos fenológicos, em especial, a floração e frutificação de diversas espécies. 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.).

Durante o período de monitoramento, observou-se que a emissão de folhas novas apresentou um pico nos meses de fevereiro e março, com uma redução progressiva nos meses seguintes (Figura 3a). Como esperado para um bioma de floresta perene, a presença de folhas maduras manteve-se constante ao longo do ano, refletindo a manutenção do dossel foliar típico da Mata Atlântica (Figura 3b). Em relação às fenofases reprodutivas, a floração atingiu seu ápice em fevereiro, seguida por uma queda acentuada na incidência de flores nas parcelas monitoradas (Figura 3c). A frutificação, embora tenha sido a fenofase menos frequente entre

todas, apresentou um pico em abril, em consonância com o período subsequente ao auge da floração, o que sugere um padrão reprodutivo coerente com o ciclo fenológico das espécies estudadas (Figura 3d).

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.

Esses resultados contribuem para o entendimento das estratégias ecológicas adotadas pelas espécies em ambientes fragmentados, fornecendo subsídios para ações de conservação e manejo da flora nativa no Centro de Endemismo de Pernambuco. A continuidade do monitoramento fenológico é fundamental para detectar possíveis mudanças associadas às alterações climáticas e à fragmentação do habitat, além de aprofundar o conhecimento sobre a dinâmica temporal das espécies arbóreas da região.

Referências

- Agostini, I., Holzmann, I., Di Bitetti, M.S. (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, N. T., Barbosa, M.R.V. 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, M. R. V.; Thomas, W. W.; Zárate, E. L. P.; et al. Checklist of the vascular plants of the Guaribas Biological Reserve, Paraíba, Brazil. *Revista Nordestina de Biologia*, João Pessoa, v. 20, n. 2, p. 79-106, 2011.
- Bonvicino, C.R. (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., de Azevedo, R. B., Alves, S. L., Vidal, M. D., & Mendonça, E. N. (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, Canales-Espinosa, D., Dias, P.A.D. (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, R.G.T., Oliveira, D. A. G., Holzmann, I. & Kitchen, D. M. (2015). Production of Loud and Quiet Calls in Howler Monkeys. in: *Howler Monkeys Adaptive Radiation*,

Systematics, and Morphology. Springer Science, 337-369. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1957-4>

Fialho, M.S., Valença-Montenegro, M.M., Silva, T.C.F., Ferreira, J.G., Laroque, P.O. (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>

Flora e Funga do Brasil (2025) Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>

Fortunato, M.E.M., Quirino, Z.G.M. 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, A. J. L., Lorenzetti, D. B., Neuhaus, M., & Rizzatti, C. B. (2012). Desmatamento no Brasil: um problema ambiental. *Revista Capital Científico – Eletrônica (RCC^{CE})*, 10(2), 55–76. <https://revistas.unicentro.br/index.php/capitalcientifico/article/view/1110>

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)

Lastra, N.M., Negrín, A.R., Dias, P.A.D. (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>.

Lieth, H. (1974). Purposes of a Phenology Book. In: Lieth, H. (eds) *Phenology and Seasonality Modeling*. Ecological Studies, vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-51863-8_1

Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 2020.

Ludwig, G., Lima, G. Y. F., Azevedo, R. B. de, Jerusalinsky, L., Valença-Montenegro, M. M., & Buss, G. (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, L.P.C. 2003. South America. In: M.D. Schwartz (ed.). *Phenology: an integrative environmental science*. Springer, Netherlands. Pp.75-92.

Morellato, L.P.C., Talora, D.C., Takahasi, A., Bencke, C.C., Romera, E.C. and Zipparro, V.B. (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>

Nobre, G.D.S., Silva Neto, E., Quirino, Z.G.M., 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, L. A.; Chagas, E.C.O.; Barbosa, M.R.V. Composição florística de um fragmento de mata ciliar na bacia hidrográfica do Rio Cabelo, João Pessoa, Paraíba, Brasil. Revista Nordestina de Biologia, v. 25, n. 1, p. 45-60, 2017.

POWO (2025). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <https://powo.science.kew.org/>

Reznik, G., Pires, J. P. D. A., & 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, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M. (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>.

Silva, J.M.C., 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, J. M. C., Hirota, M. M., & Bedê, L. C. (2005). Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade, 1(1), 132-138.

Valença-Montenegro, M.M., Fialho, M.S., Carvalho, A.S., Ravetta, A.L., Régis, T., de Melo, F.R., Jerusalinsky, L., Veiga, L.M., Mittermeier, R.A., Cortes-Ortiz, L. & Talebi, M. 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.en>. Accessed on 12 June 2025.

Valença-Montenegro, M.M.; Souza, F.V.; Mourthé, Í.; Ludwig, G.; Martins, A.B.; Buss, G.; Ravetta, A.L.; Carvalho, A.S.; Melo, F.R.; Fialho, M.S.; Hilário, R.R. 2024. Alouatta belzebul (Linnaeus, 1766). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br> DOI: 10.37002/salve.ficha.30203.2 - Acesso em: 12 de Jun. de 2025.

Anexos

Figura 1. Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Gargaú. A RPPN Gargaú é o fragmento de floresta de formato semelhante a triangular observado na figura, os pontos vermelhos indicam os pontos amostrais do estudo, P1, P2 e P3. A RPPN Gargaú tem sob

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.

Figura 3. Gráficos circulares referentes aos meses e intensidades das fenofases (a) Folha madura; (b) Folha nova; (c) Flor; (d) Fruto

CÓDIGO: SB1026

AUTOR: GABRIELE SALES RODRIGUES

ORIENTADOR: MAGNOLIA FERNANDES FLORENCIO DE ARAUJO

TÍTULO: USO DE UM HOTEL DE INSETOS COMO ESTRATÉGIA PARA ENSINAR CIÊNCIAS E PROMOVER SUSTENTABILIDADE EM UM ESPAÇO NÃO ESCOLAR DE ENSINO

Resumo

Essa pesquisa investiga como a incorporação de uma estratégia educativa dinâmica no ensino de ciências para a sustentabilidade pode aumentar e melhorar a aprendizagem. Explorando com um hotel de insetos sendo um enriquecedor educativo que proporciona um meio para desmistificar a visão negativa que os jovens possuem sobre os insetos e os sensibiliza sobre a importância ecológica desses seres. Sendo uma abordagem quali-quantitativa sobre um grupo amostral de estudantes de ensino fundamental utilizando como momento de consolidação uma atividade gamificada de 10 perguntas sobre temas como morfologia, ecologia, comportamento e sustentabilidade. Os resultados demonstraram-se positivos com um índice médio de acertos de 86,6%, logo é possível concluir que atividades mais dinamizadas em espaços educativos não escolares de ensino como jardins sensoriais são eficientes para a desconstrução de equívocos sobre os insetos e fomenta comportamentos pró-ambientais para uma sociedade mais sustentável.

Palavras-chave: Sustentabilidade, Ensino de ciências, Espaços não Escolares de Ensino

TITLE: USING AN INSECT HOTEL AS A STRATEGY FOR TEACHING SCIENCE AND PROMOTING SUSTAINABILITY IN A NON-SCHOOL LEARNING SPACE

Abstract

This study examines the extent to which the integration of a dynamic educational strategy into science education for sustainability can enhance learning outcomes. Specifically, it investigates the pedagogical use of an insect hotel as an educational resource that serves both to demystify the negative perceptions commonly held by young students toward insects and to foster greater awareness of their ecological significance. Employing a mixed-methods (quali-quantitative) approach, the research was conducted with a sample of elementary school students. As a culminating activity, participants engaged in a gamified quiz consisting of ten questions addressing morphology, ecology, behavior, and sustainability. Findings revealed positive outcomes, with an average accuracy rate of 86.6%. These results suggest that dynamic, non-formal educational interventions in settings such as sensory gardens are effective in correcting misconceptions about insects and in promoting pro-environmental behaviors, thereby contributing to the advancement of a more sustainable society.

Keywords: Sustainability, Science Education, Non-Formal Educational Spaces

Introdução

A Agenda 2030 é um plano de ação adotado pela Organização das Nações Unidas (ONU), desde 2015 que tem como objetivo a mitigação de problemas globais urgentes tais como fome, desigualdade social, questões ambientais, economia global e conflitos violentos que interferem nos direitos humanos com a finalidade de proporcionar um mundo mais sustentável. O documento tem como princípio central a sustentabilidade, ou seja, ações que buscam suprir as necessidades dos tempos atuais de maneira a não restringir ou prejudicar o desenvolvimento futuro, de acordo com o Relatório de Brundtland de 1987, com a utilização dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS's) que fazem parte da proposta Agenda 2030, inseridos em todos os aspectos sociais desde instituições, escolas até ações individuais. Espaços educativos não escolares de ensino são aqueles locais fora do ambiente da escola como parques, museus, jardins zoológicos e centros científicos que proporcionam ações educativas dinamizadas tendo como objetivo estimular os estudantes a novas perspectivas críticas do conhecimento científico, segundo Marandino (2017). O Parque das Ciências da UFRN se enquadra nesse conceito diante das atividades oferecidas como o seu jardim sensorial com um hotel de insetos; a sala expositiva que conta com modelos demonstrativos de fontes renováveis de energia e atividades ao ar livre, como o bingo da natureza, dentre outras tantas possibilidades de execução de ações práticas demandadas por professores, especialmente da rede pública, que agendam aulas e passeios neste local. O parque desempenha, assim, a função de divulgar as ciências em prol da sustentabilidade de forma equitativa e inclusiva, dentro da sociedade.

A aplicação da sustentabilidade no contexto do ensino de ciências segundo Gadotti (2008) implica em superar o sistema atual de ensino - sendo ele um modelo tradicional que possui uma visão centrada no individualismo -, assim adota medidas pensadas para conectar os valores éticos da população e sua experiência do cotidiano ao conhecimento científico. A partir dessa conexão se desenvolve um pensamento crítico acerca da realidade vivente do estudante como também o reforço a comportamentos pró-ambientais que como discutem Boeve-de Pauw, e Van Petegem (2013) são aquelas ações deliberadas em prol ao meio-ambiente feitos pelo indivíduo ou um grupo.

O Jardim Sensorial (JS) é uma dentre as atividades propostas no projeto Parque das Ciências a fim de facilitar o ensino de ciências para a sustentabilidade em espaços educativos não escolares de ensino, sendo um artifício que incita experiências multissensoriais pelo uso dos cinco sentidos em especial o tato e olfato. No percurso há a estrutura de um Hotel de Insetos. Assemelhado a uma casa com diferentes substratos para a atração de distintas ordens de insetos, o hotel atua como um enriquecedor da experiência educativa e possibilita trazer à tona o tema dos insetos, esse grupo muitas vezes tido como negativo no mundo animal, de forma mais visual e dinâmica para seu ensino.

Justifica-se que, embora o tema inicial da pesquisa esteja com o foco na Microbiologia e Saúde dos Solos, no que se refere à Sustentabilidade e Importância para o Ensino e Divulgação das Ciências, tivemos que desenvolver antes a temática dos insetos no jardim, por já estarem em curso projetos de pesquisa que contemplavam atividades didáticas nesse tema, ficando o tema do solo para um momento posterior que já está em curso, e que será associado ao tema dos insetos.

Sendo assim objetivamos dentro desta pesquisa caracterizar como um hotel de insetos auxilia na compreensão dos estudantes sobre os seres da classe Insecta, bem como atenuar os estigmas de aversão e medo impostos a esses seres vivos, com a utilização de atividades dinamizadas dentro de um espaço educativo não escolar, o Parque das Ciências da UFRN.

Metodologia

A presente pesquisa apresenta uma abordagem quali-quantitativa a partir dos conceitos propostos por Gerhardt e Silveira (2009) que explica o porquê das coisas. Realizado no Parque das Ciências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com o auxílio de uma das atividades componentes, o Jardim Sensorial, local que recebe estudantes de diversas escolas do município. A coleta de dados ocorreu em especial no período dos meses de outubro a novembro, no Parque das Ciências, e envolveu a participação de 53 estudantes de escolas públicas da capital Natal-RN do 6º ao 9º ano (Ensino Fundamental II) com 12 a 15 anos de idade.

A visita ao Jardim Sensorial com enfoque ao “Insetos do Jardim” começa com uma fala de definição sobre o que é um JS e os motivos de sua construção dentro de uma visão pedagógica, como também orientações de como se dará o percurso. Logo em seguida, os estudantes são colocados em fila e vendados para que assim possam percorrer o JS tateando e cheirando as espécimes de plantas ali presentes. Ao término, os estudantes tiram as vendas e são direcionados ao hotel de insetos localizado dentro do JS, assim se inicia uma conversa coordenada pelos monitores sobre os insetos com os conhecimentos prévios dos estudantes, utilizando e ampliando temas como a importância desse grupo para o meio ambiente, polinização, características morfológicas, estigmas e medos impostos sobre esses animais.

Por fim uma atividade de consolidação do conhecimento ensinado é passada dentro da plataforma wordwall que consiste em um jogo com 10 perguntas e múltiplas alternativas (4) elaborado pelos monitores do Parque das Ciências sobre insetos: suas características físicas e implicação ambiental, temas esses que foram discutidos durante a visita. Dessa forma foi possível obter resultados e condensá-los em gráficos e tabelas para posterior análise.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos demonstraram o envolvimento significativo dos estudantes nas atividades propostas devido a grande interação com os monitores durante a conversa guiada sobre insetos e sua importância. As 10 perguntas foram subsequentemente divididas em 3 grandes categorias, a primeira sendo funcional com perguntas que abarcam comportamento e especificidades dentro dos insetos; a segunda categoria era de natureza morfológica com perguntas sobre os aspectos físicos e diferenciais dentro da classe Insecta, e a terceira e última categoria era ecológica, com temas que sintetizam a importância desses seres para a manutenção da natureza, habitats, além de ameaças antropogênicas.

Após a aplicação do jogo, observou-se que a categoria funcional obteve maior percentual de acertos (89,9%). Podemos conectar esse grande número à presença marcante de alguns insetos de conhecimento popular por meio de filmes, quadrinhos, animações e crenças, como no caso da abelha ser famosa por produzir mel. Filmes como Bee movie que acabam difundindo conhecimentos sobre a espécie, ao mesmo tempo em que levam à possibilidade de também gerar medo e aversão, associando as abelhas a ferroadas e dores.

A categoria ecológica (89,6% de acertos) também demonstrou ter havido uma boa compreensão sobre a importância dos insetos para a manutenção e diversidade da natureza e as múltiplas opções de habitats que eles conseguem ocupar, tópicos esses que foram abordados durante a visita ao Hotel de Insetos. Entretanto, nas questões que tratam de ameaças ao grupo muitos estudantes não conseguiram expressar conhecimentos sobre o fato de que esse grupo está ameaçado e corre o risco de extinção, o que implica que o planeta ficaria sem o importante papel ecológico desempenhado pelas abelhas, como a ação polinizante, por exemplo.

Do ponto de vista morfológico, embora com menor percentual de acertos (80,5%), identificamos o erro que reflete esse resultado: à medida em que há uma confusão entre insetos e outros artrópodes como as aranhas, especialmente no que diz respeito a o número de pernas. Esse obstáculo ligado à classificação leva a uma generalização de características que despertam sentimentos negativos e de perigo para o grupo dos insetos.

No que se refere às borboletas, um grupo de insetos considerado muito conhecido e carismático como afirma Santos (2015), observou-se uma simpatia e familiaridade por parte dos estudantes, sobre o assunto, quando se fala, por exemplo, sobre o seu ciclo de metamorfose.

Em suma, o índice geral de acertos foi elevado (86,2%) demonstrando um entendimento significativo sobre os conceitos principais sobre os insetos por parte dos estudantes. Isso se deve, ao menos em parte, à sensibilização provocada no decorrer da visita ao Jardim sensorial e ao Hotel de Insetos, o que fortalece um novo olhar desmistificado e mais positivo sobre esse grupo.

Conclusão

Conclui-se, portanto, a partir dos resultados, que ao utilizar o hotel de insetos como um objeto agregador de conhecimentos, durante o ensino de ciências, essa estratégia colabora para a superação de uma perspectiva tradicional de ensino Gadotti (2008), maximizando o pensamento crítico e analítico do estudante a respeito do mundo em que vive, o que é fundamental para a formação de uma cidadania que promove reflexão sobre as questões ambientais.

Arelada à sustentabilidade, essa dinamização do ensino consegue atuar sobre as principais dimensões, indicadas na Agenda 2030, na medida em que garante o acesso aos conhecimentos científicos de qualidade a todos, de forma equitativa e sustentável, por trabalhar partindo dos temas de proteção à fauna e flora atingindo a dessensibilização do medo e aversão para com os insetos e construindo pensamento e atitudes pró-ambientais.

Referências

BOEVE-DE PAUW, J.; VAN PETEGEM, P. A cross-cultural study of environmental values and their effect on the environmental behavior of children. *Environment and Behavior*, v. 45, n. 5, p. 551-583, 2013.

GADOTTI, M. *Educar para a sustentabilidade: uma contribuição à década da educação para o desenvolvimento sustentável*. São Paulo: Instituto Paulo Freire, 2008. Disponível em: <https://www.paulofreire.org/>. Acesso em: 30 ago. 2025.

GERHARDT, T. E.; SILVEIRA, D. T. *Métodos de pesquisa*. Plageder, 2009.

JACOBUECCI, D. F. C. Contribuição dos espaços não-formais de educação para formação da cultura científica. Em *Extensão*, Uberlândia, v. 7, 2008.

MARANDINO, M. Faz sentido ainda propor a separação entre os termos educação formal, não formal e informal? *Ciência & Educação* (Bauru), Bauru, v. 4, p. 811-816, 2017.

SANTOS, J. P.; MARINI-FILHO, O. J.; FREITAS, A. V. L.; UEHARA-PRADO, M.
Monitoramento de borboletas: o papel de um indicador biológico na gestão de unidades de
conservação. Biodiversidade Brasileira, v. 6, n. 1, p. 87-99, 2016.

UNITED NATIONS. Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development.
New York: United Nations, 2015

CÓDIGO: SB1042

AUTOR: MARIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

COAUTOR: ANA PAULA GARCIA DELGADO

COAUTOR: LUCA DE MELO MOLLIK

COAUTOR: MARIA ELOISA GOMES TEIXEIRA PEIXOTO

ORIENTADOR: ANAMARIA DAL MOLIN

TÍTULO: VARIAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DA ENTOMOFAUNA DE VOO ATIVO EM ÁREAS DE MATA ATLÂNTICA SUJEITAS A DIFERENTES NÍVEIS DE INFLUÊNCIA ANTRÓPICA

Resumo

Atualmente são conhecidas mais de um milhão de espécies de insetos, distribuídas entre todos os continentes e habitats, exceto o ambiente marinho. Dessa forma, levantamentos a respeito da biodiversidade dos insetos são de grande importância ecológica. As florestas tropicais são conhecidos hotspots de biodiversidade, mas também são extremamente ameaçadas pelo avanço das atividades antrópicas, o que torna os estudos sobre a biodiversidade de tais ambientes ainda mais importantes. As armadilhas de interceptação de voo do tipo Malaise estão entre os métodos de coleta de insetos mais eficazes, especialmente para aqueles que possuem voo livre, pois conseguem reunir um panorama geral da biodiversidade de insetos de um local. O presente trabalho tem como objetivo realizar a comparação entre a entomofauna de voo ativo entre A Floresta Nacional do município de Nísia Floresta e o Parque Estadual Dunas de Natal entre os períodos de abril a junho de 2022 e 2023.

Palavras-chave: Insetos. Mata Atlântica. Biodiversidade.

TITLE: VARIATIONS IN THE COMPOSITION OF ACTIVE FLIGHT ENTOMOFAUNA IN ATLANTIC FOREST AREAS SUBJECT TO DIFFERENT LEVELS OF ANTHROPIC INFLUENCE

Abstract

Currently, over one million insect species are known, distributed across all continents and habitats except the marine environment. Therefore, surveys of insect biodiversity are of great ecological importance. Tropical forests are known biodiversity hotspots, but they are also extremely threatened by the advancement of human activities, making studies on the biodiversity of such environments even more important. Malaise-type flight interception traps are among the most effective insect collection methods, especially for those with free flight, as they can gather a general overview of a location's insect biodiversity. This study aims to compare the active-flying insect fauna between the Nísia Floresta National Forest and the Dunas de Natal State Park between April and June 2022 and 2023.

Keywords: Insects. Atlantic Forest. Biodiversity.

Introdução

Os insetos compõem uma parcela diversa da fauna terrestre e exercem funções ecológicas essenciais, como polinização, predação e decomposição. Diante das crescentes pressões antrópicas, a conservação de florestas e de suas espécies associadas tornou-se foco de atenção científica e política (Nakamura et al., 2017). Contudo, estudos recentes evidenciam o declínio global da biodiversidade de insetos, associado à perda e fragmentação de habitats, mudanças climáticas e outros impactos humanos (Cardoso et al., 2020).

Atualmente, mais de um milhão de espécies de insetos são conhecidas, ocupando praticamente todos os ambientes, exceto o marinho (Rafael et al., 2024; Stork, 2018). O conhecimento sobre suas populações e interações ambientais é fundamental para estratégias de manejo e conservação (Mise et al., 2009). Para tanto, levantamentos faunísticos utilizam diferentes métodos de coleta (Camargo et al., 2015). Entre eles, destacam-se as armadilhas Malaise, consideradas eficientes na captura de insetos de voo ativo e amplamente utilizadas em estudos de comunidades locais e monitoramento de longo prazo, devido à praticidade e baixa necessidade de manutenção (Kitching et al., 2001; Uhler et al., 2022). Essas armadilhas permitem comparações temporais e espaciais da abundância e diversidade entre ordens de insetos.

A antropização intensifica a fragmentação e cria ecossistemas com diferentes níveis de degradação. Desmatamentos e a consequente formação de fragmentos florestais podem isolar populações, reduzindo a riqueza e diversidade de insetos (Thomazini & Thomazini, 2002). Considerando a influência da urbanização sobre a biodiversidade, o projeto Lifeplan, no qual esta pesquisa se insere, busca construir uma base de dados global para avaliar impactos antrópicos locais e regionais sobre padrões de diversidade. No Rio Grande do Norte, foram amostrados dois pontos de Mata Atlântica: a Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta e o Parque Estadual Dunas de Natal (PDD). Além de integrar análises globais, o estudo contribui para ampliar o conhecimento sobre a entomofauna do estado, ainda pouco amostrada.

A FLONA de Nísia Floresta e o PDD são Unidades de Conservação compostas por vegetação primária e secundária de Mata Atlântica, incluindo ecossistemas associados como dunas, tabuleiros costeiros e, no caso da FLONA, manguezais (ICMBio/RN, 2012; Idema/RN, 2025). Embora existam registros para grupos específicos de insetos nessas localidades (Pinheiro et al., 2016; Canejo et al., 2023), faltavam levantamentos gerais antes desta iniciativa. O presente trabalho visa comparar a entomofauna capturada em duas áreas sob diferentes níveis de pressão antrópica e suas variações ao longo de um ano. A FLONA de Nísia Floresta representa um ambiente menos alterado, com reduzida influência urbana, enquanto o PDD, situado no centro de Natal, constitui uma área mais exposta às pressões humanas.

Metodologia

As análises foram feitas utilizando amostras coletadas em dois fragmentos de Mata Atlântica: um em área de preservação, na Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta (06°05'12,4"S, 035°11'04"W), e outro inserido em área urbana, no Parque Estadual das Dunas de Natal (PDD) (5°49'S, 35°11'W).

Ambas as áreas encontram-se no domínio de clima Tropical tipo As' (Koeppen), caracterizado por clima tropical chuvoso, com estação chuvosa nos meses de março a julho, e estação seca iniciando na primavera e estendendo-se durante todo o verão.

Em relação às características da vegetação, o PDD, devido à sua proximidade com área costeira, pode ser dividido entre dois tipos de vegetação: Restinga, comum na formação de praias e sopés de dunas, e a Floresta Estacional Semidecidual (Floresta atlântica). O Parque possui uma área de extensão de 1.802.778m², onde 88% corresponde a vegetação do tipo primária sob diferentes graus de perturbação, 6,93% correspondem a vegetação secundária (herbáceas) e 5,37% representam áreas asfaltadas (IDEMA/RN, 2025).

A vegetação nativa da FLONA de Nísia Floresta é dividida entre dois fragmentos dentro da Unidade de Conservação, onde o primeiro representa 59% da área de extensão da FLONA e é composto por áreas de Floresta Estacional Semidecidual e Tabuleiro Litorâneo, o segundo fragmento, onde já houve experimentação florestal, corresponde a 39,7% da área da Unidade. Ambos os fragmentos florestais estão em estágio regenerativo secundário (ICMBIO, 2012)

As coletas foram realizadas no ano de 2022 na FLONA de Nísia Floresta dos meses de abril a dezembro e, em 2023, no Parque das Dunas, no período de Janeiro a Dezembro de 2023. Foram utilizadas armadilhas do tipo Malaise para interceptação de voo, posicionadas em áreas planas cercadas por vegetação alta, característico de uma floresta ombrófila (RADAM BRASIL, 1981), e com grande quantidade de serrapilheira. Conforme protocolo (Lifeplan, 2022), as amostras foram recolhidas semanalmente, conservadas em álcool etílico 95%, refrigeradas e posteriormente fotografadas em alta resolução utilizando uma câmera Canon EOS Rebel T6i, 24 megapixels.

Os insetos coletados foram triados e identificados até o nível de ordem com o auxílio de um microscópio estereoscópico Motic, com base na classificação adotada por Rafael et al. (2024). Após identificação, os espécimes são conservados com álcool etílico de, no mínimo, 70% e posteriormente armazenados em frascos do tipo falcon ou eppendorf e mantidos sob refrigeração.

Os dados correspondentes às triagens foram tabulados e planilhados com auxílio do programa Google Sheets. A partir desses dados, foram produzidos gráficos correspondentes ao número de indivíduos coletados por mês, totais e variação na abundância de indivíduos por ordem que foram observados durante os períodos de triagem

As comparações foram realizadas utilizando os seguintes índices faunísticos:

- Média de coleta mensal $mC = N_i/nC$: Onde N_i representa o número de indivíduos coletados no mês e nC o número de coletas realizadas.
- Abundância relativa: Proporção de indivíduos em relação ao valor total da amostra (Ricklefs, 2011), sendo calculado por $p_i = n_i/N$, em que n_i é o número de indivíduos da Ordem i e N é o total de indivíduos da amostra (Magurran, 2011).
- Dominância: Demonstra que uma, ou mais ordens, apresenta uma abundância relativa superior às demais, ou seja, uma desuniformidade na distribuição total do número de indivíduos (Magurran, 2011). Para este trabalho, uma Ordem é considerada dominante quando sua abundância relativa é superior a 50%.

Após o final do trabalho, todo o material coletado será depositado na Coleção Entomológica Adalberto A. Varela-Freire (CEAAVF), localizada no Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Resultados e Discussões

Ao final do período de coleta foram contabilizadas 47 coletas semanais referentes aos meses de janeiro a dezembro de 2023 para o Parque Estadual Dunas de Natal e 71 coletas, referentes aos meses de abril a dezembro de 2022 para a FLONA de Nísia Floresta. No entanto, para este trabalho,

foram consideradas apenas as amostras no período de abril a junho para ambas as localidades, a fim de realizar comparação de dados. Dessa forma, apenas 33 amostras foram utilizadas para análise.

Ao final das coletas do PDD, foram identificados 18.357 indivíduos, distribuídos entre sete ordens, são elas: Diptera (10.541 indivíduos), Collembola (4011 indivíduos), Hymenoptera (1449 indivíduos), Coleoptera (803 indivíduos), não-insetos (595 indivíduos), Outras ordens (558 indivíduos) e Lepidoptera (400 indivíduos). Foi observado que o mês de abril/2023, com 10.457 indivíduos coletados, foi o que obteve maior abundância de espécimes coletados (Tabela 1).

Em relação às ordens coletadas, Diptera teve o maior número de espécimes coletados, representando 57,42% do total, seguido por Collembola com 21,85%, depois Hymenoptera, representando 7,89%, Coleoptera, com 4,37%, não-insetos, ou aracnídeos, representam 3,24% dos indivíduos coletados, seguido por outras ordens com 3,04% e, finalmente, Lepidoptera, com 2,18% teve a menor representatividade nas amostras (Gráfico 1). A categoria "outras ordens" é composta de outras ordens coletadas, mas que não tem representatividade significativa individualmente, os táxons coletados pertencentes a essa categoria são Orthoptera, Psocoptera, Hemiptera, Neuroptera, Phasmatodea, Blattodea, Dermaptera, Mantodea, Isoptera, Archaeognatha, Thysanoptera e Embioptera (Tabela 2).

Quanto às amostras coletadas na FLONA de Nísia Floresta, foram identificados 14015 indivíduos, distribuídos entre os táxons previamente listados, também foi observado que, diferente do PDD, o mês com maior abundância de espécimes coletados foi junho/2022, onde quase 60% das amostras foram coletadas (Tabela 3). Outra diferença percebida foi na distribuição dos indivíduos coletados entre os táxons, Diptera (9306 indivíduos) e Collembola (2246 indivíduos) tiveram os maiores números de espécimes registrados, seguidos por Hymenoptera (1054 indivíduos), Lepidoptera (605 indivíduos), outras ordens (533 indivíduos), Coleoptera (143 indivíduos) e, com o menor número de espécimes coletados, não insetos (128 indivíduos) (Gráfico 2, Gráfico

Em relação às outras ordens coletadas, foi percebido que a maioria dos táxons que foram registrados para o PDD também ocorrem na FLONA, exceto pela ordem Ephemeroptera, que foi coletada exclusivamente em Nísia Floresta. Outras ordens coletadas foram Hemiptera (292 indivíduos), Orthoptera (130 indivíduos), Psocoptera (78 indivíduos), Blattodea (18 indivíduos), Embioptera (7 indivíduos) e Mantodea (4 indivíduos). Outros taxons como Ephemeroptera, Phasmatodea, Neuroptera e Thysanoptera também foram registrados, mas tiveram apenas 1 indivíduo coletado para cada ordem (Tabela 4).

Conclusão

Este trabalho oferece um breve olhar sobre as variações na composição da entomofauna de voo ativo em áreas da Mata Atlântica com diferentes graus de conservação. Os grupos melhores amostrados utilizando o método de armadilha de Malaise foram Diptera, Collembola, Hymenoptera e Lepidoptera, respectivamente, seguindo a expectativa de que armadilhas Malaise seriam eficazes na captura de insetos de voo livre. Porém, apesar de Collembola não ser uma ordem com espécies voadoras, já era esperado que um grande número de indivíduos fosse coletado, pois são indivíduos cosmopolitas (CULIK & ZEPPELINI, 2003). Os meses com maior abundância e média de insetos por coleta foram abril/2023 e junho/2022. Contudo, é necessário um maior inventário de coleta a fim de fazer uma comparação de padrões de ocorrência. Ademais, o tipo de amostragem utilizado é sabidamente incompleto, levando em consideração a grande diversidade de hábitos da entomofauna, pois não é um tipo de armadilha que coleta com eficiência insetos que "caem" após se chocar com algo (Coleoptera), ou que são mais associados a ambientes de solo (Orthoptera, Blattodea). Ainda assim, o presente estudo contribui para um levantamento inicial da entomofauna de duas importantes áreas para a conservação da Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Norte.

Referências

CARDOSO, Pedro et al. Scientists' warning to humanity on insect extinctions. *Biological Conservation*, v. 242, p. 108426, 2020.

CAMARGO, A. J. A., et al. Coleções entomológicas: legislação brasileira, coleta, curadoria e taxonomias para as principais ordens. 2015.

CANEJO, F. W. G. et al. New native host plant records for frugivorous flies (Diptera: Tephritidae, Lonchaeidae) in Northeastern Brazil. *Entomological Communications*, v. 5, p. 3, 2023.

Culik, M.P., Filho, D.Z. Diversity and distribution of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) of Brazil. *Biodiversity and Conservation* 12, 1119–1143 (2003).
<https://doi.org/10.1023/A:1023069912619>

GIEDRE BANELYTE, et al. Global Malaise Trap Project and LIFEPLAN Malaise sampling v2., 2023. Disponível em: <https://www.protocols.io/view/global-malaise-trap-project-and-lifeplan-malaise-s-c57gy9jw>. Acesso em: 25 ago. 2025

IDEMA/RN. Plano de Manejo do Parque Estadual Dunas de Natal. Natal: 2025. 876p

ICMBIO/RN. Plano de Manejo da Floresta Nacional de Nísia Floresta. Nísia Floresta: 2012. 182p.

LIFEPLAN, a planetary inventory of life. University of Helsinki. Disponível em: <https://www2.helsinki.fi/en/projects/lifeplan/about> (acesso em agosto, 2025)

MISE, K. M. et al. LEVANTAMENTO DE INSETOS COM ARMADILHAS LUMINOSAS E ADESIVAS EM AMBIENTES COMERCIAIS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, PARANÁ. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, n. 1, p. 127–130, 2009.

MAGURRAN, A. E. *Biological Diversity, frontiers in measurement and assessment*. Oxford Biology, v. 1, 359 p., 2011

NAKAMURA, Akihiro et al. Forests and Their Canopies: Achievements and Horizons in Canopy Science. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 32, n. 6, p. 438–451, 2017.

PINHEIRO, M.P.G, et al. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vectors of *Leishmania* protozoa, at an Atlantic Forest Conservation Unit in the municipality of Nísia Floresta, Rio Grande do Norte state, Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 83, 2016.

RADAM BRASIL. Folhas SB 24/25: Jaguaribe/Natal: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, v.23, p. 485-535, 1981.

RAFAEL, J. A. et al. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. 2º Edição ed. Manaus - AM: Editora INPA, 2024.

STORK, Nigel E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual Review of Entomology*, v. 63, p. 31-45, 2018.

THOMAZINI, M.J.; THOMAZINI, A.P.B.W. *A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas*. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 21p.

Anexos

Tabela 1: Dados de coletas mensais no PDD com média do número de indivíduos por coleta, número de coletas e valor da representatividade de indivíduos coletados no mês em relação ao total (abril-junho) em porcentagem

Tabela 2: Dados referentes aos indivíduos coletados na categoria “outras ordens” com valores de abundância relativa (PDD).

Tabela 3: Dados de coletas mensais na FLONA de Nísia Floresta com média do número de indivíduos por coleta, número de coletas e valor da representatividade de indivíduos coletados no mês em relação ao total (abril-junho) em porcentagem

Tabela 4: Dados referentes aos indivíduos coletados na categoria “outras ordens” com valores de abundância relativa (FLONA).

Gráfico 1 : Abundância Relativa das ordens coletadas no Parque das Dunas

Gráfico 2: Total de indivíduos por ordem coletados em Nísia Floresta (FLONA)

Gráfico 3: Abundância Relativa das diferentes ordens coletadas na FLONA de Nísia Floresta

CÓDIGO: SB1044

AUTOR: ALINE BUENO DA SILVA

ORIENTADOR: GUILHERME ORTIGARA LONGO

TÍTULO: Mesmos estressores, diferentes status de saúde: efeitos de nutrientes e aumento de temperatura em corais saudáveis e branqueados

Resumo

Os recifes de corais enfrentam ameaças crescentes, como o aumento da temperatura global e a poluição local por nutrientes. Este estudo avaliou os efeitos sinérgicos desses estressores em colônias do coral *Siderastrea stellata*, saudáveis e branqueadas, coletadas nos Parrachos de Rio do Fogo (RN). As colônias foram submetidas, em mesocosmos marinhos por 21 dias, a quatro tratamentos: aquecimento (30 °C) com nutrientes, apenas aquecimento, apenas nutrientes e controle. Foram monitorados a eficiência fotossintética, a densidade de algas simbiontes e a concentração de proteínas totais como indicadores da saúde dos corais. Colônias saudáveis apresentaram alta resiliência, mantendo a eficiência fotossintética e a densidade de simbiontes mesmo sob estresse térmico, possivelmente devido à aclimação prévia a eventos de calor em campo. O aumento de proteínas no tratamento com múltiplos estressores sugere ativação de mecanismos de defesa celular. Já as colônias branqueadas exibiram respostas mais complexas: a eficiência fotossintética aumentou no tratamento combinado, indicando uma possível compensação metabólica estimulada pela maior disponibilidade de nutrientes, enquanto a densidade de simbiontes foi mais elevada sob aquecimento isolado, refletindo uma estratégia de retenção de algas durante o estresse. Esses resultados revelam a complexa ecofisiologia de *S. stellata*, com resiliência em colônias saudáveis e sinais de recuperação em colônias branqueadas.

Palavras-chave: Ondas de calor. *Siderastrea stellata*. Enriquecimento de nutrientes.

TITLE: Same stressors, different health status: effects of nutrients and increased temperature on healthy and bleached corals

Abstract

Coral reefs face growing threats from rising global temperatures and local nutrient pollution. This study evaluated the synergistic effects of these stressors on both healthy and bleached colonies of the coral *Siderastrea stellata*, collected from the Parrachos de Rio do Fogo (RN). The colonies were subjected to four treatments in marine mesocosms for 21 days: heating (30 °C) with nutrients, heating alone, nutrients alone, and a control. Photosynthetic efficiency, symbiont density, and total protein concentration were monitored as indicators of coral health. Healthy colonies showed high resilience, maintaining photosynthetic efficiency and symbiont density even under thermal stress, possibly due to prior acclimatization to heat events in their natural environment. The increase in proteins in the multi-stressor treatment suggests the activation of cellular defense mechanisms. In contrast, bleached colonies exhibited more complex responses: photosynthetic efficiency increased in the combined treatment, indicating a possible metabolic compensation stimulated by greater nutrient

availability, while symbiont density was higher under isolated heating, reflecting a strategy of retaining algae during stress. These results reveal the complex ecophysiology of *S. stellata*, with resilience in healthy colonies and signs of recovery in bleached ones.

Keywords: Heatwaves. *Siderastrea stellata*. Nutrient enrichment.

Introdução

Os impactos das mudanças climáticas decorrentes das atividades humanas estão afetando processos naturais do planeta (Steffen et al., 2011). Estima-se que a temperatura média global já tenha aumentado aproximadamente 1,0 °C em relação aos níveis pré-industriais e que, entre 2030 e 2052, o aquecimento global atinja 1,5 °C, caso o atual ritmo de emissões seja mantido (IPCC, 2023). Entre os ecossistemas mais afetados por essas mudanças estão os recifes de corais (Hughes et al., 2017). Principais bioconstrutores do ambiente marinho, os corais são animais que mantêm uma relação simbiótica com algas dinoflageladas, cuja produção fotossintética constitui sua principal fonte de energia. No entanto, quando a temperatura da água ultrapassa o limite de tolerância desses organismos, essa associação é rompida, reduzindo drasticamente a disponibilidade de alimento e deixando o esqueleto calcário exposto, processo conhecido como branqueamento de corais (Morrow et al., 2018; Rädecker et al., 2021). Eventos de branqueamento têm se tornado mais frequentes e prolongados (Spady et al., 2025). No Brasil, um grande episódio de branqueamento em massa foi registrado em 2020 (Rodrigues et al., 2025) e, em 2024, outro evento ocorreu afetando principalmente recifes do norte e nordeste (Mies et al., no prelo). Durante esses eventos, observa-se que algumas colônias permanecem saudáveis, possivelmente devido a maior resistência fisiológica ou adaptação local, enquanto outras apresentam branqueamento intenso (Pacheco et al., no prelo). Essa variabilidade na resposta ao estresse térmico reforça a importância de investigar diferenças no desempenho de colônias em diferentes estados de saúde. Além dos impactos globais, os recifes também sofrem pressões locais resultantes de atividades humanas (Knowlton & Jackson, 2008). Entre essas pressões, a poluição por nutrientes inorgânicos se destaca por sua natureza difusa. O aporte excessivo de nitrogênio e fósforo — proveniente principalmente de esgoto doméstico, efluentes industriais e escoamento agrícola — promove a eutrofização da água, aumenta a turbidez e favorece o crescimento excessivo de algas, comprometendo a saúde e a resiliência dos corais (Häder et al., 2020; Beiras, 2008). Além dos nutrientes, outros contaminantes, como metais pesados, microplásticos e hidrocarbonetos, também podem se acumular no ambiente recifal, potencializando os impactos negativos (Menezes et al., 2023; Grillo et al., 2025). O efeito de múltiplos estressores desencadeiam respostas fisiológicas nos corais que, além de provocar o branqueamento, afetam processos essenciais como a reprodução, a calcificação e a sobrevivência, comprometendo todo o ecossistema (Fabricius, 2005; Harborne et al., 2017). Entretanto, ainda são poucos os estudos que investigam os efeitos sinérgicos entre estressores globais e locais. Por exemplo, Donovan et al. (2023) demonstraram, em recifes de Moorea, na Polinésia Francesa, que o branqueamento foi mais severo quando o estresse térmico coincidiu com altos níveis de poluição por nitrogênio, e que mesmo sob temperaturas moderadas, a presença dessa poluição intensificou significativamente a resposta de branqueamento. Esses resultados evidenciam a importância de mitigar simultaneamente ameaças locais e globais para a conservação efetiva dos recifes de corais. Assim, o presente estudo propõe investigar experimentalmente os efeitos sinérgicos do aumento da temperatura e do enriquecimento de nutrientes sobre colônias do coral *Siderastrea stellata* — principal bioconstrutor dos recifes do nordeste — em diferentes estágios de saúde: saudáveis e branqueadas. A pesquisa adota uma abordagem diferenciada, na qual o perfil proteico tanto

do coral quanto das microalgas simbiotes foi analisado, com o intuito de compreender a resposta celular dos organismos. Hipotetizamos que, sob altas concentrações de nutrientes e aumento da temperatura, tanto corais saudáveis quanto branqueados serão negativamente afetados.

Metodologia

Local de Estudo O experimento foi conduzido em amostras de corais coletadas nos Parrachos de Rio do Fogo (5° 16' 36"S, 35° 22' 45"O), no Rio Grande do Norte. A área, localizada a aproximadamente 7 km da costa, é uma Unidade de Conservação (Área de Proteção Ambiental dos Recifes de Corais - APARC) onde atividades como pesca artesanal e visitação turística são regulamentadas. Os recifes são de arenito, com profundidades de 1 a 6 metros, e sua cobertura bentônica é composta por corais escleractíneos zooxantelados, algas, esponjas, zoantídeos e cianobactérias.

Desenho Experimental O estudo investigou os efeitos do aquecimento e do enriquecimento de nutrientes na saúde de corais, utilizando a espécie *Siderastrea stellata*. Em campo, foram coletadas 16 colônias saudáveis e 16 branqueadas, com cerca de 2,5 cm de diâmetro, mantendo uma distância mínima de 10 metros entre elas para garantir a representatividade da amostra. As colônias foram transferidas para o Laboratório de Experimentação Aquática (LEXA) da UFRN, onde passaram por 7 dias de aclimação em sistemas de mesocosmo marinho. Em seguida, foram distribuídas aleatoriamente entre quatro aquários (Figura 1), cada um submetido a um tratamento distinto (n=8 colônias por sistema):

- Enriquecimento de nutrientes e aquecimento (30°C) - Sigla: EN30
- Enriquecimento de nutrientes e temperatura controlada (27°C) - Sigla: EN27
- Sem enriquecimento de nutrientes e aquecimento (30°C) - Sigla: SN30
- Controle (27°C e sem enriquecimento) - Sigla: C

A temperatura foi manipulada com termostatos, e o enriquecimento de nutrientes foi feito adicionando 3g de fertilizante NPK em sacos de malha de nylon, seguindo a metodologia de Falkenberg et al. (2014). Embora o fotoperíodo e a temperatura do ar tenham sido controlados, os sistemas de aquários constituíram pseudorréplicas para os tratamentos.

Monitoramento e Análises O estado dos corais e as condições da água foram monitorados para avaliar o impacto dos tratamentos. A cada três dias, amostras de água foram coletadas e congeladas. A quantificação dos nutrientes inorgânicos dissolvidos (ortofosfato, nitrato e nitrito) foi realizada no Laboratório de Biogeoquímica Marinha (BGQMar) da UFRN, utilizando um método colorimétrico e um espectrofotômetro UV-Vis, com base na metodologia de Grasshoff et al. (1999). O monitoramento das colônias foi realizado a cada três dias, por meio de medições da eficiência fotossintética com um fluorímetro de pulso de amplitude modulada (PAM), a fim de avaliar a capacidade fotossintética dos simbiotes, acompanhadas de registros fotográficos. As colônias foram fotografadas ao lado do CoralWatch Coral Health Chart, permitindo também uma avaliação qualitativa da coloração durante o processo de branqueamento. Além disso, no primeiro e no último dia do experimento, foram coletadas amostras de tecido para análises específicas. A remoção do tecido foi realizada com um aerógrafo e solução salina (PBS), seguindo Fonseca et al. (2019), e o líquido resultante foi homogeneizado e dividido em alíquotas para análises subsequentes. Para a contagem de células simbiotes, as amostras foram centrifugadas para separar o pellet de zooxantelas, sendo a quantificação feita em hemocitômetro e expressa em número de células por centímetro quadrado (células/cm²), calculado a partir do volume inicial da amostra e da área do tecido. A concentração de proteínas totais foi determinada no Instituto de Medicina Tropical da UFRN, utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay Kit; o procedimento envolveu a centrifugação das amostras, adição de reagentes em microplacas e leitura em espectrofotômetro a 562 nm.

Análise Estatística A análise estatística foi conduzida

para avaliar os efeitos dos fatores temperatura e enriquecimento de nutrientes e sua interação sobre as variáveis de saúde dos corais. Para isso, foi utilizado um Modelo Linear Generalizado (GLM), uma abordagem adequada para dados biológicos que não seguem uma distribuição normal. Testes post-hoc de Tukey foram aplicados para realizar comparações múltiplas entre os tratamentos quando os efeitos principais foram estatisticamente significativos. As análises foram feitas utilizando o software R.

Resultados e Discussões

O presente estudo investigou os efeitos sinérgicos do aumento da temperatura e do enriquecimento de nutrientes em colônias do coral *Siderastrea stellata*. A análise dos resultados indicou um cenário complexo, no qual as diferenças entre os tratamentos não foram estatisticamente significativas para a maioria das variáveis de saúde avaliadas em colônias saudáveis e branqueadas. A eficiência fotossintética e a cor das colônias, manteve-se constante em todas as colônias saudáveis durante o experimento (Figura 2A). A ausência de uma queda na eficiência fotossintética nos tratamentos de aquecimento (SN30) e estresse combinado (EN30) sugere uma notável resistência inicial ao estresse térmico. Essa resiliência é um traço bem documentado para a espécie *S. stellata* na literatura (Leão et al., 2003; de Barros & Pires, 2006). A capacidade dessa espécie de tolerar uma ampla gama de estressores, como sedimentação, turbidez e variações de temperatura e salinidade, é uma das razões pelas quais ela é considerada um dos principais bioconstrutores nos recifes do Atlântico Sudoeste. Além da sua resistência, a exposição prévia das colônias em campo a um evento de estresse térmico que já estava em andamento pode ter induzido um processo de aclimação. Esse fenômeno, também descrito na literatura (West and Salm, 2003), sugere que a exposição crônica ou de longo prazo a um estressor pode fortalecer a capacidade de resistência do coral, tornando-o menos suscetível a um novo evento de estresse agudo, como o simulado em nosso experimento. A densidade de simbiontes nas colônias expostas ao aumento de temperatura (SN30) foi maior do que naquelas submetidas a efeitos sinérgicos, resultado que contrasta com o observado por Patrocinio et al. (2025) para *Mussismilia hispida*. Esse padrão sugere que o aumento da temperatura exerce um impacto significativo tanto sobre a densidade de simbiontes quanto sobre o processo de branqueamento dos corais (Figura 2B). A concentração de proteínas totais demonstrou a complexidade da resposta do coral, já que as colônias submetidas ao estresse combinado (EN30) apresentaram um aumento significativo (Figura 2C). Embora esse resultado possa indicar uma resposta adaptativa de defesa, com a produção de proteínas de estresse para mitigar danos celulares, a ausência de uma análise mais específica nos impede de ter certeza. Sem a identificação detalhada dos tipos de proteínas que aumentaram, não é possível afirmar se o acréscimo foi causado por proteínas de estresse ou por outras proteínas relacionadas a diferentes processos metabólicos (Schuttenberg, 2001). Em relação às colônias branqueadas, estudos que investigam como essas colônias se comportam sob estresse são recentes e a adição de múltiplos fatores estressores torna a análise ainda mais complexa (Grottoli et al., 2014). No geral, as colônias branqueadas apresentaram um aumento na eficiência fotossintética durante os 15 primeiros dias de experimento, sugerindo um processo de recuperação (Figura 3A). No entanto, do dia 15 ao dia 21, as colônias do tratamento sinérgico (EN30) mantiveram e até aumentaram sua eficiência, um comportamento diferente do padrão visto nos tratamentos de controle (C) e apenas aquecimento (SN30). Essa resposta inesperada pode indicar uma tentativa de compensação metabólica devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes (Wiedenmann et al., 2013). A densidade de simbiontes, por outro lado, foi expressivamente maior nas colônias expostas apenas ao aquecimento (SN30) (Figura 3B). Isso pode indicar uma

estratégia por parte do coral para tentar se recuperar do estresse térmico, enquanto a adição de nutrientes no tratamento sinérgico pode ter interferido nesse processo. Além disso, a concentração de proteínas totais para os corais branqueados aumentou nos 15 primeiros dias em todos os tratamentos. Essa resposta generalizada sugere uma mobilização inicial de recursos celulares para enfrentar as novas condições ambientais, independentemente do tipo de estressor (Figura 3C). A complexidade desses resultados ressalta a necessidade de mais pesquisas sobre como múltiplos estressores afetam corais que já estão em condição de saúde comprometida.

Conclusão

O presente estudo demonstrou a complexa resposta do coral *Siderastrea stellata* a estressores globais (temperatura) e locais (nutrientes), mesmo sem encontrar diferenças estatisticamente significativas. As colônias saudáveis mostraram resiliência e aclimação, mantendo sua eficiência fotossintética e densidade de simbiontes. Já as colônias branqueadas exibiram uma resposta mais intrincada, com a eficiência fotossintética no tratamento de estresse combinado aumentando, possivelmente por uma tentativa de compensação metabólica. A complexidade desses resultados ressalta a importância de entender a ecofisiologia dos corais brasileiros, que podem exibir traços de resistência únicos em comparação a outras regiões. A pesquisa destaca a necessidade urgente de mais estudos que busquem compreender, em nível celular, as respostas desses organismos a impactos sinérgicos. A combinação de abordagens experimentais com análises moleculares é crucial para identificar os mecanismos de adaptação e vulnerabilidade dos corais, fornecendo informações essenciais para estratégias de conservação mais eficazes.

Referências

Beiras, R. (2018). Marine pollution: sources, fate and effects of pollutants in coastal ecosystems. Elsevier. Donovan, M. K., Adam, T. C., Shantz, A. A., Speare, K. E., Munsterman, K. S., Rice, M. M., ... & Burkepile, D. E. (2020). Nitrogen pollution interacts with heat stress to increase coral bleaching across the seascape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(10), 5351-5357. de Barros, M. M. L., & Pires, D. O. (2006). Aspects of the life history of *Siderastrea stellata* in the tropical Western Atlantic, Brazil. *Invertebrate Reproduction & Development*, 49(4), 237-244. Falkenberg, L. J., Connell, S. D., & Russell, B. D. (2014). Herbivory mediates the expansion of an algal habitat under nutrient and CO₂ enrichment. *Marine Ecology Progress Series*, 497, 87-92. 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. Grillo, A. C., Inagaki, K. Y., Costa, P. G., Salvi, K. P., Lacerda, C. H., Mies, M., ... & Longo, G. O. (2025). Differential effects of iron enrichment on corals competing with macroalgae and zoantharians. *Environmental Pollution*, 371, 125944. Grottoli, A. G., Rodrigues, L. J., & Palardy, J. E. (2006). Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature*, 440(7088), 1186-1189. Häder, D. P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of the Total environment*, 713, 136586. Harborne, A. R., Rogers, A., Bozec, Y. M., Mumby, P. J. (2017). Multiple stressors and the functioning of coral reefs. *Annual Review of Marine Science*, 9, 445-468. Higuchi, T., Yuyama, I., Nakamura, T. (2015). The combined effects of nitrate with high temperature and high light intensity on

coral bleaching and antioxidant enzyme activities. *Regional Studies in Marine Science*, 2(Supplement), 27-31. Hughes, T. P., Barnes, M. L., Bellwood, D. R., Cinner, J. E., Cumming, G. S., Jackson, J. B., ... & Scheffer, M. (2017). Coral reefs in the Anthropocene. *Nature*, 546(7656), 82-90. IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 35-115. Knowlton, N., & Jackson, J. B. C. (2008). Shifting baselines, local impacts, and global change on coral reefs. *PLoS biology*, 6(2), e54. Leão, Z. M., Kikuchi, R. K., & Testa, V. (2003). Corals and coral reefs of Brazil. In *Latin American coral reefs* (pp. 9-52). Elsevier Science. Menezes, N., Cruz, I., da Rocha, G. O., de Andrade, J. B., & Leão, Z. M. (2023). Polycyclic aromatic hydrocarbons in coral reefs with a focus on Scleractinian corals: A systematic overview. *Science of The Total Environment*, 877, 162868. Morrow, K. M., Muller, E., & Lesser, M. P. (2018). How does the coral microbiome cause, respond to, or modulate the bleaching process?. In *Coral bleaching: Patterns, processes, causes and consequences* (pp. 153-188). Cham: Springer International Publishing. Rådecker, N., Pogoreutz, C., Gegner, H. M., Cárdenas, A., Roth, F., Bougoure, J., ... & Voolstra, C. R. (2021). Heat stress destabilizes symbiotic nutrient cycling in corals. *Proceedings of the national academy of sciences*, 118(5), e2022653118. Rodrigues, R. R., Gonçalves Neto, A. H., Vieira, E. A., & Longo, G. O. (2025). The severe 2020 coral bleaching event in the tropical Atlantic linked to marine heatwaves. *Communications Earth & Environment*, 6(1), 208. Schuttenberg, H. Z. (2001, October). Coral bleaching: causes, consequences, and response. In *Selected Papers presented at the 9th International Coral Reef Symposium on Coral Bleaching: Assessing and Linking Ecological and Socioeconomic Impacts, Future Trends and Mitigation Planning*. Coastal Resources Center, Univ. of Rhode Island. Spady, B. L., Skirving, W. J., Jacqueline, L., Geiger, E. F., Liu, G., Hoegh-Guldberg, O., ... & Manzello, D. P. (2025). The 4th Global Coral Bleaching Event: Unprecedented, unbounded, unrelenting. Steffen, W., Grinevald, J., Crutzen, P., & McNeill, J. (2011). The Anthropocene: conceptual and historical perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, physical and engineering sciences*, 369(1938), 842-867. Patrocinio, G. T. A., Lopes, F. C., Ciotti, Á. M., Faria, S. C., & Martins, C. D. M. G. (2025). The Southwestern Atlantic coral *Mussismilia hispida* exhibit remarkable tolerance to nitrate enrichment. *Coral Reefs*, 1-14. West, J. M., & Salm, R. V. (2003). Resistance and resilience to coral bleaching: implications for coral reef conservation and management. *Conservation biology*, 17(4), 956-967. Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Smith, E. G., Hunt, A. N., Legiret, F. E., Postle, A. D., & Achterberg, E. P. (2013). Nutrient enrichment can increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*, 3(2), 160-164.

Anexos

Figura 1. Desenho experimental do estudo com colônias de *Siderastrea stellata* (saudáveis e branqueadas) em mesocosmo marinho durante 21 dias. Foram aplicados quatro tratamentos: (1) Enriquecimento de nutrientes e aquecimento (30°C), (2) Enriquecimento de n

Figura 2. Respostas das colônias saudáveis aos tratamentos. (A) Eficiência fotossintética. (B) Densidade de simbiontes. (C) Proteínas totais nas colônias. (D) Proteínas totais nos simbiontes. A primeira barra de cada gráfico (cinza) corresponde ao dia ini

Figura 3. Respostas das colônias branqueadas aos tratamentos. (A) Eficiência fotossintética. (B) Densidade de simbiontes. (C) Proteínas totais nas colônias. (D) Proteínas totais nos simbiontes. A primeira barra de cada gráfico (cinza) corresponde ao dia i

CÓDIGO: SB1047

AUTOR: LUANA SUELLEN LIMA DE OLIVEIRA SILVA

COAUTOR: HÉLIDA MARAVILHA DANTAS E SOUSA ALMEIDA

ORIENTADOR: ALIANDA MAIRA CORNELIO DA SILVA

TÍTULO: Existe relação entre anticoncepcionais hormonais e a patogênese da esclerose múltipla em mulheres?

Resumo

A Esclerose Múltipla é uma doença crônica inflamatória que causa desmielinização no sistema nervoso central e uma resposta neurodegenerativa progressiva. Embora ambos os sexos possam ser acometidos, o tipo clínico Remitente-Recorrente apresenta prevalência significativamente maior em mulheres, com uma proporção de 3:1 em relação aos homens. Algumas pesquisas apresentam possíveis fatores genéticos, ambientais, virais e hormonais envolvidos no desenvolvimento da doença, mas ainda não há explicação definitiva para maiores prevalências no público feminino. Considerando que é crescente o uso de contraceptivos hormonais por mulheres em idade fértil, este trabalho tem como objetivo investigar a relação entre os hormônios exógenos e a progressão da doença em mulheres. Para isso, foi realizada uma triagem nas bases de dados PubMed, Scopus, Embase e Web Of Science. Foram eleitos vinte estudos para compor a revisão integrativa, com o nível de evidência avaliado pela aplicação do Methodological Quality Scale (MQS). A redação do estudo seguiu o protocolo para confecção de estudos integrativos. Os resultados obtidos apontam indícios de que o uso de contraceptivos não está associado ao agravamento da incapacidade e da gravidade da doença, à elevação das taxas de recaída anual ou à formação de novas lesões cerebrais em mulheres com esclerose múltipla.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Hormônios exógenos. Anticoncepcionais hormonais.

TITLE: Is there a relationship between hormonal contraceptives and the pathogenesis of multiple sclerosis in women?

Abstract

Multiple Sclerosis is a chronic inflammatory disease that causes demyelination in the central nervous system and a progressive neurodegenerative response. Although both sexes can be affected, the Relapsing-Remitting clinical type has a significantly higher prevalence in women, with a ratio of 3:1 to men. Some studies have shown possible genetic, environmental, viral and hormonal factors involved in the development of the disease, however, there is still no definitive explanation for the

higher prevalence in women. Considering the increasing use of hormonal contraceptives by women of childbearing age, this study aims to investigate the relationship between exogenous hormones and the progression of the disease in women. For this purpose, a screening was performed in the PubMed, Scopus, Embase and Web of Science databases. Twenty studies were selected to compose the integrative review, with the level of evidence assessed by applying the Methodological Quality Scale (MQS). The study was written according to the protocol for preparing integrative studies. The results obtained indicate that the use of contraceptives is not associated with worsening of disability, severity of the disease, increased annual relapse rates or the formation of new brain lesions in women with multiple sclerosis.

Keywords: Multiple sclerosis. Exogenous hormones. Hormonal contraceptives.

Introdução

A Esclerose Múltipla (EM) tornou-se tema de grande interesse na prática clínica ao longo das décadas, assim como em estudos laboratoriais envolvendo um modelo animal, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE). No entanto, a patogênese da EM apresenta uma interação complexa entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico, permanecendo a sua etiologia ainda indefinida (Imamura et al., 2020; Correale, 2017).

A EM é caracterizada pela manifestação de áreas inflamatórias, desmielinização, gliose e degeneração axonal no SNC (Kuhlmann et al., 2002). Os sintomas variam de acordo com a localização/extensão da lesão e estão comumente associados a neurite óptica, parestesia, fraqueza, redução da mobilidade, disfunção dos esfíncteres do intestino e da bexiga, comprometimento da função cognitiva e bulbar (Tafti et al., 2024). Embora ambos os sexos possam ser acometidos, o tipo clínico Remitente-Recorrente apresenta maior prevalência em mulheres, com uma proporção de 3:1 em relação aos homens (Subramanian et al., 2003; Koch-Henriksen; Sørensen, 2010).

Algumas pesquisas apresentam possíveis fatores responsáveis pelo desenvolvimento geral da EM, variando desde gatilhos ambientais, genéticos, virais e hormonais, porém ainda não foram elucidados os elementos que são determinantes para a maior proporção do acometimento ser em mulheres e não em homens (Goodin, 2021; Tarlinton et al., 2020; Haki et al., 2024). No sexo feminino, é conhecido que as diversas fases de desenvolvimento corporal e fisiológico, especialmente a ação dos hormônios sexuais como o estrogênio e a progesterona, desempenham papéis cruciais no curso da EM e na diferenciação da progressão da doença entre os sexos (Ysraelit; Correale, 2019).

Diante dessa lacuna, torna-se relevante analisar a influência hormonal no risco de progressão da esclerose múltipla em mulheres, sobretudo considerando o uso de anticoncepcionais hormonais. Dessa forma, essa pesquisa visa revisar a literatura para responder a seguinte questão: existe relação entre anticoncepcionais hormonais e a patogênese da esclerose múltipla em mulheres?

Metodologia

O estudo adotou uma abordagem qualitativa assumindo o percurso metodológico de revisão integrativa da literatura. Esse método consiste em uma análise rigorosa da bibliografia científica para responder ao tema proposto. Para tanto, esse processo é sistematizado, a partir dos sete passos necessários para garantir a validade e a qualidade da revisão. Essas etapas incluem a definição do conceito e da pergunta de pesquisa, determinação da estratégia de busca, pesquisa em bancos de dados e coleta de artigos relevantes, organização, extração e tabulação dos dados, avaliação de possíveis vieses, confronto e análise crítica dos dados, e síntese dos achados com as respectivas conclusões (Kutcher; Lebaron, 2022; Dhollande et al., 2021).

A busca de artigos científicos ocorreu nos seguintes bancos de dados eletrônicos: PubMed, Scopus, Embase e Web Of Science (WOS), visando a seleção de trabalhos sobre a relação entre o uso de contraceptivos no desenvolvimento e a esclerose múltipla em mulheres. Dessa forma, os termos de busca para a coleta dos artigos foram apresentados a partir da seguinte fórmula: ("multiple sclerosis") AND (women OR female OR females) AND ("sex hormones" OR estrogen OR progesterone OR "sex hormone") AND (contraceptives OR "birth control" OR "oral contraceptives" OR "hormonal contraceptives"). As buscas nos sítios eletrônicos ocorreram entre os meses de junho e julho de 2024, e foram realizadas de modo individual em cada base de dados.

As publicações identificadas através das pesquisas nas bases de dados foram inseridas na plataforma Rayyan, que é uma ferramenta online desenvolvida para auxiliar pesquisadores na gestão de revisões bibliográficas, em especial na avaliação duplo-cega dos trabalhos. Os critérios de inclusão consideraram publicações com resumo em língua inglesa, contendo as palavras-chave em seu título ou resumo. Não foram definidos limites temporais. A seleção dos artigos para leitura na íntegra e avaliação ocorreu com a aplicação dos critérios de exclusão, que corresponderam aos artigos que não possuíam um método explicitando o uso e o tipo de contraceptivo hormonal, assim como os hormônios usados pela população; investigações que correlacionavam a esclerose múltipla em mulheres e/ou animais fêmeas com terapias contraceptivas não hormonais; revisões narrativas, sistemáticas, meta-análises, artigos de opinião e anais de congresso.

O risco de viés foi avaliado a partir do protocolo MQS (Methodological Quality Scale) (Chacón-moscoso et al., 2023). As classificações foram feitas a partir da média atribuída aos critérios de validade externa, interna e de constructo. A pontuação referente a cada um desses aspectos da obra foi classificada em alta ($>0,75$), média ($0,5-0,75$) ou baixa ($<0,5$) qualidade metodológica, sendo diretamente proporcional ao nível de confiança da evidência e inversamente proporcional ao risco de viés. Posteriormente, esses resultados foram submetidos ao software online RobVis para geração do gráfico (McGuinness; Higgins, 2020).

Seguindo o protocolo de revisão integrativa, os dados extraídos foram cruzados e avaliados criticamente, usando a discussão com base no confronto da literatura científica, para a produção de elucidações e conclusões acerca da participação da

modulação hormonal exógena e seus efeitos neurobiológicos frente ao processo patológico da esclerose múltipla em mulheres. Devido ao tipo de método empregado, este estudo dispensou o julgamento e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), uma vez que não se trata de uma pesquisa de natureza experimental.

Resultados e Discussões

De acordo com os dados apresentados no fluxograma de seleção dos artigos (Figura 1), foram identificadas um total de 453 publicações, sendo: 47 artigos na PubMed, 90 artigos na Scopus, 245 na Embase e 71 artigos na WOS. O processo resultou em 50 estudos eleitos para recuperação e leitura completa, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Entre eles, sete trabalhos estavam indisponíveis. Dos 43 estudos restantes, foram excluídos quatro trabalhos duplicados e dezenove por não atenderem aos critérios de elegibilidade do estudo: um por se tratar de trabalho de revisão, quatro por serem publicações de anais de evento, um por não estar relacionado a pacientes diagnosticados com esclerose múltipla, três por não responderem a questão da pesquisa, dois por considerarem a participação da população masculina, dois pela ausência de terapia contraceptiva e seis por não especificarem o tipo de hormônio. Portanto, esta revisão contou com a análise de 20 artigos, os quais atendiam a todos os critérios propostos nas etapas de sistematização metodológica.

A confiabilidade das metodologias adotadas e os resultados obtidos pelos artigos selecionados foram avaliados por meio do MQS. Os estudos foram categorizados quanto à validade externa (refere-se à medida em que os resultados do estudo podem ser generalizados), validade interna (indica o grau em que um estudo estabelece com precisão uma relação de causa e efeito entre as variáveis) e validade constructo (relaciona-se a quão bem um teste mede a construção que se destina a medir). Utilizou-se a ferramenta RoBvis para a construção do Figura 2, com o objetivo de avaliar o risco de viés considerando a pontuação média atribuída para cada uma das validades, seja classificada em: baixo risco, risco moderado e alto risco de viés. Com base no critério de validade externa (D1), 45% dos estudos foram classificados como de baixo risco, 10% como de risco moderado e 45% como de alto risco. Quanto à validade interna (D2), 10% apresentaram baixo risco, 55% moderado e 35% alto risco. Já no critério de validade de constructo (D3), 65% dos estudos demonstraram baixo risco e 35% risco moderado.

Considerando a análise das publicações, todos os 20 artigos incluídos neste trabalho correspondem à avaliação da atuação hormonal exógena em mulheres que possuem esclerose múltipla, envolvendo a administração direta do hormônio (modelo in vivo) (n=10 estudos) e a análise por meio de dados prévios em registros eletrônicos em saúde (n=10 estudos). Dentre os que estão relacionados à administração hormonal (n=10), seis estudos envolveram modelos animais fêmeas e quatro estudos mulheres diagnosticadas com esclerose múltipla. Quanto ao tipo hormonal induzido, a maioria dos estudos (n=5) avalia a combinação entre estrógenos e progestágenos, conforme observado no gráfico 1. A administração do estriol (E3) oral (8 mg) + noretindrona oral (0,7 mg) por 24 meses foi associada a

efeitos de neuroproteção após análise post-hoc de ressonância magnética das participantes, revelando uma menor atrofia na substância cinzenta cortical no grupo estriol que no grupo placebo (Voskuhl et al., 2016).

O 17 β -estradiol (E2) transdérmico (75 μ l/semana) + acetato de nomegestrol oral (5mg/dia, 10mg/dia), por outro lado, não mostraram eficácia na prevenção de recaídas pós-parto em mulheres puérperas, e nenhum dos resultados clínicos ou de ressonância magnética foram significativos após 12 semanas de estudo (Vukusic et al., 2020). Em estudos realizados por De Giglio et al. (2017); Giglio et al. (2015), o uso de etinilestradiol (EE) oral (20/40 mg) + desogestrel oral (150/125 mg) exerceu efeitos protetivos contra o declínio cognitivo, pois, em combinações constituídas por doses maiores de EE (40 mg) + desogestrel oral (125 mg) + IFN- β , as mulheres possuíram menor comprometimento cognitivo do que àquelas em que foram tratadas apenas com IFN- β .

O estradiol (25 mg) + pellet de progesterona (20/100 mg) administrado em modelos de camundongos C57BL/6 fêmeas se mostrou mais eficiente no grupo tratado com a terapia combinada do que no grupo em que foi administrado apenas a progesterona. Os sinais de EAE foram retardados em até dois dias em animais tratados com progesterona, com menor número de células inflamatórias na substância branca e desmielinização reduzida pela metade em relação ao grupo controle, enquanto a infiltração foi quase insignificante na terapia combinada (Garay et al., 2008).

Ainda, um (n=01) estudo avalia somente a ação de progestágenos por meio da indução de Nestorone (NES) (0,4 mg/kg) via subcutânea por 10 dias após a indução de EAE em camundongos C57BL/6 fêmeas. O tratamento com Nestorone resultou em uma redução no grau clínico de EAE, melhor desempenho motor dos animais afetados, aumento da proliferação celular e neuroblastos, bem como diminuição das células inflamatórias Iba1+ no hipocampo dos camundongos tratados (Garay et al., 2014).

Na pesquisa desenvolvida por El-Etr e colaboradores (2021) avalia individualmente a ação de progestágenos e estrógenos em camundongos C57/Bl6 fêmeas: em um grupo é administrado o Nestorone (8 μ g/dia) subcutaneamente através de bombas osmóticas e em outro o Nestorone + estradiol (1 μ g/dia) subcutaneamente por meio de bombas osmóticas. O NES sozinho favoreceu a remielinização e aumentou a produção de Myt1, Olig2 e Sox17, três fatores de transcrição envolvidos na síntese de mielina após uma semana de administração, sendo, isoladamente, eficaz em promover a remielinização e em aumentar a produção de fatores de transcrição essenciais, enquanto o E2 não teve um efeito adicional significativo quando combinado com NES.

Dessa forma, observa-se que, nestes estudos, os hormônios apresentaram efeito no retardo do surgimento e na redução dos sintomas neurodegenerativos e inflamatórios, à exceção da publicação por Vukusic et al. (2020), em que nenhuma diferença pôde ser mostrada em relação aos resultados clínicos e de ressonância magnética. A distribuição do tipo hormonal administrado pode ser observada nos gráficos 2A e 2B.

Em relação aos estudos que obtiveram dados prévios em registros eletrônicos em saúde (n=10 estudos), é observado que todos incluíam mulheres que faziam uso de pílulas anticoncepcionais combinadas. Em destaque, o único estudo encontrado nesta seleção que aborda sobre um possível efeito negativo associado aos contraceptivos é o de Hellwig et al. (2016). O uso de contraceptivos orais (COs) foi associado a um aumento do risco de EM em mulheres, independentemente dos grupos definidos como sempre, atual, anterior e nunca utilizado. Neste estudo, poucas mulheres usaram anticoncepcionais orais somente de progestágeno (13 casos e 140 controles), agentes não orais (adesivo 14 casos e 140 controles; anel vaginal 16 casos e 128 controles) ou alta dose de estrogênio (50 µg) (2 casos e 18 controles) e, portanto, estes pequenos grupos não apresentaram valores estatísticos significativos. Considerando os COs combinados, mulheres que faziam uso de Levonorgestrel e Noretindrona demonstraram maior aumento de risco.

Ademais, dentre os 10 estudos, três não identificaram efeito dos contraceptivos durante o curso da doença e/ou suscetibilidade à EM. Thorogood & Hannaford (1998), em um estudo de coorte, não observaram diferença significativa entre grupos de usuárias com EM que faziam uso passado ou atual de COs em comparação àquelas que nunca fizeram uso. No estudo de caso-controle realizado por Zhang et al., (2024) também não foram encontradas evidências relacionando o uso de CO (pílulas combinadas e pílulas somente de progesterona) e diagnóstico da EM.

Contudo, também são demonstrados efeitos positivos da pílula combinada (n=6). Kempe et al. (2015) avaliou um grupo de mulheres com esclerose múltipla com o objetivo de verificar o grau de sintomas relacionados à doença ao longo do ciclo em que faziam uso de pílulas combinadas. Foram selecionadas 22 mulheres que utilizavam contraceptivos orais (14 mulheres: 30 mg de EE diariamente (regime monofásico); 1 mulher: 35 mg de EE diariamente (regime monofásico); 5 mulheres: 30-40 mg de EE diariamente (regime trifásico), 1 mulher que fazia uso de anel vaginal e 1 mulher que utilizava adesivo transdérmico, mas, em todas as situações, o tipo de progestágeno não foi especificado. Neste estudo, foram calculados a pontuação média para cada um dos dez sintomas durante a fase de alto nível de estrogênio/progestágeno circulante com a pílula (15-21 do ciclo) e baixo nível de estrogênio/progestágeno circulante sem a pílula (22-28 do ciclo) ao longo de três ciclos. Os autores observaram que as mulheres apresentaram quatro (fraqueza, rigidez, vertigem e sintomas urinários) dos dez sintomas significativamente mais altos durante a semana em que houve baixos níveis de esteróides do que durante a fase de pílula, relacionando a um possível efeito de EE.

Por fim, Chen et al. (2020) avalia se as diferenças no tipo de CO (combinação contínua vs. combinados cíclicos) estão associadas a diferenças na atividade inflamatória da EM. A composição do contraceptivo oral cíclico (hormônios por 21 dias seguido por 7 dias de placebo) correspondeu a diferentes grupos de progestágenos combinados com o EE: levonorgestrel, norgestimato e norgestrel, enquanto que a composição do contraceptivo oral contínuo (doses contínuas por até 3 meses) correspondeu a levonorgestrel + etinilestradiol, em que as mulheres pertencentes ao grupo de COs contínuos apresentaram menor atividade inflamatória na ressonância magnética do que no grupo de COs cíclicos.

Ao analisar os 20 estudos incluídos, observou-se que 16 deles evidenciaram efeitos positivos dos hormônios ao longo do curso da doença, sendo que seis desses estudos focaram em terapias de regeneração utilizando modelos animais. Por outro lado, três estudos não identificaram relação significativa entre o uso de contraceptivos orais e o EM, enquanto um único estudo discutiu um possível efeito negativo associado ao uso de CO. Os resultados obtidos apontam indícios de que o uso de contraceptivos não está associado ao agravamento da incapacidade e da gravidade da doença, à elevação das taxas de recaída anual ou à formação de novas lesões cerebrais em mulheres com esclerose múltipla. Além disso, todos os estudos pré-clínicos envolvendo modelos EAE e modelos cuprizona foram eficazes em estimular neuroprotetores.

A esclerose múltipla é resultado de um processo degenerativo neuronal ocasionado pela exacerbação da resposta imunológica, e que afeta predominantemente o público feminino em idade reprodutiva (D'Anca et al., 2023). A prescrição de contraceptivos para essas mulheres é comum, tornando-se relevante, na atualidade, pesquisas sobre os efeitos dos métodos anticoncepcionais ao longo do curso da doença (Houtchens et al., 2024).

Nesse contexto, os derivados de estrogênio e de progesterona podem estar envolvidos na mielinização e remielinização neuronal, contribuindo para indução de efeitos protetores. Essa hipótese pode ser sustentada pela estrutura lipossolúvel de suas moléculas, que facilita a passagem através da barreira hematoencefálica e a entrada nas células por difusão passiva, permitindo ligação aos receptores de estrogênio (ER α e ER β) e de progesterona (PR-A e PR-B) em regiões nucleares e extranucleares (Brotfain et al., 2016). Seus efeitos são mediados por receptores, aos quais são encontrados expressos em neurônios e células gliais no lobo olfatório, córtex, cerebelo e hipocampo (Singh; Su, 2012).

Dessa forma, os processos de mielinização, fundamentais para a integridade neuronal, podem ser mediados por vias dependentes de PR e de ER. Esses resultados são sustentados a partir de um estudo pré-clínico realizado por El-Etr et al. (2015), em que um grupo de camundongos knockout do PR teve o processo de remielinização menos eficiente, mesmo após o tratamento com Nestorone, em comparação aos níveis significativos de remielinização no grupo tratado com expressão de PR.

Ademais, em um estudo realizado por Kaur e colaboradores (2007), observou-se que a progesterona desempenhou um papel importante no aumento dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) no córtex cerebral, tanto em termos de proteína quanto de mRNA. O BDNF é uma proteína que atua diretamente no desenvolvimento, na diferenciação e na sobrevivência neuronal, além de ser capaz de promover a regeneração axonal e induzir a neuroproteção por células imunes periféricas e pela micróglia e/ou astrócitos dentro do SNC (Nociti; Romozzi, 2023). Na literatura, é visto que a capacidade de expressão de mRNA e proteínas BDNF requer a presença do PR intracelular para a potencialização da expressão proteica (Jodhka et al., 2009).

Os efeitos de neuroproteção, entretanto, podem variar conforme o tipo de hormônio e as suas dosagens, em especial entre formulações sintéticas, como estrógenos e progestágenos (Ribeiro, 2018). O estriol é conhecido por ter sua concentração

aumentada durante a gravidez, e seu papel neuroprotetor é apoiado pela constatação de que ocorre uma diminuição no número de recaídas durante o terceiro trimestre de gestação na EM (Ali et al., 2017; Confavreux et al., 1998). Nas formulações sintéticas, é um composto presente em terapias hormonais, utilizado para alívio dos sintomas da menopausa (Takahashi et al., 2000). No estudo de Voskuhl et al. (2016) foi bem tolerado, assim como foi associado a efeitos mais potentes do que o estradiol por Jansson et al. (1994). Apesar de possuir menor afinidade aos receptores estrogênicos do que o estradiol, é provável que o E3 atue como um antagonista de E2 quando ambos são administrados conjuntamente, modulando a conformação do ER necessária à interação efetiva do estradiol e aumentando o potencial E3 (Melamed et al., 1997).

Por outro lado, nos resultados de Subramanian et al. (2003), é visto que o grupo EE favoreceu a produção de citocinas anti-inflamatórias de forma mais eficaz do que o grupo estradiol. Isso reflete a complexidade da sinalização estrogênica, uma vez que o ER apresenta expressão diversificada em células imunológicas e em tecidos, o que resulta na ativação de diferentes vias de sinalização e produção de efeitos variados quando induzidos tipos diferentes de estrógenos (Khan; Ansar, 2016).

Considerando os efeitos dos progestágenos, o Nestorone provocou efeitos mais consistentes. O NES apresenta maior afinidade aos PRs quando comparado à progesterona, bem como efeito androgênico ausente (Kumar et al., 2017; Vigo et al., 2011). Os resultados de El-Etr et al. (2021) e Garay et al. (2014) confirmam esses achados, pois o Nestorone alcançou eficácia isoladamente: baixas doses NES se mostraram igualmente potentes a altas doses de progesterona. El-Etr e colaboradores (2021), também observam que a combinação de Nestorone e E2 não se mostrou tão eficaz na produção de oligodendrócitos quanto à administração isolada do NES.

Quanto ao papel anti-inflamatório desempenhado após a administração dos progestágenos, é observado que a progesterona é capaz de atuar na diferenciação de células Treg, promover a diminuição de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-6 e TNF- α , assim como a diminuição da síntese de óxido nítrico pelos macrófagos (D'Anca et al., 2023).

O fator de risco associado ao uso de contraceptivos por Hellwig et al. (2016) pode estar relacionado às variáveis de índice de massa corporal (IMC), histórico de tabagismo e paridade consideradas. Tem sido sugerido analisar resultados com cautela e a realização de estudos futuros que considerem esses fatores de confusão, pois, na literatura, é visto que o tabagismo e a obesidade são gatilhos para a suscetibilidade à EM (Schreiner; Genes, 2021; Nishanth et al., 2020).

Entretanto, certos pontos não foram esclarecidos de forma satisfatória, como a interação medicamentosa das Terapias Modificadoras da Doença (DMTs) com os contraceptivos. Uma vez que 10 estudos consistiam em um desenho retrospectivo e, que possuíam informações coletadas por meio de bancos eletrônicos, não foi possível obter apropriadamente dados sobre dosagem, duração do uso e possíveis efeitos colaterais associados. De tal modo, não pode ser descartada a possibilidade de erros na classificação de usuárias/nunca usuárias de COCs durante a coleta de dados, ou até mesmo mulheres que não lembraram corretamente o seu histórico de uso de contraceptivos. Além disso, mesmo em estudos que envolviam a

administração direta do hormônio, os grupos foram manipulados com doses variadas, o que não permitiu a realização de comparativos. Por isso, a relação entre dosagem e neuroproteção não foi estabelecida.

Em relação ao estágio investigado da doença, o tipo predominante nos estudos selecionados é a Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente (EMRR), seguido por estudos com modelos pré clínicos, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) (figura 3). A maioria dos artigos encontrados na literatura utiliza o fenótipo EMRR como população-alvo, possivelmente associado à sua maior prevalência. Dessa forma, uma limitação encontrada é que nenhum desses estudos se concentrou exclusivamente em mulheres com quadros Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP) ou Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP), de modo a avaliar especificamente a resposta ao CO dentro dessas populações.

Ainda, o número de artigos incluídos considerando a administração hormonal foi relativamente baixo. Isso revela a necessidade de realização de pesquisas científicas envolvendo a manipulação de esteroides, em especial estudos randomizados e pré-clínicos, para a construção de respostas sólidas quanto à atuação dos hormônios frente à esclerose múltipla.

Por fim, os resultados obtidos estão em conformidade com os achados descritos na literatura científica, alinhando-se ao objetivo da pesquisa. Diante da prevalência da doença, recomenda-se a avaliação dos efeitos hormonais a longo prazo para instituir novos potenciais de proteção para EM.

Conclusão

Evidências na literatura sugerem que o estrogênio e a progesterona exógena podem fornecer efeitos protetores a mulheres com esclerose múltipla, além de serem capazes de promover a regeneração de oligodendrócitos em modelos pré-clínicos da doença. A maioria dos estudos analisados aponta para uma associação favorável entre a exposição aos anticoncepcionais combinados e diminuição de risco ou progressão da EM.

Apesar do número baixo de estudos selecionados para compor o grupo de administração direta do hormônio, o nível de evidências foi considerado entre bom e médio. Ademais, ressalta-se a necessidade de pesquisas investigativas que explorem o potencial hormonal com maior aprofundamento a partir de estudos pré-clínicos e randomizados, a fim de que seus efeitos sejam avaliados isoladamente e/ou em conjunto de DMTs. Por fim, este estudo torna-se relevante à medida que investiga uma possível alternativa de indução de efeitos protetores durante o curso da esclerose múltipla, além de apresentar informações que podem ser utilizadas como base para pesquisas futuras.

Referências

ALI et al. Estriol: emerging clinical benefits. *Menopause*, v. 24, n. 9, p. 1081-1085, 2017.

BROTFAIN et al. Neuroprotection by estrogen and progesterone in traumatic brain injury and spinal cord injury. *Current neuropharmacology*, v. 14, n. 6, p. 641-653, 2016.

CHACÓN-MOSCOSO et al. The Methodological Quality Scale (MQS) for intervention programs: validity evidence. *Frontiers in Psychology*, 2023.

CHEN et al. Comparison of MS inflammatory activity in women using continuous versus cyclic combined oral contraceptives. *Multiple sclerosis and related disorders*. 2020.

CONFAVREUX et al. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 5, p. 285-291, 1998.

CORREALE et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*, v. 140, n. 3, p. 527-546, 2017.

D'ANCA et al. Why Is Multiple Sclerosis More Frequent in Women? Role of the Immune System and of Oral and Gut Microbiota. *Applied Sciences*, v. 13, n. 10, p. 5881, 2023.

DE GIGLIO et al. Effect on cognition of estroprogestins combined with interferon beta in multiple sclerosis: analysis of secondary outcomes from a randomised controlled trial. *CNS drugs*, v. 31, p. 161-168, 2017.

DE GIGLIO et al. The combination of subcutaneous interferon beta 1a with oral contraceptives with high dose oestrogens improves cognitive impairment of women with multiple sclerosis. In: *Multiple Sclerosis Journal*, p. 508-509, 2013.

DHOLLANDE et al. Conducting integrative reviews: a guide for novice nursing researchers. *Journal of Research in Nursing*, v. 26, n. 5, p. 427–438, 1 ago. de 2021.

EL-ETR et al. Nestorone®, a 19nor-progesterone derivative boosts remyelination in an animal model of demyelination. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 27, n. 4, p. 464-469, 2021.

EL-ETR et al. Progesterone and nestorone promote myelin regeneration in chronic demyelinating lesions of corpus callosum and cerebral cortex. *Glia*, v. 63, n. 1, p. 104-117, 2015.

GARAY et al. Efficacy of the selective progesterone receptor agonist Nestorone for chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, v. 276, n. 1-2, p. 89-97, 2014.

GARAY et al. Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, v. 15, n. 1, p. 76-83, 2008.

GOODIN et al. The nature of genetic and environmental susceptibility to multiple sclerosis. *PLoS One*, v. 16, n. 3, 22 de mar. de 2021.

HAKI et al. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. *Medicine*, v. 103, n. 8, 23 fev. 2024.

HELLWIG et al. Oral contraceptives and multiple sclerosis/clinically isolated syndrome susceptibility. PLoS One, v. 11, n. 3, 2016.

HOUTCHENS et al. Contraception for women with multiple sclerosis: Guidance for healthcare providers. Multiple Sclerosis Journal, v. 23, n. 6, p. 757-764, 2017.

IMAMURA et al. Anti-Kir4.1 Antibodies in Multiple Sclerosis: Specificity and Pathogenicity. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 24, p. 9632, 2020.

JANSSON et al. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. Journal of neuroimmunology, v. 53, n. 2, p. 203-207, 1994.

JODHKA et al. The differences in neuroprotective efficacy of progesterone and medroxyprogesterone acetate correlate with their effects on brain-derived neurotrophic factor expression. Endocrinology, v. 150, n. 7, p. 3162-3168, 2009.

KAUR et al. Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner

in cerebral cortical explants. Journal of neuroscience research, v. 85, n. 11, p. 2441-2449, 2007.

KEMPE et al. Symptoms of multiple sclerosis during use of combined hormonal contraception. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 193, p. 1-4, 2015.

KHAN, D; ANSAR, A. S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. Front Immunol, 2016.

KOCH-HENRIKSEN, N.; SØRENSEN, P. S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. The Lancet Neurology, v. 9, n. 5, p. 520-532, 2010.

KUHLMANN et al. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. Brain, v. 125, n. 10, p. 2202-2212, 2002.

KUMAR et al. Nestorone® as a Novel Progestin for Nonoral Contraception: Structure-Activity Relationships and Brain Metabolism Studies. Endocrinology, v. 158, n. 1, p. 170-182, 2017.

KUTCHER, A. M.; LEBARON, V. T. A simple guide for completing an integrative review using an example article. Journal of Professional Nursing, v. 40, p. 13–19, 1 maio 2022.

LUBLIN et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology. v. 83, n. 3, p. 278-286, 2014.

MCGUINNESS, L.A.; HIGGINS, J.P.T. Risk-of-bias VISualization (robvis): Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Research synthesis methods*, v. 12, n. 1, p. 55-61, 2021.

MELAMED et al. Molecular and kinetic basis for the mixed agonist/antagonist activity of estriol. *Molecular Endocrinology*, v. 11, n. 12, p. 1868-1878, 1997.

NISHANTH et al. Role of Smoking in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: A Review Article. *Cureus*, v. 12, n. 8, 2020.

NOCITI, V.; ROMOZZI, M. The Role of BDNF in Multiple Sclerosis Neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 9, p. 8447, 2023.

RIBEIRO et al. Efeitos dos diferentes anticoncepcionais hormonais nos valores de pressão arterial da mulher. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 71, p. 1453-1459, 2018.

SCHREINER, T.G.; GENES, T. M. Obesity and Multiple Sclerosis-A Multifaceted Association. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 12, p. 2689, 2021.

SINGH, M.; SU, C. Progesterone and neuroprotection. *Hormones and behavior*, v. 63, n. 2, p. 284-290, 2013.

SUBRAMANIAN et al. Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. *The Journal of Immunology*, v. 170, n. 3, p. 1548-1555, 2003.

TAFTI et al. Multiple Sclerosis. In: *StatPearls* [Internet]. 2024. Disponível em: ><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/><

TAKAHASHI et al. Efficacy and safety of oral estriol for managing postmenopausal symptoms. *Maturitas*, v. 34, n. 2, p. 169-177, 2000.

TARLINTON et al. Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses*, v. 12, n. 6, p. 643, 2020.

THOROGOOD, M.; HANNAFORD, P. C. The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 105, n. 12, p. 1296-1299, 1998.

VIGO et al. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. *Femina*, 2011.

VOSKUHL et al. Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, v. 15, n. 1, p. 35-46, 2016.

VOSKUHL, R.; MOMTAZEE, C. Pregnancy: effect on multiple sclerosis, treatment considerations, and breastfeeding. *Neurotherapeutics*, v. 14, n. 4, p. 974-984, 2017.

VUKUSIC et al. Oral nomegestrol acetate and transdermal 17-beta-estradiol for preventing post-partum relapses in multiple sclerosis: the POPARTMUS study. Multiple Sclerosis Journal, v. 27, n. 9, p. 1458-1463, 2021.

YSRRAELIT, M. C.; CORREALE, J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. Immunology, v. 156, n. 1, p. 9-22, 2019.

ZHANG et al. No association between oral contraceptive exposure and subsequent MS: A population-based nested case-control study in primary care. Multiple Sclerosis Journal, 2024.

Anexos

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos. Fonte: Autoria própria.

Figura 2 - Avaliação de risco de viés e qualidade das publicações. Fonte: Autoria própria.

Figura 3 - Estágio da esclerose múltipla em mulheres diagnosticadas. Fonte: Autoria própria.

Gráfico 1 - Distribuição em porcentagem segundo os tipos de hormônios estudados nas pesquisas in vivo. Fonte: Autoria própria.

Gráfico 2A - Hormônios utilizados nos estudos experimentais. Fonte: Autoria própria.

Gráfico 2B - Hormônios utilizados nos estudos experimentais. Fonte: Autoria própria.

CÓDIGO: SB1058

AUTOR: NICOLE DA COSTA FERREIRA

COAUTOR: SARAH DE MOURA CAVALCANTI UCHOA

ORIENTADOR: JEFERSON DE SOUZA CAVALCANTE

TÍTULO: Efeito do enriquecimento social sobre o ritmo de atividade-reposou

Resumo

Os ritmos circadianos são mudanças, de acordo com um ciclo de, aproximadamente, 24 horas, nas funções biológicas, físicas e mentais, influenciados por fatores ambientais, cronológicos e modulados por neurotransmissores como a serotonina. Variações nesses ritmos irão comprometer processos emocionais, cognitivos e comportamentais, podendo ser agravados por questões como o isolamento social ou por intervenções farmacológicas durante o período perinatal e ao longo da vida. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar os efeitos sobre a regulação dos ritmos circadianos e do comportamento em ratos Wistar por meio do tratamento perinatal com fluoxetina e do enriquecimento social através do estímulo de interação social previsível e não-familiar na fase da infância e adolescência. Nesse contexto, será analisada a expressão dos neuropeptídeos NPY e 5-HT em regiões do cérebro relacionadas ao controle do ritmo circadiano e ao comportamento, como o núcleo supraquiasmático, o folheto intergeniculado lateral, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, em filhotes e ratas no período perinatal expostas ao tratamento com fluoxetina e protocolo de enriquecimento social. Espera-se que os resultados proporcionem novos dados e informações acerca da interação entre fatores ambientais e farmacológicos na modulação do ritmo circadiano, contribuindo e agregando no entendimento dos mecanismos neurobiológicos que sustentam o comportamento emocional, social e cognitivo.

Palavras-chave: Ciclo circadiano. Fluoxetina. Enriquecimento social. Perinatal.

TITLE: Effect of social enrichment on activity-rest rhythm, temperature and social, emotional and cognitive behavior in the offspring of Wistar rats exposed to antidepressants during pregnancy.

Abstract

Circadian rhythms are changes, according to a cycle of approximately 24 hours, in biological, physical, and mental functions, influenced by environmental and chronological factors and modulated by neurotransmitters such as serotonin. Variations in these rhythms may compromise emotional, cognitive, and behavioral processes, which can be further aggravated by factors such as social isolation or pharmacological interventions during the perinatal period and throughout life. Thus, the present study aims to analyze the effects on the regulation of circadian rhythms and behavior in Wistar rats through perinatal treatment with

fluoxetine and social enrichment via predictable and non-familiar social interaction stimulation during childhood and adolescence. In this context, the expression of the neuropeptides NPY and 5-HT will be analyzed in brain regions related to circadian rhythm control and behavior, such as the suprachiasmatic nucleus, the intergeniculate leaflet, amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex, in offspring of rats exposed to perinatal fluoxetine treatment and social enrichment protocol. It is expected that the results will provide new data and insights regarding the interaction between environmental and pharmacological factors in the modulation of circadian rhythm, contributing to a better understanding of the neurobiological mechanisms underlying emotional and social behavior.

Keywords: Circadian cycle. Fluoxetine. Social enrichment. Perinatal.

Introdução

O efeito do isolamento social em diferentes tipos de comportamentos e distúrbios neuropsiquiátricos é intensamente estudado, por outro lado, poucas pesquisas investigam os mecanismos neurais relacionados aos efeitos da interação e jogo social na vida do indivíduo. O comportamento materno, o comportamento social e a interação sexual, consideradas interações sociais positivas, são caracterizadas pelo teor de recompensa e estão inseridas no repertório comportamental dos mamíferos.

Ao contrário dos efeitos da modulação serotoninérgica perinatal sobre a expressão de neuropeptídeos e de proteínas de relógio, os efeitos serotoninérgicos sobre o sistema de temporização circadiana já são amplamente discutidos. Porém, o estímulo de receptores serotoninérgicos típicos, como o 5-HT₇, para a modulação da ritmicidade circadiana tem sido discutido por alguns pesquisadores. Outros enfatizam a disfunção de neurônios hipotalâmicos devido ao desequilíbrio serotoninérgico induzido pelo isolamento social.

Estudos associaram déficits no comportamento social de roedores a alterações na expressão neuroquímica da proteína relógio BMAL1 em neurônios hipotalâmicos. Do ponto de vista comportamental, são escassos os estudos que investigam o impacto do tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) durante a gestação e sobre a organização dos ritmos circadianos na prole; os resultados indicam que a exposição pré-natal a esses fármacos promove alterações funcionais no relógio circadiano dos descendentes. Especificamente, observou-se um avanço de fase em resposta a pulsos de luz, um encurtamento do período livre em condições de escuro contínuo e uma diminuição da capacidade de resposta a mudanças de fase quando os animais são submetidos a agonistas serotoninérgicos. Além disso, foi descrito um incremento no deslocamento de fase provocado por um pulso luminoso no final da noite subjetiva, o qual é atenuado se precedido pela administração de um agonista serotoninérgico em ZT6. Coletivamente, esses achados sugerem que os animais expostos à fluoxetina demoraram mais para ressincronizar no ciclo-claro escuro.

Entretanto, os sinais sociais têm um papel controverso como arrastadores do relógio circadiano animal e moduladores do comportamento cognitivo, emocional e social. De acordo com pesquisas recentes, o arrastamento social pode ocorrer de forma potente até em animais invertebrados, atuando de forma independente da exposição à luz e ao contato direto com outros indivíduos. Já em outro estudo, a indução dos episódios de sono REM foi feita em protocolo de agrupamento em pares, utilizando do enriquecimento social, havendo um potente efeito na resiliência frente aos estímulos estressores.

Sendo assim, a dualidade da interação social e da sinalização serotoninérgica têm grande atuação na modulação do SNC, ofertando ao organismo mecanismos de proteção e de modulação em resposta aos efeitos estressores, podendo eles serem ambientais ou fisiológicos, na tentativa de encontrar a melhor forma de modulação do ambiente para a sobrevivência do indivíduo.

Há uma escassez estudos que propõem o uso de ISRS durante a gestação relacionando com os mecanismos de sinalização envolvendo neuropeptídeos, neurotransmissores e à regulação genética dos genes relógio, buscando compreender como alterações no comportamento social se relacionam a mudanças na ritmicidade circadiana. Entretanto, fatores exógenos, como a ausência de vivências sociais, podem potencializar vulnerabilidades na comunicação neural, afetando tais circuitos durante sua vivência. Em contrapartida, o estímulo social pode promover melhorias na circuitaria cerebral, recuperando até déficits em sua estrutura e no comportamento. Assim, percebe-se que a intervenção não farmacológica demonstra grande importância e relevância como recurso terapêutico promissor em diversas condições neuropsiquiátricas.

Metodologia

Animais

Utilizaremos ratos e ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, retiradas do biotério central regulado pela CEUA/UFRN. Após o deferimento do projeto pelo CEUA, os animais serão alojados em gaiolas plásticas (32x39x16.5cm) com comida e água disponíveis à vontade, sob um ciclo claro-escuro de 12/12h, e temperatura mantida em 23 ± 2 °C.

Os experimentos serão conduzidos em três etapas: 1) a fim de caracterizar a participação neuroquímica do NPY e 5-HT nas respostas comportamentais e fisiológicas observadas nos filhotes jovens e adultos expostos a fluoxetina e após o estímulo de interação social previsível e não familiar na fase da infância e adolescência; 2) assim como o perfil do ritmo circadiano dos filhotes jovens e adultos expostos a fluoxetina e após o estímulo de interação social previsível e não-familiar na fase da infância e adolescência e 3) as alterações comportamentais em contexto emocional, cognitivo e social nos filhotes jovens e adultos expostos a fluoxetina e após o estímulo de interação social previsível e não familiar na fase da infância e adolescência;

Os encéfalos extraídos dos filhotes em idade P45 e P90, após a perfusão com fixador PFA 4%, serão preservados, cortados a 50µm de espessura e reagidos por imunohistoquímica para identificação de marcadores importantes para os comportamentos analisados, sendo eles: o neuropeptídeo Y, a serotonina e as proteínas relógio Per1 e BMAL1. Serão analisadas as estruturas do sistema de temporização e áreas relacionadas ao comportamento emocional, cognitivo e social.

Para a análise estatística, utilizaremos o software SPSS v22.0 para conferir a homocedasticidade e esfericidade dos dados coletados antes de escolher o teste estatístico apropriado. O Ritmo de atividade e repouso será analisado primeiro por inspeção visual de actogramas e construção de periodogramas. A análise de séries temporais será feita com o software ElTemps (A. Díez Noguera, Universidade de Barcelona, Espanha).

Resultados e Discussões

Não foram realizadas, até o presente, as análises estatísticas dos dados. Porém, os resultados esperados proporcionarão novos dados e informações acerca da interação entre fatores ambientais e farmacológicos na modulação do ritmo circadiano, contribuindo significativamente para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos que sustentam o comportamento emocional, social e cognitivo.

Ritmos circadianos são regulados por fatores ambientais e cronológicos e modulados por neurotransmissores como a serotonina, e suas variações comprometem processos emocionais, cognitivos e comportamentais, sendo agravadas por isolamento social ou intervenções farmacológicas perinatais. Estudos mostram que exposição pré-natal a ISRS altera o relógio circadiano dos descendentes, com avanço de fase a pulsos de luz, encurtamento do período livre em escuridão contínua e menor capacidade de mudança de fase sob agonistas serotoninérgicos, e que tais animais demoram mais a resincronizar ao ciclo claro-escuro. Além disso, um pulso luminoso no fim da noite subjetiva provoca deslocamento de fase ampliado, reduzido se precedido por um agonista serotoninérgico. Em conjunto, interação social e sinalização serotoninérgica atuam de forma complementar na modulação do sistema nervoso central, oferecendo mecanismos de proteção e ajuste frente a estressores ambientais ou fisiológicos. Portanto, o enriquecimento social, através do estímulo de interação social previsível e não-familiar na infância e adolescência, é esperado que module e possivelmente atenuar os déficits circadianos induzidos pela fluoxetina, promovendo uma melhor organização dos ritmos de atividade-repouso.

A pesquisa também se propõe a analisar a expressão dos neuropeptídeos NPY e 5-HT em regiões cerebrais relacionadas ao controle do ritmo circadiano e ao comportamento, como o núcleo supraquiasmático, o folheto intergeniculado lateral, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, tanto em filhotes quanto em ratas no período perinatal expostas ao tratamento com fluoxetina e ao protocolo de enriquecimento social. Os efeitos serotoninérgicos sobre o sistema de temporização circadiana já são amplamente discutidos, e o estímulo de receptores serotoninérgicos típicos, como o 5-HT₇, para a modulação da ritmicidade circadiana tem sido investigado. A disfunção de neurônios hipotalâmicos devido ao desequilíbrio serotoninérgico induzido pelo isolamento social também é uma área de interesse. Estudos anteriores associaram déficits no comportamento social de roedores a alterações na expressão neuroquímica da proteína relógio BMAL1 em neurônios hipotalâmicos. Serão identificados marcadores importantes para os comportamentos analisados, incluindo o neuropeptídeo Y, a serotonina e as proteínas relógio Per1 e BMAL1, através da imunohistoquímica em encéfalos extraídos de filhotes em P45 e P90. A intenção é compreender como as alterações no comportamento social se relacionam a mudanças na ritmicidade circadiana, especialmente ao se considerar o uso de ISRS durante a gestação em relação aos mecanismos de sinalização envolvendo neuropeptídeos, neurotransmissores e a regulação genética dos genes relógio.

Finalmente, a pesquisa investigará o comportamento social, emocional e cognitivo. Variações nos ritmos circadianos, quando agravadas por intervenções farmacológicas como a fluoxetina, podem comprometer processos emocionais, cognitivos e comportamentais. Fatores exógenos, como a ausência de vivências sociais, podem potencializar vulnerabilidades na comunicação neural, afetando tais circuitos durante o desenvolvimento. Em contrapartida, o estímulo social pode promover melhorias na circuitaria cerebral, recuperando até déficits em sua estrutura e no comportamento. Desse modo, a intervenção

não farmacológica, como o enriquecimento social, demonstra grande importância e relevância como recurso terapêutico promissor em diversas condições neuropsiquiátricas. Espera-se que o enriquecimento social, através de interação social previsível e não-familiar na infância e adolescência, atenuar ou reverta os potenciais efeitos negativos da fluoxetina nos aspectos sociais, emocionais e cognitivos da prole. O estudo analisará especificamente as alterações comportamentais nesses contextos em filhotes jovens e adultos expostos à fluoxetina e após o estímulo de interação social.

Em suma, esta pesquisa busca elucidar a interação complexa entre a exposição perinatal à fluoxetina e o enriquecimento social na modulação dos ritmos circadianos e dos comportamentos em ratos Wistar. Os resultados esperados tendem a ressaltar a importância das intervenções não farmacológicas como o enriquecimento social, sugerindo seu potencial para contrariar os efeitos adversos de certas intervenções farmacológicas perinatais, e aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao comportamento emocional, social e cognitivo.

Conclusão

A presente pesquisa reúne evidências sobre o impacto na modulação dos ritmos circadianos a partir de fatores ambientais, como isolamento e enriquecimento social, assim como as intervenções farmacológicas, principalmente moduladoras do sistema serotoninérgico, durante o período perinatal. Nela, procura-se analisar a expressão dos neuropeptídeos NPY e 5-HT em regiões do cérebro relacionadas ao controle do ritmo circadiano e ao comportamento, como o núcleo supraquiasmático, o folheto intergeniculado lateral, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, em filhotes e ratas no período perinatal expostas ao tratamento com fluoxetina e protocolo de enriquecimento social. Atualmente, muito se pesquisa sobre o efeito do isolamento social e suas consequências, havendo pouco conhecimento acerca da interação social, dessa forma, tornando este estudo inovador e de relevância, visto que aborda uma área promissora e pouco pesquisada.

Referências

- BAARENDSE, P. & VANDERSCHUREN, L. (2011). Dissociable effects of monoamine reuptake inhibitors on distinct forms of impulsive behavior in rats. *Psychopharmacology*, 219(2), 313–326. doi:10.1007/s00213-011-2576-x
- DASILVA, J., HUSAIN, E., LEI, Y., MANN, G., MORRISON, A. & TEJANI-BUTT, S. (2017). Social partnering alters sleep in fear-conditioned Wistar rats. *PLOS ONE*, 12(10), e0186017. doi: 10.1371/journal.pone.0186017
- FUCHIKAWA, T., EBAN-ROTHSCHILD, A., NAGARI, M., SHEMESH, Y. & BLOCH, G. (2016). Potent social synchronization can override photic entrainment of circadian rhythms. *Nature Communications*, 7, 11662. doi:10.1038/ncomms11662.
- KIRYANOVA, V., MEUNIER, S., VECCHIARELLI, H, HILL, M. & DYCK, R. (2016). Effects of maternal stress and perinatal fluoxetine exposure on behavioral outcomes of adult male offspring. *Neuroscience*, 320, 281–296. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.064.

KIRYANOVA, V., SMITH, V., DYCK, R. & ANTLE, M. (2012). The effects of perinatal fluoxetine treatment on the circadian system of the adult mouse. *Psychopharmacology*, 225(3), 743–751. doi:10.1007/s00213-012-2861-3

PELLIS, S., FIELD, E., SMITH, L., & PELLIS, V. (1997) Multiple Differences in the Play Fighting of Male and Female Rats. Implications for the Causes and Functions of Play. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(1), 105–120. doi:10.1016/0149-7634(95)00060-7.

SPINKA, M., NEWBERRY, R. & BEKOFF M. (2001) Mammalian play: training for the unexpected. *Q Rev Biol.* 76:141–168.

TEO, C., SOGA, T. & PARHAR, I. (2017). Social Isolation Modulates CLOCK Protein and Beta-Catenin Expression Pattern in Gonadotropin-Inhibitory Hormone Neurons in Male Rats. *Frontiers in Endocrinology*, 8. doi:10.3389/fendo.2017.00225.

WESTRICH, L., SPROUSE, J. & SÁNCHEZ, C. (2013). The effects of combining serotonin reuptake inhibition and 5-HT₇ receptor blockade on circadian rhythm regulation in rodents. *Physiology & Behavior*, 110-111, 42–50. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.12.009.

CÓDIGO: SB1065

AUTOR: DANIELE DE CASTRO SOARES

COAUTOR: DANIELA DANTAS DE GOIS

COAUTOR: JOSE BRICIO ARAUJO LOPES

COAUTOR: SILVANA MARIA ZUCOLOTTI LANGASSNER

COAUTOR: CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

COAUTOR: MARIA DO SOCORRO MEDEIROS AMARANTE DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: FABIANE FERREIRA MARTINS

TÍTULO: Avaliação dos efeitos da *Nopalea Cochenillifera* (L.) no fígado de camundongos obesos via dieta induzida

Resumo

A alta ingestão de alimentos hipercalóricos é uma das causas do aumento da obesidade mundial que pode ocasionar inflamação, além da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), caracterizada pelo acúmulo excessivo de ácidos graxos no fígado. Nesse contexto, o extrato da *Opuntia cochenillifera* (EOC) emerge como um agente terapêutico promissor devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Neste estudo foram utilizados 40 camundongos (C57BL/6) divididos em 2 grupos: Controle (C) (n=20, dieta normocalórica) e High-fat (HF) (n=20, dieta hiperlipídica). Após 12 semanas, os animais foram redistribuídos em 4 grupos (n=10) de acordo com os tratamentos: C, C+EOC (CP), HF e HF+EOC (HFP), os quais seguiram por mais 8 semanas. Os animais foram sacrificados, o fígado foi dissecado e seguiu para análises bioquímicas, de microscopia de luz e eletrônica de transmissão (MET). As análises histológicas mostraram que quando comparado com o grupo C, o grupo HF apresentou micro e macro esteatose hepática, além de infiltrados inflamatórios; o tratamento com o EOC recuperou essas alterações. A análise por MET revelou que a dieta hiperlipídica induziu danos ultraestruturais nos hepatócitos, envolvendo o comprometimento das mitocôndrias, e que o extrato da EOC mitigou essas alterações. Nossos resultados mostraram que o extrato da EOC exerceu efeitos promissores, revertendo a obesidade e a DHGNA através da melhora do metabolismo lipídico e da recuperação mitocondrial.

Palavras-chave: Obesidade. Fígado. DHGNA. *Opuntia cochenillifera*. Mitocôndria.

TITLE: Evaluation of the effects of *Opuntia cochenillifera* (L.) on the liver of diet-induced obese mice

Abstract

High intake of high-calorie foods is one of the causes of the rise in global obesity, which can lead to inflammation, in addition to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), characterized by the excessive accumulation of fatty acids in the liver. In this context, *Opuntia cochenillifera* extract (EOC) emerges as a promising therapeutic agent due to its antioxidant

and anti-inflammatory properties. This study involved 40 mice (C57BL/6) divided into two groups: Control (C) (n=20, normocaloric diet) and High-fat (HF) (n=20, high-fat diet). After 12 weeks, the animals were redistributed into four groups (n=10) according to treatment: C, C+EOC (CP), HF and HF+EOC (HFP), which were followed for an additional 8 weeks. The animals were sacrificed, and the liver was dissected for biochemical, light, and transmission electron microscopy (TEM) analyses. Histological analyses revealed that, compared with group C, the HF group exhibited micro- and macrohepatic steatosis, as well as inflammatory infiltrates; treatment with EOC restored these alterations. TEM analysis showed that the high-fat diet induced ultrastructural damage in hepatocytes, involving mitochondrial impairment, and that EOC mitigated these alterations. Our results showed that EOC exerted promising effects, reversing obesity and NAFLD through improved lipid metabolism and mitochondrial recovery.

Keywords: Obesity. Liver. NAFLD. *Opuntia cochenillifera*. Mitochondria.

Introdução

As mudanças do comportamento alimentar, ocorridas nas últimas décadas, culminaram com a chamada transição nutricional, onde as alterações qualitativas e quantitativas da dieta levaram ao aumento da obesidade e da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (1). As dietas ricas em gordura saturada promovem resistência à insulina, aumento da adiposidade, embranquecimento do tecido adiposo marrom (whitening), inflamação de baixo grau (metainflamação), alteração da microbiota intestinal e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (2, 3).

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo excessivo de ácidos graxos no tecido hepático, podendo levar à complicações graves como a esteatohepatite, a transição dessa para a cirrose hepática e ainda, ao hepatocarcinoma (4). Por desenvolver a curto ou a longo prazo dislipidemias, disfunção endotelial e hipertensão arterial, o consumo excessivo de lipídeos proveniente dos alimentos industrializados, em especial, os ultraprocessados, vem sendo considerado alarmante e alvo de diversas pesquisas (5, 6).

Estudos recentes evidenciam que a ingestão de uma dieta rica em lipídeos resulta no aumento das adipocinas inflamatórias e na redução da adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, o que pode induzir a ativação e a infiltração de macrófagos do fenótipo M1 (pró-inflamatório) no tecido adiposo (7, 8). Esse mecanismo está diretamente associado com a instalação e a progressão da DHGNA e da resistência à insulina (RI), que quando associadas, correlacionam-se positivamente com o aumento da inflamação sistêmica (9).

Pesquisas atuais observaram efeitos deletérios da alta ingestão de lipídeos na expressão de marcadores de beta-oxidação e de biogênese mitocondrial no fígado, além de alterações ultraestruturais nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, contribuindo para o agravamento da DHGNA (10). As abordagens farmacológicas para contornar a obesidade e a DHGNA nem sempre são eficazes e apresentam vários efeitos colaterais. Nesse contexto, o extrato da *Opuntia cochenillifera* (*Nopalea cochenillifera*) emerge como um agente terapêutico promissor para mitigar a obesidade e a DHGNA.

A *Opuntia cochenillifera*, também conhecida como palma, palma doce e palma- forrageira, é uma cactácea nativa da biodiversidade do semiárido do nordeste brasileiro que tem sido amplamente utilizada para fins agrícolas, alimentares e medicinais (11, 12). De acordo com as características fitoquímicas, a *Opuntia cochenillifera* é rica em compostos fenólicos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em vários mecanismos celulares (12, 13). O

desenvolvimento de estratégias para combater a obesidade e a DHGNA é necessário e emergente considerando o cenário atual onde a obesidade é classificada como uma pandemia mundial (14). Ademais, até o presente momento, não há relatos na literatura que mostrem o papel da *Opuntia cochenillifera* sobre a obesidade e a DHGNA.

Metodologia

Animais e dietas

Quarenta camundongos (C57BL/6J) machos de três meses de idade (CEUA nº 067/2023) foram obtidos do Biotério do Instituto do Cérebro da UFRN. Os camundongos permaneceram mantidos no Biotério da Farmacologia da UFRN em condições controladas de temperatura e umidade ($60 \pm 10\%$), com livre acesso à água e à dieta, em caixas “pathogen free”. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão para roedores (C, $n=20$, 10% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 76% sob a forma de carboidratos = 15 kJ/g de dieta), ou dieta rica em lipídeos (HF, $n=20$, 50% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 36% sob a forma de carboidratos, = 21 kJ/g de dieta) por 12 semanas. Após, de acordo com os tratamentos, os grupos foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos por mais oito semanas:

- 1- Grupo controle (C, $n=10$), dieta controle ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- 2- Grupo controle + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (CP, $n=10$), dieta controle acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal;
- 3- Grupo high-fat (HF, $n=10$), dieta HF (50% de lipídios) ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- 4- Grupo high-fat + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (HFP, $n=10$), dieta HF (50% de lipídios) acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal.

O extrato da *O. cochenillifera* foi fornecido em parceria com o Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Bioativos da UFRN, o qual realizou o isolamento e a caracterização fitoquímica de acordo com protocolos já publicados pelo grupo (12, 15). A concentração de 200mg/kg de massa corporal foi usada com base em respostas anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato da *O. cochenillifera* em modelos experimentais (12, 15). Todos os procedimentos relacionados à experimentação animal abordados neste estudo foram realizados de acordo com as recomendações do “National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996) (16). As dietas experimentais (Tabela 1) foram elaboradas pela empresa PragSoluções Biociências (Jauá-SP) seguindo as diretrizes do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (17). A Figura 1 resume o delineamento experimental descrito acima.

Massa corporal, ingestão alimentar e energética

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente (segunda-feira, 14:00h pm) em balança de precisão 0,01 g (Shimadzu, BL-3200H). A ingestão alimentar foi avaliada diariamente (14:30h pm) através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi calculada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva

dieta, o valor obtido em quilocalorias foi convertido para quilojoules (kJ), medida universal de energia.

Sacrifício

Ao final do protocolo experimental, os camundongos foram mantidos em jejum por seis horas e após, foram anestesiados profundamente com Cloridrato de Ketamina 5% (0,15ml/100g) e Xilazina 2% (0,15 ml/100g). Uma incisão mediana foi realizada entre o abdome e a pelve; e o fígado foi cuidadosamente dissecado, removido e documentado para análises macroscópicas. Após, o fígado foi pesado e fixado em formalina de Millonig 10% para técnicas de microscopia de luz; e alternativamente, fixado em glutaraldeído 2,5% para análises de microscopia eletrônica de transmissão. O lobo hepático direito foi congelado a -80°C para análises bioquímicas.

Análises histológicas e estereológica (densidade de volume da esteatose hepática)

Após a fixação, os fragmentos do fígado foram desidratados, diafanizados, incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seccionados (5 µm de espessura) e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Optika B383 acoplado com câmera digital, Ponteranica - Itália). Para a análise estereológica, foram obtidas 50 fotomicrografias em campos aleatórios por grupo (n=5). A densidade de volume da esteatose hepática (Vv) foi estimada por contagem de pontos: $Vv [est, fígado] = Pp [est, fígado] / PT$; onde Pp é o número de pontos que atingem as inclusões lipídicas, PT é o total de pontos do sistema teste. As imagens foram analisadas empregando o software STEPanizer (www.stepanizer.com) usando um sistema teste com 36 pontos (18).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fragmentos do fígado medindo cerca de 1 mm³ foram fixados em glutaraldeído 2,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incorporadas em resina epon 812 (Electron Microscopy Science, 48h a 60/70°C). Cortes ultrafinos (60-80 nm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo (Leica UltraCut ultramicrotome, Wetzlar, Alemanha) e transferidos para grades metálicas, as quais foram contrastadas em acetato de uranila 5% e em citrato de chumbo 2%, e depois, examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Modelo FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin).

Dosagem bioquímica do triacilglicerol hepático

O fígado foi clivado e 50mg foram homogeneizados em álcool isopropílico (Vetec, Brasil) e centrifugados (5900×g) por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e os níveis do triacilglicerol foram quantificados através do kit colorimétrico (K117-1 Bioclin, Brasil) utilizando o espectrofotômetro semiautomático (fotômetro Bioplus-2000) (19).

3. Análise estatística

As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste de Dunnett T3, pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos foram utilizados o índice de significância com p<0,05 (GraphPad Prism versão 9.5 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Resultados e Discussões

Ao longo do período experimental, foi observado que a dieta hiperlipídica resultou em expressivo ganho de massa corporal. O grupo HF apresentou aumento de 73% ($p<0,0001$) na massa corporal em relação ao grupo C, evidenciando o potencial obesogênico da dieta (20, 21). Ao contrário, o grupo HFP apresentou redução de 24% em relação ao grupo HF ($p<0,0001$), o que demonstra, de fato, que o tratamento foi eficaz na diminuição dos índices de massa corporal. O grupo CP também apresentou redução, embora mais discreta em comparação ao C (-8,6%; $p<0,001$). Esses achados sugerem que a utilização do extrato da *O. cochenillifera* apresentou efeitos antiobesogênicos independentemente do tipo de dieta, não se restringindo exclusivamente àquelas hiperlipídicas (Figura 2).

Com relação à ingestão alimentar, não foi observada diferença significativa entre os grupos HF e C (+2%; ns), sugerindo que o aumento de massa corporal no grupo high-fat não esteve associado ao volume de alimento consumido, mas sim à elevada densidade calórica da dieta (22). Esse achado pode ser comprovado ao observar que a ingestão energética foi 40% maior no grupo HF em relação ao C ($p<0,0001$). Em comparação ao grupo HF, o grupo HFP apresentou redução de 26% na ingestão alimentar ($p<0,0001$) e de 28% na ingestão energética ($p<0,0001$), mostrando, mais uma vez, que o extrato da *O. cochenillifera* exerceu efeito modulador sobre o consumo alimentar, contribuindo para a homeostase energética durante o consumo de dietas obesogênicas. No grupo CP, a ingestão alimentar e energética foram, respectivamente: 7,4% ($p<0,001$) e 14% ($p<0,0001$) menores do que no grupo C, indicando o potencial anorexígeno da *O. cochenillifera* mesmo em indivíduos não obesos (Figura 3).

As análises histológicas demonstraram que quando comparados ao grupo C, o grupo HF apresentou hepatócitos com várias inclusões lipídicas no citoplasma caracterizando a micro e a macro esteatose hepática (setas e asteriscos) (Figura 4). Além disso, no grupo HF foram observados diversos pontos de infiltrados inflamatórios na região da veia centrolobular (retângulo pontilhado). Conforme estudos prévios, em resposta ao excesso de lipídios, os adipócitos perdem a capacidade de armazenamento/expansão e os ácidos graxos passam a ficar armazenados em outros tecidos, desencadeando a lipotoxicidade (23). No fígado, a lipotoxicidade afeta principalmente o funcionamento das mitocôndrias, gerando alterações celulares e a esteatose hepática (24). Simultaneamente, a lipotoxicidade causa o recrutamento e a ativação de células inflamatórias, resultando em inflamação local (25). O tratamento com o extrato da *O. cochenillifera* recuperou essas alterações histológicas provocadas pela lipotoxicidade da dieta hiperlipídica.

De forma complementar, a análise estereológica que teve como objetivo a quantificação da densidade de volume de esteatose hepática (V_v de esteatose), mostrou que, quando comparado ao grupo C, o grupo HF exibiu aumento significativo da esteatose (+729%, $p<0,0001$). Em paralelo, os níveis de triacilglicerol hepático do grupo HF foram maiores em comparação com o grupo C (+258%, $p<0,001$). Os animais obesos tratados com o extrato da *O. cochenillifera* apresentaram menor densidade de volume de esteatose hepática acompanhada por redução nos níveis do triacilglicerol hepático (-251%; $p<0,0001$ e 264%, $p<0,001$ respectivamente), mostrando os efeitos benéficos da *O. cochenillifera* no metabolismo lipídico (Figura 5).

Corroborando com os resultados histológicos (estruturais), a análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que a dieta hiperlipídica induziu alterações ultraestruturais expressivas nos hepatócitos e que o extrato da *O. cochenillifera* mitigou essas alterações. Conforme mostra a Figura 6, os hepatócitos do grupo controle apresentam núcleo (N), mitocôndrias (M), lisossomos (retângulos pontilhados), retículo endoplasmático rugoso (RER) (setas vermelhas) e cisternas do complexo de Golgi (setas amarelas) com elétrondensidades, volumes e contornos normais.

Por outro lado, os hepatócitos do grupo HF apresentaram núcleo (N) com pontos de cromatina condensada indicativos de apoptose (setas verdes). As mitocôndrias (M) exibiram rarefação (elétron-lúcidas), desarranjo das cristas e cristólise. O RER apresentou degeneração (elétron-lúcido) e redução no volume, características compatíveis com o estresse do retículo endoplasmático (setas vermelhas). No complexo de Golgi foi observada atrofia (setas amarelas) e nos lisossomos, foram notadas deformações e acúmulo de lipofucsina (retângulos pontilhados). Além disso, no citoplasma foram encontradas várias inclusões lipídicas (LD) (Figura 7).

O extrato da *O. cochenillifera* reverteu esses danos ultraestruturais provocados pela lipotoxicidade da dieta HF. Os hepatócitos apresentaram núcleo (N) com volume, contorno (membrana nuclear) e cromatina regulares, indicando elevada atividade de síntese. As mitocôndrias (M) exibiram eletron-densidade, membrana externa e cristas preservadas. O R.E.R (setas vermelhas) e o complexo de Golgi (setas amarelas) recuperaram seus volumes e a integridade das suas membranas; e os lisossomos exibiram contornos, volumes e elétrondensidades dentro dos parâmetros de normalidade (Figura 8).

Esses resultados mostram que o extrato da *O. cochenillifera* exerceu efeitos benéficos nas organelas dos hepatócitos dos camundongos obesos, especialmente com relação à recuperação das características ultraestruturais das mitocôndrias. As mitocôndrias são as organelas que estão intimamente envolvidas com o desenvolvimento da DHGNA; em estado saudável, as mitocôndrias realizam a beta-oxidação dos ácidos graxos, impedindo que estes se acumulem e fiquem internalizados em vesículas lipídicas no citoplasma no formato de esteatose (26, 27).

Quando sofrem algum insulto metabólico, como no caso da lipotoxicidade, as mitocôndrias desenvolvem alterações estruturais, conforme comprovadas nesse estudo e, consequentemente, perdem as suas funções com redução na beta-oxidação lipídica (28, 29). Estudos recentes mostram que o extrato da *O. cochenillifera* é rico em flavonoides, especialmente a quercetina, a rutina e o kampferol, que juntos podem modular positivamente as mitocôndrias através de seus potenciais antioxidantes, os quais exercem um efeito protetor sobre essas organelas (12, 30). A Figura 9 resume os resultados encontrados neste estudo.

Conclusão

Este estudo mostrou que o extrato da *Opuntia cochenillifera* restaurou a obesidade, o metabolismo energético e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) em modelo de obesidade induzida via dieta hiperlipídica. De modo geral, o extrato da *O. cochenillifera* reduziu a massa corporal e mitigou as alterações bioquímicas, estruturais e ultraestruturais no fígado dos camundongos obesos, exibindo potencial antiobesogênico, anti-inflamatório e antiesteatótico. Esses resultados apontam o extrato da *O. cochenillifera* como um agente

terapêutico promissor para o tratamento da obesidade e da DHGNA, doença de difícil manejo e intervenção clínica. Adicionalmente, esses achados colocam a *O. cochenillifera* em evidência, valorizando essa planta nativa da biodiversidade do estado do Rio Grande do Norte.

É importante mencionar que os resultados aqui apresentados são parte de um projeto de mestrado em execução, e que dentre as análises em andamento, as análises de expressão de genes e de proteínas relacionadas à inflamação, ao metabolismo lipídico e à função mitocondrial estão sendo realizadas a fim de complementar esses achados e de explorar os mecanismos moleculares e funcionais envolvidos na DHGNA.

Referências

1. Juul F, Martinez-Steele E, Parekh N, Monteiro CA. The role of ultra-processed food in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2025.
2. Dutta B, Tripathy A, Archana PR, Kamath SU. Unraveling the complexities of diet induced obesity and glucolipid dysfunction in metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2025;17(1):292.
3. Ezhilarasan D, Langeswaran K. Hepatocellular Interactions of Potential Nutraceuticals in the Management of Inflammatory NAFLD. *Cell Biochem Funct*. 2024;42(7):e4112.
4. Israelsen M, Francque S, Tsochatzis EA, Krag A. Steatotic liver disease. *Lancet*. 2024;404(10464):1761-78.
5. Xiang M, Tian X, Wang H, Gan P, Zhang Q. Inappropriate Diet Exacerbates Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease via Abdominal Obesity. *Nutrients*. 2024;16(23).
6. Shim JS. Ultra-Processed Food Consumption and Obesity: A Narrative Review of Their Association and Potential Mechanisms. *J Obes Metab Syndr*. 2025;34(1):27-40.
7. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
8. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82-97.
9. Herrera-Ojeda JL, Blanco-Palma RS, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Montalvo-Jave EE, Nuno-Lambarri N. The pathophysiological link between type 1 diabetes and MASLD: insights into insulin resistance and liver dysfunction. *J Endocrinol Invest*. 2025.
10. Silva-Veiga FM, Miranda CS, Vasques-Monteiro IML, Souza-Tavares H, Martins FF, Daleprane JB, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation and dipeptidyl peptidase-4 inhibition target dysbiosis to treat fatty liver in obese mice. *World J Gastroenterol*. 2022;28(17):1814-29.
11. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2005;99(3):325-48.

12. da Silva ECS, Bernardo Guerra GC, de Araujo ERD, Schlamb J, da Silva VC, de Aragao Tavares E, et al. Phenolic-rich extract of *Nopalea cochenillifera* attenuates gastric lesions induced in experimental models through inhibiting oxidative stress, modulating inflammatory markers and a cytoprotective effect. *Food Funct.* 2023;14(7):3242-58.
13. Kozai H, Watanabe C, Kosaka R, Aoki T, Hamada H, Kawashima M, et al. *Nopalea cochenillifera* Regulates the Immune Response and Gut Microbiota in Mice. *Nutrients.* 2024;16(24).
14. Wolfenden L, Ezzati M, Larijani B, Dietz W. The challenge for global health systems in preventing and managing obesity. *Obes Rev.* 2019;20 Suppl 2:185-93.
15. Tavares EA, Guerra GCB, da Costa Melo NM, Dantas-Medeiros R, da Silva ECS, Andrade AWL, et al. Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of Phenolic-Rich Extract from *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae): A Preclinical Study on the Prevention of Inflammatory Bowel Diseases. *Plants (Basel).* 2023;12(3).
16. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J.* 1997;38(1):41-8.
17. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):838S-41S.
18. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch.* 2011;459(5):477-85.
19. Soares E, Soares AC, Trindade PL, Monteiro EB, Martins FF, Forgie AJ, et al. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) powder consumption improves the metabolic profile and regulates gut microbiome composition in high-fat diet-fed mice. *Biomed Pharmacother.* 2021;144:112314.
20. Martins FF, Santos-Reis T, Marinho TS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Hypothalamic anorexigenic signaling pathways (leptin, amylin, and proopiomelanocortin) are semaglutide (GLP-1 analog) targets in obesity control in mice. *Life Sci.* 2023;313:121268.
21. Martins FF, Marinho TS, Cardoso LEM, Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Semaglutide (GLP-1 receptor agonist) stimulates browning on subcutaneous fat adipocytes and mitigates inflammation and endoplasmic reticulum stress in visceral fat adipocytes of obese mice. *Cell Biochem Funct.* 2022;40(8):903-13.
22. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Santana-Oliveira DA, Fernandes-da-Silva A, Brito GC, Martins FF, Souza-Mello V. Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice. *J Am Nutr Assoc.* 2023;42(5):435-44.
23. Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* 2014;63(7):895-902.
24. Luukkonen PK, Porthan K, Ahlholm N, Rosqvist F, Dufour S, Zhang XM, et al. The PNPLA3 I148M variant increases ketogenesis and decreases hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial function in humans. *Cell Metab.* 2023;35(11):1887-96 e5.

25. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol.* 2018;68(2):280-95.
26. Zheng Y, Wang S, Wu J, Wang Y. Mitochondrial metabolic dysfunction and non-alcoholic fatty liver disease: new insights from pathogenic mechanisms to clinically targeted therapy. *J Transl Med.* 2023;21(1):510.
27. Li YF, Xie ZF, Song Q, Li JY. Mitochondria homeostasis: Biology and involvement in hepatic steatosis to NASH. *Acta Pharmacol Sin.* 2022;43(5):1141-55.
28. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci.* 2018;192:26-32.
29. Prasun P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10):165838.
30. Nunes AAC. Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Prospection of *Nopalea cochenillifera*: A Scoping Review. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2025.

Anexos

Figura 1. Resumo gráfico do delineamento experimental do presente estudo. Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 2. Imagens representativas da massa corporal (A) e das diferenças estatísticas entre os grupos (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa

Figura 3. Ingestão alimentar (A) e ingestão energética (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 4. Fotomicrografias do fígado. Observar micro (setas) e macro (asteriscos) esteatose com infiltrado inflamatório (retângulo pontilhado) no grupo HF. O EOC reverteu essas alterações histológicas no grupo HFP. Grupos: C (controle), CP (controle+EOC),

Figura 5. Dosagem bioquímica do triacilglicerol hepático (A). Análises estereológicas da densidade de volume de esteatose hepática (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia coch*

Figura 6. Análises ultraestruturais do fígado dos animais do grupo Controle (C). Observar núcleo (N), mitocôndrias (M), lisossomos (retângulos pontilhados), retículo endoplasmático rugoso (RER) (setas vermelhas) e cisternas do complexo de Golgi (setas amarelas)

Figura 7. Análises ultraestruturais do fígado dos animais do grupo High-fat (HF). Notar núcleo (N) com pontos de cromatina condensada (setas verdes), mitocôndrias (M) com rarefação, desarranjo das cristas e cristólise, retículo endoplasmático rugoso com dilatação

Figura 8. Análises ultraestruturais do fígado dos animais do grupo High-fat+EOC (HFP). Verificar hepatócitos com núcleo (N) de volume, contorno (membrana nuclear) e cromatina regulares, mitocôndrias (M) íntegras, com membrana externa e cristas preservadas

Figura 9. Resumo gráfico dos principais resultados encontrados neste estudo. Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

CÓDIGO: SB1080

AUTOR: PEDRO CLESIO DA SILVA

ORIENTADOR: LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ LIMA

TÍTULO: Leiteiro: Resíduo da indústria alimentícia como insumo alternativo para biofermentação

Resumo

O presente estudo investigou o uso do leiteiro, subproduto da indústria de laticínios, como alternativa ao extrato de levedura em meios de cultivo destinados a microrganismos biorremediadores. A proposta buscou avaliar a viabilidade dessa substituição visando reduzir custos e promover sustentabilidade em processos de produção de biomassa e biossurfactantes. Foram utilizados isolados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter asburiae* cultivados em meio IRAP suplementado com leiteiro (IRAP L). Os resultados demonstraram que *K. pneumoniae* apresentou crescimento comparável ao meio convencional ($p > 0,05$), enquanto *E. asburiae* exibiu desempenho reduzido em IRAP L ($p < 0,05$), indicando resposta espécie-dependente. Ambos os isolados foram capazes de produzir biossurfactantes detectáveis, reforçando a viabilidade do leiteiro como fonte alternativa de nutrientes, mostrando que a utilização deste resíduo agrega valor a um subproduto subaproveitado, reduz impactos ambientais associados ao descarte indevido e contribui para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 9 e 12).

Palavras-chave: Leiteiro; Biorremediação; Reaproveitamento de resíduos; Biotecnologia.

TITLE: Buttermilk: residue from the food industry as an alternative input for biofermentation.

Abstract

This study investigated the use of buttermilk, a by-product of the dairy industry, as an alternative to yeast extract in culture media for bioremediation-related microorganisms. The aim was to evaluate the feasibility of this substitution to reduce costs and promote sustainability in biomass and biosurfactant production processes. Bacterial isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae* were cultivated in IRAP medium supplemented with buttermilk (IRAP L). Results showed that *K. pneumoniae* exhibited growth comparable to the conventional medium ($p > 0.05$), while *E. asburiae* displayed reduced performance in IRAP L ($p < 0.05$), indicating a species-dependent response. Both isolates were able to produce detectable biosurfactants, reinforcing the feasibility of buttermilk as an alternative nutrient source. These findings demonstrate that the use of this residue adds value to an underutilized by-product, reduces environmental impacts associated

with improper disposal, and contributes to the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs 9 and 12).

Keywords: Buttermilk; Bioremediation; Waste reuse; Biotechnology.

Introdução

Nas últimas décadas, os desafios ambientais e industriais tornaram-se cada vez mais evidentes diante do crescimento acelerado da população mundial e da intensificação dos processos produtivos. Estima-se que a população global atinja 9,7 bilhões de pessoas até 2050 (ONU, 2022)[1]. Este cenário intensifica não apenas a demanda por matérias-primas e produtos, mas também a geração de resíduos orgânicos e inorgânicos em escala sem precedentes (Bhattacharjee, S. et. al, 2023) [2]. Resíduos da indústria alimentícia, quando mal geridos, representam riscos ao equilíbrio ecológico e à saúde humana (Ahmad et al., 2022) [3], mas também podem ser valorizados por meio de processos biotecnológicos, alinhando-se ao conceito de economia circular (Sharma et al., 2022; Garlapati et al., 2019)[4,5].

A biorremediação surge como uma das principais estratégias sustentáveis para a descontaminação ambiental, utilizando microrganismos capazes de degradar poluentes de forma eficiente e com menor custo em comparação a métodos convencionais (Arruda; Trevizan; Andrade, 2024)[6] e essa abordagem tem sido fortalecida por pesquisas que destacam o uso de resíduos agroindustriais como substratos para microrganismos, reduzindo custos e favorecendo a sustentabilidade (Tiwari et al., 2021; Jaiswal et al., 2023)[7,8].

No entanto, a produção de microrganismos biorremediadores em larga escala enfrenta obstáculos relacionados ao custo dos meios de cultivo, sobretudo devido ao uso de insumos caros, como o extrato de levedura (Hakobyan et al., 2012)[9], considerado uma das principais fontes de nitrogênio esse fator eleva significativamente os custos de produção de biomassa microbiana e biossurfactantes, restringindo a viabilidade econômica de muitos processos biotecnológicos (Cerdeira et al., 2019)[10]. Um exemplo promissor é o leiteiro, subproduto da fabricação de manteiga, caracterizado por um conteúdo proteico entre 2 e 3% e teor lipídico variando entre 0,4 e 0,7% (Machado et al., 2022)[11], porém ainda subaproveitado e seu uso em cultivos microbianos pode reduzir custos e, ao mesmo tempo, agregar valor a um resíduo agroindustrial subutilizado, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 9 e 12).

Diante disso, este estudo buscou compreender a viabilidade do leiteiro como substituto ao extrato de levedura no meio IRAP, analisando seu impacto sobre o crescimento microbiano e discutindo as implicações dessa substituição para a sustentabilidade de processos biotecnológicos.

Metodologia

3.1 Isolados Bacterianos

Foram utilizados isolados previamente obtidos de ambientes contaminados por petróleo, mantidos no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG/UFRN): *Klebsiella*

pneumoniae e Enterobacter asburiae. Esses microrganismos apresentaram capacidade comprovada de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

3.2 Preparação do Leiteiro

O leiteiro foi cedido pela empresa CLAN (Natal-RN). O material passou por autoclavagem a 120 °C por 15 minutos para esterilização.. O leiteiro tem conteúdo proteico entre 2 e 3% e teor lipídico de 0,40 a 0,70% (MACHADO et al., 2022) [11].

3.3 Cultivo e Avaliação

Os cultivos foram conduzidos em frascos de 500 mL contendo meio IRAP suplementado com leiteiro (IRAP L) e, paralelamente, em meio IRAP convencional. O crescimento bacteriano foi monitorado por leitura de densidade óptica a 600 nm (DO600) e por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em ágar nutriente.

3.4. Curva de Crescimento por Unidade Formadora de Colônia (UFC):

As cepas foram inoculadas em triplicata biológica em meio LB por 16 a 18 horas (overnight) a 37°C e 180 RPM em shaker. Posteriormente, a bactéria foi inoculada em 50 ml de meio IRAP e IRAP L (meio IRAP modificado com leiteiro) com DO600nm ajustada para 0,05. Realizou-se um teste de diluição prévio para determinar a faixa ideal que permitisse a contagem de UFC, entre 30 a 300 colônias. Aliquotas de 10 µL de cada diluição (10^{-4} a 10^{-8}) foram plaqueadas em triplicata em LB-ágar a cada hora, durante um período de 5 horas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as colônias foram observadas.

Durante a curva de crescimento, a DO600nm das culturas foi medida a cada 30 minutos e 100 µL de cada amostra foi plaqueado em triplicata em LB-ágar. UFCs foram contadas com contador de colônias para estabelecer a relação entre DO600nm e UFC. UFC/mL foi calculado multiplicando o número de colônias pelo fator de diluição e dividindo pelo volume plaqueado. O IRAP foi controle positivo.

Resultados e Discussões

4.1 Crescimento Microbiano

A Klebsiella pneumoniae apresentou crescimento equivalente entre IRAP e IRAP L, sem diferenças significativas ($p > 0,05$). Por outro lado, Enterobacter asburiae teve crescimento reduzido em IRAP L ($p < 0,05$). Esses resultados indicam que o leiteiro pode sustentar adequadamente o crescimento de algumas espécies, mas sua eficiência depende do metabolismo bacteriano envolvido. Estudos prévios já demonstraram variações espécie-específicas em função da fonte de nitrogênio utilizada (Cerqueira et al., 2019; Safari et al., 2012)[10,12], o que reforça a necessidade de ajustes nutricionais para otimizar o desempenho.

4.2 Discussão em perspectiva

A substituição parcial ou total do extrato de levedura por resíduos agroindustriais, como o leiteiro, está em consonância com pesquisas recentes que buscam reduzir os custos de produção em biotecnologia sem comprometer a eficiência (Sharma et al., 2022; Costa et al., 2023)[4,13]. A resposta positiva de K. pneumoniae no IRAP L indica que essa abordagem

pode ser replicada em bioprocessos aplicados à biorremediação, embora adaptações específicas sejam necessárias para diferentes espécies.

O aproveitamento do leiteiro em cultivos microbianos agrega valor a um subproduto amplamente disponível e subutilizado na cadeia produtiva de laticínios. Essa abordagem contribui para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 9 e 12), além de reduzir custos associados à produção de biomassa e biossurfactantes. Trabalhos recentes têm demonstrado que resíduos agroindustriais representam uma alternativa viável para substituir insumos caros em meios de cultivo, promovendo ganhos ambientais e econômicos (Tamanini & Haully, 2004; Ataídes et al., 2021; Souza et al., 2021)[14,15,16].

Conclusão

O presente estudo demonstrou que o leiteiro é capaz de sustentar o crescimento microbiano de forma eficaz para *Klebsiella pneumoniae*, apresentando resultados comparáveis ao meio convencional. Para *Enterobacter asburiae*, entretanto, o desempenho foi reduzido, indicando que a resposta microbiana ao leiteiro é espécie-dependente.

Trabalhos recentes têm demonstrado que resíduos agroindustriais representam uma alternativa viável para substituir insumos caros em meios de cultivo, promovendo ganhos ambientais e econômicos (Tamanini & Haully, 2004; Ataídes et al., 2021; Souza et al., 2021) [14,15,16]., em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável relacionados ao consumo e produção responsáveis (ODS 12) e à inovação em processos industriais (ODS 9).

Assim, O aproveitamento do leiteiro em cultivos microbianos agrega valor a um subproduto amplamente disponível e subutilizado na cadeia produtiva de laticínios.

Referências

- [1] ONU. World Population Prospects 2022: Summary of Results. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3, 2022. <https://www.un.org/development/desa/pd/content/World-Population-Prospects-2022>
- [2] BHATTACHARJEE, S. et al. Environmental waste management strategies and vermicomposting in urban contexts. *Waste Management & Research*, v. 41, n. 11, p. 1565–1578, 2023. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.07.019>.
- [3] AHMAD, T. et al. Sustainable valorisation of food waste: a review of biowaste transformation into value-added products. *Journal of Cleaner Production*, v. 362, p. 132288, 2022. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132288>.
- [4] SHARMA, P. et al. Organic solid waste biotransformation using microbial pathways. *One Earth*, v. 5, n. 9, p. 1016–1031, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2022.08.004>
- [5] GARLAPATI, P. K. et al. Circular bioeconomy: Potential to solve waste management challenges. *Trends in Biotechnology*, v. 37, n. 9, p. 861–876, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.015>.

- [6] ARRUDA, M. F. A.; TREVIZAN, A. F.; ANDRADE, L. M. Desastre ambiental no Nordeste brasileiro. *Reflexões Econômicas, Ilhéus (BA)*, v. 1, p. 64–81, jan./jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.36113/rec.v8i1.4004>.
- [7] TIWARI, B. R. et al. Utilization of agro-industrial wastes as nitrogen sources for microbial processes. *Biotechnology Reports*, v. 31, p. e00616, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00616>.
- [8] JAISWAL, A. K. et al. Sustainable bioprocessing for waste valorization. *Journal of Environmental Management*, v. 343, p. 117018, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117018>.
- [9] HAKOBYAN, L.; GABRIELIAN, L.; TRCHOUNIAN, A. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 6519–6526, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>
- [10] CERDEIRA, V. et al. Design of a low-cost culture medium based in whey permeate for biomass production of enological *Lactobacillus plantarum* strains. *Biotechnology Progress*, v. 35, n. 2, p. e2791, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.2791>
- [11] MACHADO, E. L. et al. O leiteiro e sua utilização pela indústria de alimentos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 77, n. 1, p. 43–54, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v77i1.873>
- [12] SAFARI, R. et al. Use of Hydrolysates from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Heads as a Complex Nitrogen Source for Lactic Acid Bacteria. *Food Bioprocess Technology*, v. 5, p. 73–79, 2012. DOI: 10.1007/s11947-009-0225-8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-009-0225-8>
- [13] COSTA, B. P. et al. Uso da análise bibliométrica como ferramenta para o levantamento de estudos sobre a metabolômica aplicada na biorremediação. *Química Nova*, v. 46, n. 2, p. 179–184, 2023.
- [14] TAMANINI, C.; HAULY, M. C. de O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n. 4, p. 315–330, 2004. DOI: 10.5433/1679-0359.2004v25n4p315. <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2258>
- [15] ATAÍDES, C.; BARBOSA, S. do N.; DAS NEVES, A. G.; DA SILVA, R. O. Potencial uso biotecnológico dos resíduos de processamento de frutas. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 3, p. 30766–30784, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-685. <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/27063>
- [16] SOUZA, F. R. A. de et al. Biopolímeros na indústria de alimentos: do aproveitamento de resíduos agroindustriais à produção de biopolímeros. In: VERRUCK, S. (org.). *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 4, p. 370–388, 2021. <https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/210303531.pdf>

Tabela 1 - O cultivo em IRAP L produz biomassa de maneira equitativa ao meio IRAP convencional.

CÓDIGO: SB1088

AUTOR: ALEXANDRE FREIRE MARTINS

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Partição ou sobreposição do nicho acústico em ambientes urbanos?

Resumo

A fragmentação de habitats se caracteriza como uma das maiores ameaças à biodiversidade e afeta diretamente diversos ecossistemas, entre eles estão os manguezais, ambientes únicos que oferecem serviços ecossistêmicos essenciais, mas sofrem forte pressão desse problema. A figuinha-do-mangue (*Conirostrum bicolor*), é uma ave amplamente distribuída em manguezais da América do Sul e ao longo de grandes rios amazônicos, mesmo assim, encontra-se em declínio populacional e é classificada como “Quase Ameaçada”. Para compreender sua relação com o ambiente, analisamos 5673 registros de ocorrência no Brasil entre 2008 e 2023, utilizando modelagem de ocupação estática. A espécie apresentou ocupação de 49% da área estudada, com a presença de manguezal sendo o principal fator positivo de ocorrência, enquanto variáveis como floresta alagada, corpos d’água, aquicultura e áreas urbanas também tiveram a mesma influência, porém considerada não significativa. A presença de manguezais mostrou-se essencial, reforçando a dependência ecológica da espécie. A detecção aumentou ao longo do tempo, possivelmente associada ao crescimento de registros em plataformas de ciência cidadã. Mapas de calor indicaram municípios da Bahia e de Alagoas como áreas prioritárias para conservação. Os resultados evidenciam que a sobrevivência de *C. bicolor* depende diretamente da integridade dos manguezais, ressaltando a urgência na proteção desse ecossistema.

Palavras-chave: Manguezais, Fragmentação, Ocupação, Conservação.

TITLE: Effects of Landscape Structure on the Detection and Occupancy of the Bicolored Conebill (*Conirostrum bicolor*)

Abstract

Habitat fragmentation is one of the greatest threats to biodiversity and directly affects several ecosystems, including mangroves, unique environments that provide essential ecosystem services but are under strong anthropogenic pressure. The Bicolored Conebill (*Conirostrum bicolor*) is a bird widely distributed in South American mangroves and along major Amazonian rivers; nevertheless, its populations are in decline, and it is currently classified as “Near Threatened.” To better understand its relationship with the environment, we analyzed 5,673 occurrence records in Brazil between 2008 and 2023, using static occupancy modeling. The species occupied 49% of the study area, with mangrove cover being the main positive factor influencing occurrence, while variables such as flooded forest, water bodies, aquaculture, and urban areas also showed positive but not significant effects. The presence of mangroves proved to be essential, reinforcing

the species' ecological dependence on this ecosystem. Detection increased over time, possibly associated with the growth of records on citizen science platforms. Heat maps highlighted municipalities in Bahia and Alagoas as priority areas for conservation. Our results demonstrate that the persistence of *C. bicolor* depends directly on the integrity of mangroves, underscoring the urgency of protecting this ecosystem.

Keywords: Mangroves, Fragmentation, Occupancy, Conservation.

Introdução

Representando um dos maiores desafios para a conservação da natureza, a fragmentação do habitat e as alterações na paisagem estão entre as principais ameaças à biodiversidade em todo o planeta, comprometendo a resiliência dos ecossistemas e a sobrevivência de inúmeras espécies (Pimm & Raven, 2000). Impulsionadas pela ação antrópica, tais mudanças resultaram na supressão de uma parcela considerável da cobertura florestal global no último século, com uma tendência de maior concentração dessas perdas nas regiões tropicais (Myers, 1988; Hansen, 2013).

Inseridos nessa problemática, estão os manguezais, que são ambientes florestais únicos que prosperam em zonas úmidas intertidais costeiras, amplamente distribuídos pelas regiões tropical e subtropical (Bryan-Brown et al., 2020). Essas florestas oferecem diversos serviços ecossistêmicos importantes, que são cruciais para o planeta e o bem-estar humano (Koch et al., 2009). Historicamente, os manguezais enfrentaram taxas de desmatamento de até 3,6% ao ano e, nos últimos 25 anos, as taxas permanecem em 0,2–0,7% anualmente (Valiela et al., 2001; Hamilton & Casey, 2016), motivados pela perda quase total de fragmentos em algumas regiões, bem como pelos esforços de conservação (Friess et al., 2019).

Dessa forma, a chave para compreender como as mudanças na paisagem afetam os processos populacionais dos animais está, primeiramente em determinar como eles se relacionam com o ambiente (Kareiva & Wennergren, 1995). Com os avanços tecnológicos, surgiram ferramentas poderosas para auxiliar nesse processo, com destaque para a ciência cidadã. Essa abordagem mobiliza observadores e amantes da natureza a gerar registros em larga escala geográfica que, quando combinados com a modelagem de ocupação (MacKenzie et al., 2002), fornecem uma base para mapear a distribuição das espécies.

A figuinha-do-mangue (*Conirostrum bicolor*), é uma pequena ave com aproximadamente 11 cm de comprimento pertencente à família Thraupidae, com ocorrência principalmente em áreas de manguezais e florestas adjacentes de várzea, com uma vasta distribuição geográfica, desde o litoral de Santa Catarina até a parte litorânea da Colômbia, também pode ser visto ao longo do Rio Amazonas e alguns dos seus afluentes, chegando até o Peru e Equador (Silveira et al., 2023). Contudo, apesar de sua ampla área de ocorrência, a figuinha-do-mangue enfrenta um declínio populacional, o que levou a espécie a ser enquadrada internacionalmente na categoria de conservação "Quase Ameaçada" (NT), acendendo um alerta sobre a conservação da espécie (BirdLife International, 2018). A espécie apresenta carência de estudos ecológicos, com uma lacuna significativa no conhecimento sobre a influência da estrutura da paisagem em sua ecologia.

Sendo assim, nosso estudo teve como objetivo modelar a ocupação de *C. bicolor* por meio de modelos de ocupação estática, incorporando a detecção, para preencher uma importante lacuna de conhecimento sobre a ecologia da espécie.

Metodologia

Área de estudo

A área em que foi desenvolvida o estudo, abrange toda a área de distribuição do *C. bicolor* no Brasil, que se estende por cerca de 13 mil km² de terras descontínuas desde o litoral sul até o extremo norte (Spalding et al., 2010). O ecossistema se caracteriza pela baixa riqueza de espécies vegetais, tendo de 3 a 7 espécies típicas no Brasil (Mori et al., 2010), esse conjunto específico de espécies arbóreas e arbustivas, coletivamente denominadas "mangue", exibem adaptações notáveis que são cruciais para a sobrevivência em um ambiente com baixa oxigenação do solo, ampla variação de salinidade, oferta limitada de água doce e sedimento inconsolidado (Schaeffer-Novelli et al., 2016). Além disso, algumas espécies como o mangue-vermelho, (*Rhizophora mangle*) podem apresentar raízes escoras, que são ramificações do caule e ajudam na fixação em sedimentos inconsolidados (Souza et al., 2018).

Também consideramos o curso do rio Amazonas e seus afluentes com registros prévios da espécie para o desenvolvimento do estudo, nesse ambiente o figuinha-do-mangue é encontrado em matas ripárias com estágios sucessionais mais jovens de vegetação arbustiva em ilhas e margens de rios (Hilty & Kirwan, 2020), essa vegetação ajuda na estabilização de ribanceiras do rio, pois desenvolve um emaranhado radicular, evitando a erosão (Cicco & Arcova, 1999). A pluviosidade média ao longo da bacia amazônica é elevada, variando entre 1.900 e 3.100 milímetros anuais, enquanto a temperatura se mantém consistentemente alta, com médias que superam os 26°C durante todo o ano (Alvares et al., 2013).

Consideramos 405 municípios, os quais compreendem a faixa litorânea dos estados de Santa Catarina ao Amapá, bem como as cidades que margeiam o rio Amazonas e existem registros prévios da espécie.

Coleta de dados

Para obter os dados de ocupação histórica de *C. bicolor*, compilamos os registros de ocorrência em 16 anos de observação (2008–2023) disponíveis em diversas bases de dados (WikiAves, wikiaves.com.br; xeno-canto, xeno-canto.org; Global Biodiversity Information Facility - GBIF, gbif.org; SpeciesLink, specieslink.net; e eBird, ebird.org) e Atlas de Registros de Aves, ara.cemave.gov.br).

Os dados ambientais utilizados na ocupação histórica em macro escala, foram: cobertura florestal de mangue, floresta alagada, área urbana, corpos d'água e aquicultura. Essas variáveis foram extraídas do banco de dados do MapBiomas (Souza Jr et al., 2020).

Análise de dados

Usamos o modelo de ocupação estática single-season (MacKenzie et al., 2002) para verificar a influência das covariáveis na probabilidade de ocupação de *C. bicolor* no programa MARK (White & Burnham, 1999). Utilizamos os 16 anos de amostragem como ocasiões, a fim de compor um histórico de ocupação nos municípios de amostragem. Esses modelos consideram dois parâmetros

importantes: a probabilidade de ocupação (ψ) e a probabilidade de detecção (ρ) da espécie nas unidades amostradas (municípios no nosso estudo). Dessa forma, ao incorporar a probabilidade de detectar a espécie quando presente, esta modelagem permite estimar melhor a ocupação em relação a análises que consideram apenas a presença e a ausência de registros. Além disso, a probabilidade de ocupação pode ser modelada em função de variáveis ambientais para compreender o efeito do habitat sobre a espécie estudada. Neste estudo, testamos o efeito da porcentagem (%) de cobertura de mangue, floresta alagada, área urbana, corpos d'água e aquicultura dos municípios amostrados sobre a ocupação da espécie.

Resultados e Discussões

Registramos um total de 5673 ocorrências de *C. bicolor* ao longo de toda a sua área de distribuição conhecida. Esses registros abrangem 350 municípios, o que representa aproximadamente 86,4% do total de municípios incluídos na área de estudo. Os dados sugerem que, embora a espécie não ocorra em todos os municípios analisados, sua distribuição é consideravelmente ampla dentro do recorte geográfico considerado.

Na modelagem obtivemos 128 modelos, onde os cinco modelos com $\Delta AICc < 2$ apresentaram 37% do peso do conjunto final de modelos (Tabela 1). O modelo melhor ranqueado apresentou a seguinte estrutura ' ψ (mangue_%) ρ (t)' e teve 13% do peso do conjunto final de modelos (Tabela 1). Portanto, este modelo foi usado para responder o que influencia a probabilidade de ocupação e detecção da *C. bicolor*.

Probabilidade de ocupação

Nossa análise revelou que a estimativa de ocupação para o *C. bicolor* foi de $\psi = 0,49$, indicando que a espécie ocupa aproximadamente 49% da área total amostrada. Essa estimativa, obtida a partir de um modelo que corrige a probabilidade de detecção imperfeita, representa uma medida mais acurada da distribuição da espécie do que a simples contagem de locais onde foi registrada.

Os resultados mostraram que a presença de manguezais ($\beta = 3,7812$) foi o principal preditor da ocorrência de *C. bicolor* influenciando positivamente a presença da espécie. Essa variável recebeu um peso de 0,92, superando todas as outras testadas (Fig. 1a). As variáveis de aquicultura ($\beta = 2,2319$, peso = 0,26), área urbana ($\beta = 0,6492$, peso = 0,32), corpos d'água ($\beta = 0,9163$, peso = 0,34) e floresta alagada ($\beta = 0,9349$, peso = 0,37) influenciaram positivamente, mas em menor escala, a ocupação da espécie (Fig. 1b,c,e,f). A única variável com influência negativa foi campos alagados (Fig. 1d) com peso de ($\beta = -0.7511$, peso = 0,31), também sendo considerada insignificante para a análise.

A associação positiva indica que a probabilidade de um local ser ocupado pela espécie aumenta significativamente na presença de formações de mangue. Isso evidencia para uma forte dependência ecológica de *C. bicolor* a esses ecossistemas costeiros, que, juntamente com a vegetação adjacente, fornecem recursos essenciais, como abrigo, locais para reprodução e fontes de alimento para a espécie (Hilty & Kirwan, 2020).

A relação negativa com a variável de campos alagados pode ser explicada pela característica ecológica da espécie de habitar áreas florestais (Sick, 1997). Já a influência positiva com a variável de áreas urbanas na ocupação de *C. bicolor*, deve ser interpretada com cautela, pois é mais provável que seja um reflexo da expansão urbana recente em áreas de mangue do que de uma real adaptação da espécie a ambientes antropizados. Como foi o caso de um estudo ocorrido no litoral do Paraná, em que dos 22 fragmentos de manguezais, 21 apresentaram algum grau de antropização no seu interior ou nas suas bordas (Vikou et al., 2023). Na verdade, o mais provável de estar acontecendo é o avanço dos centros urbanos sobre a área de ocorrência histórica da espécie, e não as aves que estão se associando a ambientes urbanos.

Probabilidade de Detecção

A variável tempo influenciou positivamente a probabilidade de detecção ao longo dos 16 anos estudados ($\beta = 10,7306$, peso = 1) (Fig. 2). Isso ocorreu, possivelmente, pelo aumento do esforço de observação e da cobertura amostral por meio de plataformas de ciência cidadã. O WikiAves, principal plataforma de compartilhamento de registros de aves no Brasil, foi criado no começo de 2009 e desde então tem acumulado milhões de registros fotográficos, com o número de registros anual crescendo ao longo do tempo (Schubert et al., 2019). Esse aumento no volume de registros e no número de observadores pode ter influenciado a probabilidade de detecção registrada nos últimos 16 anos, o que pode explicar em parte o efeito positivo do tempo sobre a detecção observada em nosso modelo.

Já existem trabalhos demonstrando que o WikiAves é amplamente utilizado por pesquisadores como fonte complementar de dados (Farias et al., 2022) e que sua extensa base permite preencher lacunas de conhecimento que seriam logisticamente difíceis de obter apenas com esforços acadêmicos tradicionais. Análises da distribuição temporal dos registros mostram que a contribuição de observadores voluntários tem sido crucial para detectar padrões espaciais e sazonais de espécies (Schubert et al., 2019).

Mapa de calor

O mapa de calor, elaborado a partir das estimativas de ocupação por município, evidencia áreas com a maior probabilidade para a ocorrência de *C. bicolor* (Figura 3), com destaque para as maiores estimativas registradas nos municípios de Itacaraé e Igraipúna, na Bahia, e em Marechal Deodoro, em Alagoas. Essas localidades podem vir a ser áreas estratégicas para ações de conservação, uma vez que concentram indícios de maior ocupação da espécie e estão inseridas em um contexto de crescente pressão antrópica sobre os manguezais (Santana et al., 2020). Ressalta-se a importância de sua preservação, sobretudo diante do fato de que, em todo o território nacional, apenas 17 unidades de conservação de proteção integral abrangem manguezais dentro de seus limites (Ferreira et al., 2022), o que reforça a necessidade de ampliar e fortalecer mecanismos de proteção nessas regiões prioritárias.

As áreas protegidas desempenham um papel essencial na contenção e mitigação dos impactos negativos decorrentes das ações antrópicas, especialmente sobre os manguezais, ecossistemas de elevada relevância ecológica e socioeconômica

(McNally et al., 2011). Esses ambientes não apenas sustentam uma rica biodiversidade, mas também oferecem serviços ecossistêmicos indispensáveis, o que reforça a urgência de sua proteção efetiva e manejo adequado.

Conclusão

Este estudo revelou que a ocorrência e a forma como o *C. bicolor* se distribui no ambiente estão intimamente conectadas aos manguezais. Essa forte associação positiva indica uma relação ecológica profunda, mostrando que os manguezais não são apenas um ambiente preferencial, mas sim um ecossistema fundamental que fornece recursos cruciais e, talvez, insubstituíveis para a sobrevivência da espécie.

Com isso, chegamos à conclusão de que a conservação do *C. bicolor* está fortemente atrelada a proteção e da saúde dos manguezais. A degradação, fragmentação ou perda desses ecossistemas costeiros representa uma ameaça direta às populações desta ave, fazendo com que as ações para proteção dos mangues sejam uma estratégia eficaz para garantir sua sobrevivência a longo prazo na região estudada.

Referências

- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. D. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische zeitschrift*, 22(6), 711-728.
- BirdLife International. (2018). *Conirostrum bicolor*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2018: e.T22722089A132011675. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22722089A132011675.en>.
- Bryan-Brown, D. N., Connolly, R. M., Richards, D. R., Adame, F., Friess, D. A., & Brown, C. J. (2020). Global trends in mangrove forest fragmentation. *Scientific reports*, 10(1), 7117.
- Arcova, F., & de Cicco, V. (1999). Qualidade da água de microbacias com diferentes usos do solo na região de Cunha, estado de São Paulo: water quality in small watersheds with different land. *Scientia florestals*, Piracicaba, 56, 125134.
- Farias, M., Roper, J., & Cavarzere, V. (2022). Bird communities and their conservation priorities are better understood through the integration of traditional and citizen science data: an example from Brazilian Atlantic Forest. *Citizen Science: Theory and Practice*, 7(1).
- Ferreira, A. K. Q., Maia, R. C., Cabral, N. R. A. J., & Rocha, W. F. (2022). Os manguezais e as unidades de conservação no Brasil. In *XIII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental*. Teresina, PI (pp. 1-7).

Friess, D. A., Rogers, K., Lovelock, C. E., Krauss, K. W., Hamilton, S. E., Lee, S. Y., ... & Shi, S. (2019). The state of the world's mangrove forests: past, present, and future. *Annual Review of Environment and Resources*, 44(1), 89-115.

Hamilton, S. E., & Casey, D. (2016). Creation of a high spatio-temporal resolution global database of continuous mangrove forest cover for the 21st century (CGMFC-21). *Global Ecology and Biogeography*, 25(6), 729-738.

Hilty, S., & Kirwan G. M. (2020). Bicolored Conebill (*Conirostrum bicolor*), versão 1.0. Em *Birds of the World* (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, DA Christie e E. de Juana, Editores). Laboratório Cornell de Ornitologia, Ithaca, NY, EUA. <https://doi.org/10.2173/bow.bicon1.01>

Kareiva, P., & Wennergren, U. (1995). Connecting landscape patterns to ecosystem and population processes. *Nature*, 373(6512), 299-302.

Koch, E. W., Barbier, E. B., Silliman, B. R., Reed, D. J., Perillo, G. M., Hacker, S. D., ... & Wolanski, E. (2009). Non-linearity in ecosystem services: temporal and spatial variability in coastal protection. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(1), 29-37.

MacKenzie, D. I., Nichols, J. D., Lachman, G. B., Droege, S., Royle, A. A., & Langtimm, C. A. (2002). Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology*, 83(8), 2248-2255.

McNally, C. G., Uchida, E., & Gold, A. J. (2011). The effect of a protected area on the tradeoffs between short-run and long-run benefits from mangrove ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 13945-13950.

Mori, G. M., Zucchi, M. I., Sampaio, I., & Souza, A. P. (2010). Microsatellites for the mangrove tree *Avicennia germinans* (Acanthaceae): Tools for hybridization and mating system studies. *American Journal of Botany*, 97(9), e79-e81.

Myers, N. (1988). Tropical forests and their species: going, going. *Biodiversity*, 1, 28-35.

Santana, J. P., Oliveira, E. V. S., Dantas, T. V. P., Landim, M. F., & Rocha, P. A. (2020). Fitossociologia de manguezais em zonas urbanas: um estudo de caso em Aracaju, Sergipe. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 13(05), 2103-2113.

Schaeffer-Novelli, Y., Soriano-Sierra, E. J., Vale, C. C. D., Bernini, E., Rovai, A. S., Pinheiro, M. A. A., ... & Cintrón-Molero, G. (2016). Climate changes in mangrove forests and salt marshes. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64(spe2), 37-52.

Schubert, S. C., Manica, L. T., & Guaraldo, A. D. C. (2019). Revealing the potential of a huge citizen-science platform to study bird migration. *Emu-Austral Ornithology*, 119(4), 364-373.

Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brazil.

Silveira, L.F., Efe, M.A., Costa, T.V.V., & Oliveira, T.D. (2023). *Conirostrum bicolor* (Vieillot, 1809). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br> DOI: 10.37002/salve.ficha.29778

Souza, C. A., Duarte, L. F. A., João, M. C., & Pinheiro, M. A. (2018). Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica. *Educação Ambiental sobre Manguezais. São Vicente: Unesp*, 16-56.

Souza Jr, C. M., Z. Shimbo, J., Rosa, M. R., Parente, L. L., A. Alencar, A., Rudorff, B. F., ... & Azevedo, T. (2020). Reconstructing three decades of land use and land cover changes in brazilian biomes with landsat archive and earth engine. *Remote Sensing*, 12(17), 2735.

Spalding, M., Kainuma, M., & Collins, L. (2010). *World atlas of mangroves*. Routledge.

Valiela, I., Bowen, J. L., & York, J. K. (2001). Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments: At least 35% of the area of mangrove forests has been lost in the past two decades, losses that exceed those for tropical rain forests and coral reefs, two other well-known threatened environments. *Bioscience*, 51(10), 807-815.

Vikou, S. V. D. P., Paz, O. L. D. S. D., Pilatti, D. M., & Paula, E. V. D. (2023). Análise da pressão antrópica sobre manguezais urbanos: Subsídios à proteção ambiental e ao ordenamento territorial. *Sociedade & Natureza*, 35, e67515.

Anexos

Figura 1. Resposta da ocupação de *C. bicolor* em relação a (a) cobertura de mangue, (b) aquicultura, (c) área urbana, (d) campos alagados, (e) corpos d'água e (f) floresta alagada.

Figura 2. Probabilidade de detecção de *Conirostrum bicolor* ao longo dos 16 anos estudados.

Figura 3. Mapa de calor com a estimativa de ocupação de *Conirostrum bicolor* por município.

Tabela 1. Conjunto de modelos melhor ajustados da modelagem de ocupação estática para testar a probabilidade de ocupação e de detecção de *Conirostrum bicolor*.

CÓDIGO: SB1089

AUTOR: HADASSA LOUYSE DANTAS MARQUES

COAUTOR: MARIA CLARA CANUTO DA COSTA

COAUTOR: SUAMY BEATRIZ DA SILVA OTAVIANO

COAUTOR: ANA LUIZA FERREIRA DE ARAUJO

ORIENTADOR: DANIELLA REGINA ARANTES MARTINS SALHA

TÍTULO: Biomarcadores de ferroptose em Gestantes com DMG e em gestantes diabéticas com COVID-19: Levantamento bibliográfico com ênfase na formação Científica.

Resumo

Durante a gestação, alterações no metabolismo do ferro podem favorecer processos patológicos que comprometem a saúde materna e o desenvolvimento fetal. Nesse contexto, a ferroptose, um tipo de morte celular dependente de ferro e marcada pela peroxidação lipídica, tem se destacado como fator entre a diabetes mellitus gestacional (DMG) e a infecção por SARS-CoV-2. O desequilíbrio no metabolismo do ferro, evidenciado pela redução de SLC7A11 e GPx4 e pelo aumento de proteínas pró-ferroptóticas como ACSL4 e ferritina, cria um ambiente celular propício ao estresse oxidativo. Na DMG, a diminuição da hepcidina favorece a sobrecarga férrica, enquanto na COVID-19 sua elevação, estimulada por citocinas inflamatórias, reflete uma resposta imune exacerbada. Essas alterações conduzem a distúrbios placentários, maior risco cardiovascular materno e repercussões fetais. Estratégias antioxidantes, incluindo dietas ricas em vitaminas, flavonoides e agentes quelantes de ferro, mostram potencial terapêutico, mas ainda carecem de validação clínica quanto à eficácia e segurança em gestantes. Assim, a ferroptose se consolida não apenas como mecanismo patológico, mas também como alvo estratégico para intervenções personalizadas. Investigações futuras devem integrar análises moleculares e ensaios clínicos para aprimorar biomarcadores e orientar terapias que minimizem riscos materno-fetais associados à DMG e à COVID-19.

Palavras-chave: estresse oxidativo; ferroptose; ferro; DMG; COVID - 19; antioxidantes

TITLE: Ferroptosis Biomarkers in Pregnant Women with GDM and in Diabetic Pregnant Women with COVID-19: A Literature Review with Emphasis on Scientific Trainin

Abstract

During pregnancy, alterations in iron metabolism can trigger pathological mechanisms that compromise maternal health and fetal development. Ferroptosis—an iron-dependent regulated cell death process marked by lipid peroxidation—has been highlighted as a mechanistic link between gestational diabetes mellitus (GDM) and SARS-CoV-2 infection. Dysregulation of iron homeostasis, reflected by downregulation of SLC7A11 and GPx4 and upregulation of pro-ferroptotic mediators such as ACSL4 and ferritin, promotes a cellular state prone to oxidative stress. In GDM, reduced hepcidin favors systemic iron overload, whereas in COVID-19, its increase, driven by inflammatory cytokines, mirrors an exacerbated immune response. These disturbances contribute to placental dysfunction, increased maternal cardiovascular vulnerability, and adverse fetal outcomes. Therapeutic perspectives include antioxidant-based strategies, such as diets enriched with vitamins, flavonoids, and iron-chelating agents, although clinical validation of their efficacy and safety during pregnancy remains limited. Thus, ferroptosis is consolidated not only as a key pathophysiological mechanism but also as a potential therapeutic target within precision medicine. Future research should integrate molecular analyses with clinical studies to refine biomarker discovery and support interventions aimed at mitigating maternal–fetal risks associated with GDM and COVID-19.

Keywords: Oxidative stress; Ferroptosis; Iron; GDM; COVID-19; Antioxidants

Introdução

O ferro desempenha papel essencial durante a gestação, sendo fundamental para o metabolismo, atua como cofator enzimático em diversas reações e garante o transporte de oxigênio no sangue, o que contribui diretamente para o desenvolvimento fetal e a manutenção da saúde materna. Entretanto, quando seu metabolismo é alterado ou inadequado, pode ocorrer um processo patológico conhecido como ferroptose. A ferroptose é um tipo específico de morte celular induzida pelo acúmulo excessivo de ferro intracelular, potencializado pela peroxidação lipídica e regulado por sistemas oxidativos e antioxidantes.

Nesse processo, as enzimas lipoxigenase (LOX) e ACSL4 exercem papel central, estão diretamente envolvidas em vias inflamatórias. A ativação delas pode resultar em sinais típicos de inflamação, como dor, vermelhidão, vasodilatação e, principalmente, o dano celular. Em contrapartida, a glutathione peroxidase 4 (GPx4), enzima antioxidante, atua como um importante mecanismo de defesa contra a ferroptose exacerbada, ela converte os peróxidos lipídicos em moléculas inofensivas para a célula. A homeostase do ferro é controlada por hormônios como a hepcidina, proteínas transportadoras (ferroportina), armazenadoras (ferritina) e exportadoras (SLC7A11). A desregulação desses mecanismos pode levar à sobrecarga de ferro, criando um ambiente intracelular propício à ferroptose e ao estresse oxidativo, especialmente em tecidos sensíveis como a placenta.

Nesse contexto, observa-se que a elevação das concentrações de ferro interfere diretamente no metabolismo energético celular e está associada ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como a diabetes mellitus gestacional (DMG) (ZHAO et al., 2023). A DMG, caracterizada pela intolerância à glicose com início durante a gravidez, pode estar relacionada à inflamação crônica de baixo grau – condição que também favorece o surgimento da ferroptose (TORRES-TORRES et al., 2024). Assim, há uma interação direta entre o desequilíbrio do ferro, a morte celular inflamatória e a disfunção metabólica gestacional. Além disso, a presença de infecções virais, como a provocada pelo SARS-CoV-2, pode agravar esse cenário. Estudos apontam que gestantes infectadas têm maior risco de

desenvolver DMG, e essa infecção pode intensificar processos inflamatórios sistêmicos (Rincón-Guevara et al., 2024). Logo, essa associação pode comprometer ainda mais a regulação do ferro, potencializando a ferroptose. Dessa maneira, a combinação de hiperglicemia, estresse oxidativo e inflamação viral pode gerar consequências graves, como disfunção placentária, aumento do risco cardiovascular materno e, até mesmo, a morte do feto.

Sob esse viés, para identificar a presença dessas condições, faz-se necessário a investigação por meio de biomarcadores, que são moléculas importantes na regulação do metabolismo do ferro e no estresse oxidativo. Portanto, a correlação entre ferroptose, diabetes mellitus gestacional e infecções virais representa uma patologia relevante na gestação, exigindo atenção quanto ao uso do ferro, ao controle glicêmico e investigação dessas condições através de biomarcadores durante o período gestacional.

O objetivo deste estudo é revisar a literatura sobre os mecanismos moleculares da ferroptose na gestação e identificar seus principais biomarcadores, incluindo em gestantes com COVID-19. Os objetivos específicos incluem identificar biomarcadores associados à ferroptose, analisar o impacto da coinfeção por SARS-CoV-2 em gestantes diabéticas e não diabéticas, e desenvolver competências do aluno de iniciação científica, abrangendo ética em pesquisa, leitura crítica de artigos, elaboração de estudos experimentais, criação de questionários socioeconômicos e culturais, organização de dados estatísticos e aprendizado de técnicas laboratoriais como ELISA e qPCR.

Metodologia

O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados PubMed, Scopus e LILACS, utilizando como descritores e palavras-chave: Ferroptosis, Pregnancy, Gestational Diabetes Mellitus, COVID-19, SARS-CoV-2, Biomarkers, Oxidative Stress, Iron Metabolism, “GPX4”, “Ferritin” e “ACSL4”. Foram aplicados filtros para seleção de publicações dos últimos cinco anos, abrangendo estudos em humanos, ensaios clínicos, pesquisas in vitro (em células) e in vivo (em modelos animais). A análise crítica dos artigos foi conduzida a partir de critérios de inclusão e exclusão previamente definidos, e os dados obtidos foram organizados em tabelas, considerando os mecanismos envolvidos e as terapias moduladoras identificados

Resultados e Discussões

Foi realizada a análise da expressão de biomarcadores associados à ferroptose em gestantes com diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG) e naquelas infectadas pelo SARS-CoV-2. O estudo considerou aspectos funcionais de cada marcador e os métodos laboratoriais utilizados para sua identificação (Tabela 1), possibilitando a identificação de convergências entre os mecanismos fisiopatológicos dessas duas condições, especialmente nas vias relacionadas ao metabolismo do ferro e ao estresse oxidativo.

O primeiro marcador investigado foi o SLC7A11, a expressão tecidual é avaliada por RT-qPCR. Observa-se uma redução significativa desse transportador tanto em pacientes com DMG quanto nas infectadas por COVID-19. Essa diminuição compromete a captação de

cisteína, reduz a síntese de glutathione (GSH) e, por consequência, enfraquece os sistemas antioxidantes celulares, favorecendo a peroxidação lipídica.

A glutathione peroxidase 4 (GPx4) também apresenta níveis séricos reduzidos em ambas as condições, que é comumente analisada por ELISA. Essa queda evidencia o enfraquecimento das defesas antioxidantes e o aumento da vulnerabilidade celular à ferroptose.

Em relação ao metabolismo férrico, há um aumento na concentração de ferritina no soro. Embora esse achado possa refletir uma resposta compensatória ao estresse oxidativo, também sugere a presença de inflamação sistêmica e sobrecarga de ferro, o que pode intensificar a morte celular ferroptótica.

A enzima ACSL4, que favorece a inserção de ácidos graxos nas membranas celulares — substratos da peroxidação lipídica — mostra expressão elevada em ambas as doenças, que reforça sua participação na indução da ferroptose.

A análise da hepcidina revela comportamentos opostos. Em mulheres com DMG, seus níveis estão reduzidos, que resulta em maior liberação de ferro para a corrente sanguínea e aumento da fração livre, um fator de risco para estresse oxidativo. Por outro lado, nas infectadas por COVID-19, observou-se elevação desse hormônio, provavelmente estimulada por citocinas inflamatórias como a IL-6.

Além disso, foram identificadas intervenções com potencial inibitório da ferroptose, descritas na Tabela 2. Dentre elas: Dietas antioxidantes, ricas em vitaminas C, E e A, reduzem a peroxidação lipídica ao neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS), promovendo proteção celular e equilíbrio redox. Flavonoides, presentes em frutas, vegetais e chás, diminuem a produção de ROS e estimulam enzimas antioxidantes, como a própria GPx4, oferecendo proteção frente ao estresse oxidativo. Quelantes de ferro atuam sequestrando íons férricos livres, contribuindo para a redução do estresse oxidativo, especialmente em contextos de sobrecarga férrica.

Discussão

A análise integrada desses biomarcadores evidencia a relevância do eixo ferro-estresse oxidativo-ferroptose como ponto comum entre DMG e COVID-19 em gestantes. Isso pode ter implicações diretas nos desfechos obstétricos. Diante desse cenário, abordagens terapêuticas que modulam essas vias tornam-se promissoras, especialmente para gestantes de alto risco.

No conjunto, esses dados sugerem que DMG e COVID-19 compartilham disregulações importantes nas vias relacionadas à ferroptose. A redução de antioxidantes como GPx4 e SLC7A11, associada ao aumento de ferritina e ACSL4, cria um microambiente celular propício à peroxidação lipídica e à morte celular dependente de ferro. Entretanto, a regulação divergente da hepcidina resalta particularidades no controle do ferro entre as duas condições, que reflete as diferentes origens das patologias (metabólica e infecciosa).

Logo, entre as estratégias preventivas e terapêuticas, os compostos naturais se destacam, incluindo dietas antioxidantes, flavonoides e agentes quelantes. Esses compostos exercem múltiplos efeitos benéficos, desde a neutralização de ROS até a modulação de enzimas e o controle da biodisponibilidade do ferro. No entanto, apesar do potencial promissor demonstrado em estudos pré-clínicos, a aplicação desses achados em nível clínico ainda enfrenta barreiras significativas. É essencial a realização de ensaios controlados que

assegurem eficácia e segurança, considerando a gestação. Além disso, é necessário investigar a interação desses compostos com medicamentos comumente utilizados nesse período.

Sob esse viés, a administração de quelantes deve ser individualizada, pois sua indicação em pacientes com metabolismo férrico adequado pode trazer efeitos adversos. Ademais, a ingestão isolada de vitaminas antioxidantes não é suficiente, sendo indispensável uma abordagem terapêutica combinada e supervisionada por profissionais especializados. Por fim, a compreensão profunda dos mecanismos moleculares que envolvem a ferroptose ainda se faz ausente. A integração de análises bioinformáticas com validações clínicas será fundamental para o desenvolvimento de biomarcadores e estratégias terapêuticas personalizadas. Assim, será possível avançar em direção a tratamentos mais eficazes e seguros, melhorando os prognósticos materno-fetais e reduzindo os impactos da DMG e da infecção por COVID-19.

Conclusão

Os achados deste estudo evidenciam que a ferroptose representa um importante ponto de convergência entre os mecanismos fisiopatológicos da diabetes mellitus gestacional e da infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação. A redução na expressão de marcadores antioxidantes como SLC7A11 e GPx4, associada ao aumento de proteínas pró-ferroptóticas como ACSL4 e ferritina, sugere um ambiente celular altamente suscetível ao estresse oxidativo e à morte celular dependente de ferro. Além disso, as alterações contrastantes nos níveis de hepcidina indicam que, embora existam semelhanças nas vias envolvidas, as doenças apresentam particularidades na forma como regulam o metabolismo férrico.

Nesse contexto, terapias que atuam sobre o estresse oxidativo e a homeostase do ferro, como dietas antioxidantes, flavonoides e quelantes de ferro, demonstram potencial como estratégias adjuvantes no manejo dessas condições. Entretanto, apesar de serem promissores, é fundamental que sua aplicação clínica seja avaliada, sobretudo em gestantes, devido às particularidades do período gestacional e aos possíveis riscos materno-fetais.

Portanto, a ferroptose se destaca não apenas como uma patologia relevante, mas como um alvo terapêutico. A continuidade de estudos clínicos e moleculares é essencial para validar o uso seguro de intervenções antioxidantes e moduladoras do ferro em gestantes, possibilitando avanços no desenvolvimento de terapias personalizadas que reduzam os riscos e melhorem os desfechos obstétricos associados à DMG e à COVID-19.

Referências

EL HAJJ, Sarah; CANABADY-ROCHELLE, Laetitia; GAUCHER, Caroline. Nature-inspired bioactive compounds: a promising approach for ferroptosis-linked human diseases? *Molecules*, v. 28, n. 6, p. 2636, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28062636>.

LI, Qiuhe; YANG, Xiaohang; LI, Tiegang. Natural flavonoids from herbs and nutraceuticals as ferroptosis inhibitors in central nervous system diseases: current preclinical evidence and future perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, v. 16, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1570069>.

RINCÓN-GUEVARA, Oscar et al. Association between SARS-CoV-2 infection during pregnancy and gestational diabetes: a claims-based cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 79, n. 6, p. 1386-1393, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae416>.

TORRES-TORRES, Johnatan et al. Cellular and molecular pathophysiology of gestational diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 11641, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms252111641>.

WU, You et al. Predictive value of ferroptosis-related biomarkers for diabetic kidney disease: a prospective observational study. *Acta Diabetologica*, v. 60, p. 507-516, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00592-022-02028-1>.

ZHANG, Meng; CHEN, Xin; ZHANG, Yumei. Mechanisms of vitamins inhibiting ferroptosis. *Antioxidants*, v. 13, n. 12, p. 1571, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13121571>.

ZHANG, Zhen et al. Therapeutic effects of natural compounds against diabetic complications via targeted modulation of ferroptosis. *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1425955>.

ZHAO, Yan et al. Ferroptosis and its potential role in gestational diabetes mellitus: updated evidence from pathogenesis to therapy. *Frontiers in Endocrinology*, v. 14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1177547>.

Anexos

Biomarcadores associados à DMG e à COVID-19: expressão e métodos de análise

Terapias modeladoras da ferroptose e sua recomendação para gestantes

CÓDIGO: SB1098

AUTOR: MARCELO RAIONYNE DA COSTA FERNANDES

COAUTOR: FABRICIO CLAUDINO DE ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: GUILHERME ORTIGARA LONGO

TÍTULO: Quanto vale um recife saudável? Uma abordagem sobre a disposição a pagar pelo turismo recifal

Resumo

Os recifes tropicais abrigam cerca de 25% da biodiversidade marinha e fornecem serviços ecossistêmicos essenciais, como turismo, alimentação, proteção costeira e valor estético. Entretanto, pouco se sabe sobre como a degradação e as mudanças climáticas afetam o interesse de visitação turística aos recifes. Este estudo avaliou economicamente a percepção de visitantes da Área de Proteção Ambiental dos Recifes de Corais (APARC/RN) em seis cenários distintos de conservação, que variam no estado de saúde dos corais e na presença/diversidade de peixes. Hipotetizou-se que cenários mais conservados seriam mais valorizados e que a experiência prévia em recifes influenciaria a disposição a pagar (DAP). Foram realizadas 63 entrevistas utilizando fotos ilustrativas. A presença de peixes aumentou significativamente a DAP, independentemente da riqueza de espécies ou do estado dos corais, enquanto cenários sem peixes e com corais branqueados apresentaram desvalorização de até 23%. A experiência prévia em recifes não teve efeito relevante. Estima-se que a degradação recifal pode gerar perdas anuais de até R\$ 4,3 milhões apenas com o turismo recifal, sem considerar impactos econômicos em setores associados. Esses achados reforçam a importância da estética e da biodiversidade dos recifes para políticas públicas de conservação marinha e para a valorização socioeconômica do turismo.

Palavras-chave: Disposição a pagar. Turismo recifal. Branqueamento. Conservação.

TITLE: How much is a reef worth? An approach to willingness to pay for reef tourism

Abstract

Tropical reefs harbor around 25% of marine biodiversity and provide essential ecosystem services, such as tourism, food provision, coastal protection, and aesthetic value. However, little is known about how reef degradation and climate change affect tourist visits to the reefs. This study economically assessed the perception of visitors to the Coral Reef Environmental Protection Area (APARC/RN, Brazil) under six different conservation scenarios, varying coral health and fish presence/diversity. It was hypothesized that better-conserved scenarios would be more valued and that prior reef experience would influence willingness to pay (WTP). A total of 63 interviews were conducted using illustrative photos. The fish presence significantly increased WTP, regardless of species richness or coral condition, while scenarios without fish and with bleached corals showed up to 23% lower WTP. Prior reef experience had no significant effect. Reef degradation could result in annual losses of up to BRL 4.3 million from reef tourism alone, excluding associated economic sectors. These

findings emphasize the importance of reef aesthetics and biodiversity for marine conservation policies and the socioeconomic value of tourism.

Keywords: Willingness to pay. Reef tourism. Coral bleaching. Marine conservation

Introdução

Apesar de cobrirem menos de 1% do fundo dos oceanos, os recifes tropicais abrigam cerca de 25% das espécies marinhas, incluindo peixes, cnidários, crustáceos, moluscos e enfim (Smith et al., 2024; UNEP, 2023). Estima-se que existam mais de 6.000 espécies de peixes recifais e aproximadamente 821 espécies de corais construtores (Kulbicki et al., 2013; McWilliam et al., 2018), evidenciando a alta biodiversidade desses ecossistemas. Além da riqueza biológica, os recifes fornecem serviços ecossistêmicos essenciais, como provisão de alimentos, proteção costeira e serviços culturais, incluindo turismo e recreação (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Hammerschlag et al., 2019; Tavares et al., 2019). A apreciação estética, baseada na complexidade visual, formada pelos diferentes elementos das paisagens subaquáticas, é especialmente relevante para o turismo, contribuindo para a identidade cultural, inspiração, lazer e conexão espiritual com o ambiente (Waechter et al., 2024; Shiffman et al., 2022). Em algumas regiões, como no Tahiti, recifes são considerados parte de uma herança espiritual viva dos povos ancestrais, esses valores intangíveis reforçam seu valor cultural e de identidade humana (Shiffman et al., 2022;).

A diversidade de espécies e a complexidade visual dos recifes influenciam significativamente no número de visitantes e na atratividade turística (Hausmann et al., 2017; Chung et al., 2018). No Nordeste do Brasil, recifes como Abrolhos, Costa dos Corais e os Parrachos são particularmente valorizados por suas paisagens subaquáticas esteticamente atrativas, o que reforça seu papel no turismo regional (Waechter et al., 2024). Estima-se que o turismo recifal gere globalmente cerca de US\$ 36 bilhões por ano, sendo US\$ 19 bilhões diretamente relacionados a atividades como mergulho com snorkel e cilindro e passeios de observação da fauna, os US\$ 17 bilhões restantes são provenientes de atividades indiretas, como hospedagem, gastronomia e comércio local (Spalding et al., 2017). Estes valores destacam a relevância econômica dos recifes para comunidades costeiras e para a indústria global do turismo, além de reforçar seu papel nos serviços ecossistêmicos.

Apesar de sua importância, os recifes enfrentam pressões globais e locais. O aumento da temperatura e acidificação oceânica têm causado branqueamento de corais, afetando a estrutura física dos recifes e a fauna associada, especialmente peixes recifais que dependem dos corais para abrigo, alimentação e reprodução (Bleuel et al., 2021; Rodrigues et al., 2025; Luza et al., 2022). A redução da complexidade estrutural causada pelo branqueamento compromete funções ecológicas essenciais, como controle de algas e ciclagem de nutrientes, diminuindo a atratividade estética e turística dos recifes (Luza et al., 2022). Impactos locais, como sobrepesca, poluição, turismo desordenado, também prejudicam a integridade ambiental e afetam o bem-estar das populações costeiras (Camp & Fraser, 2012; Roche et al., 2016; Tedesco et al., 2017; Hoegh-Guldberg et al., 2019). Estimativas indicam que as perdas de serviços ecossistêmicos recifais relacionadas ao clima podem atingir aproximadamente US\$ 500 bilhões até 2100, com impactos diretos na subsistência das comunidades locais (Heron et al., 2017).

Neste contexto, este estudo avaliou a percepção econômica dos turistas da Área de Proteção Ambiental Recifes de Corais (APARC/RN) em seis cenários de conservação, variando a saúde dos corais e a diversidade de peixes. O objetivo foi investigar se o estado de conservação do recife influencia a disposição a pagar (DAP) pelo turismo recifal, considerando também a experiência prévia dos visitantes em outros recifes. Espera-se que cenários mais conservados recebam valores monetários mais altos e que visitantes recorrentes em recifes tenham maior DAP do que quem nunca fez a visita. Este trabalho pode contribuir para o entendimento da valoração estética e econômica dos recifes, fornecendo estratégias de conservação.

Metodologia

Área de estudo

O estudo foi realizado na Área de Proteção Ambiental Recifes de Corais – APARC (<http://www.idema.rn.gov.br>), com coordenadas de 5°23'00" S e 35°18'00" O, no Estado do Rio Grande do Norte (RN). Criada em 2001, a APARC é uma unidade de conservação que abrange os municípios de Rio do Fogo, Maxaranguape e Touros, no litoral norte do RN (Fig. 1). Possui 136.344 ha, os parrachos estão localizados a cerca de 6 km da linha costeira. A plataforma continental da região se estende por 40 km com habitats diversos, dominados por zoantídeos, algas calcárias e corais, sendo fundamentais para a conservação da biodiversidade marinha (Feitosa et al., 2002). Os parrachos sustentam a pesca local e o turismo o ano todo, recebendo mais de 130 mil turistas anuais.

Coleta de dados

As entrevistas foram realizadas de dezembro a março, com questionários aplicados presencialmente a turistas maiores de 18 anos, após o passeio aos parrachos. A coleta ocorreu em pontos de apoio turístico, logo após o desembarque das lanchas, buscando captar impressões recentes. Os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e convidados a participar voluntariamente, em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFRN). O instrumento incluiu o apoio visual de seis fotos editadas, retratando seis cenários, variando quanto à saúde dos corais (saudáveis ou branqueados) e à riqueza/abundância de peixes (Fig. 2). As imagens foram mostradas em ordem aleatória e, após cada uma, o turista respondia: “Qual valor você pagaria para visitar um recife como este?”, com a resposta em reais (R\$) como valor hipotético de DAP. Os cenários foram definidos como: corais saudáveis com quatro espécies de peixes, três indivíduos de cada (CSPD); saudáveis com 12 indivíduos de uma espécie (CSPI); branqueados com quatro espécies, três indivíduos de cada (CBPD); saudáveis sem peixes (CSPA); branqueados com 12 indivíduos de uma espécie (CBPI); e branqueados sem peixes (CBPA). Os corais representados são o *Siderastrea stellata* e *Palythoa caribaeorum*. Os peixes retratados são: *Acanthurus chirurgus*, *Abudefduf saxatilis*, *Sparisoma axillare* e *Haemulon aurolineatum*, espécies comuns na área de estudo (Roos et al., 2019). Além dos valores de DAP, o questionário incluiu perguntas sobre: nome, idade, número de viagens por ano, custo de viagem, valor do passeio, experiência prévia em recifes e renda. Para este trabalho, foram usados apenas dados de visita prévia, renda e valores de DAP.

Análise de dados

Para avaliar diferenças nos valores atribuídos a distintos cenários, aplicamos um modelo linear generalizado misto (GLMM), adequado para dados com medidas repetidas. Os efeitos

fixos incluíram os seis cenários de conservação e a experiência prévia em recifes (visitou ou não). O identificador de cada entrevistado foi usado como efeito aleatório para controlar a estrutura de medidas repetidas, e a renda dos participantes foi considerada como fator aleatório para controlar diferenças individuais. Como a variável resposta (valor monetário) tem distribuição contínua, positiva e assimétrica, ajustamos o modelo com distribuição Tweedie e função de ligação log. O teste post-hoc foi realizado entre os cenários, e a significância dos efeitos fixos foi avaliada pelo teste de Wald. A qualidade do ajuste do modelo foi verificada pela inspeção dos resíduos (Fig. S1). As análises foram conduzidas no software R (v. 4.4.2) com os pacotes glmmTMB, emmeans, DHARMA e ggplot2.

Extrapolação monetária

Complementando a análise estatística, realizamos uma extrapolação econômica simples com base nos valores médios de DAP atribuídos aos cenários extremos: mais conservado (CSPD) e menos conservado (CBPA). Estimamos a diferença potencial na receita anual do turismo em função da conservação dos recifes, multiplicando a diferença média de DAP pelo número médio anual de visitantes à APARC (~130.000 pessoas). A fórmula utilizada foi:

$$\Delta \text{ Receita} = (\text{DAP}_{\text{cenário 1}} - \text{DAP}_{\text{cenário 6}}) \times n^{\circ} \text{ de visitantes/ano}$$

Essa abordagem permite estimar a perda ou renda econômica hipotética anual, baseado no estado de conservação do recife.

Resultados e Discussões

No total foram realizadas 63 entrevistas, a maioria dos entrevistados pertencem às classes econômicas B e C (Fig. 3). A idade média dos entrevistados foi de 39 anos, com idade mínima de 18 anos e máxima de 71 anos. A maioria dos turistas entrevistados vinham do sudeste do Brasil, principalmente São Paulo e Minas Gerais. Os valores atribuídos pelos turistas variaram entre R\$ 0 e R\$ 500,00 por cenário, com uma média geral de R\$ 130,00 (dp $\pm$ 72,80) inferior ao valor médio pago pelos turistas no passeio (R\$ 169,00), sugerindo sensibilidade dos visitantes às características visuais dos recifes. Embora os visitantes com experiência prévia tenham atribuído valores ligeiramente mais altos média = R\$ 131,00; (dp $\pm$ 74,90) do que aqueles que visitaram um recife pela primeira vez média = R\$ 129,00; (dp $\pm$ 70,00), essa diferença não foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 0.13$, gl = 1, p = 0.723) (Fig. S1). Como a experiência prévia de visita não foi significativa, a interpretação centrou-se nos efeitos principais dos valores atribuídos por diferentes cenários de estado de conservação. Os valores monetários atribuídos pelos entrevistados variaram significativamente entre os diferentes cenários de estado de conservação do recife ($\chi^2 = 11.34$, gl = 5, p = 0.045; Fig. 4). O cenário mais conservado (corais saudáveis com quatro espécies de peixes), obteve os maiores valores médios de DAP de R\$145,00 (dp $\pm$ 75.1, Fig. 4). Em contraste, o cenário menos conservado (corais branqueados e peixes ausentes) foi o menos valorizado média = R\$112,00; (dp $\pm$ 68,20). Os demais cenários receberam os respectivos valores: cenário 2 média = R\$ 134,00; (dp $\pm$ 66,50), cenário 3 média = R\$ 137,00; (dp $\pm$ 73,00), cenário 4 média = R\$ 114,00; (dp $\pm$ 69,40) e cenário 5 média = R\$141,00; (dp $\pm$ 79,80). Nas comparações entre os pares de cenários (Tabela 1), observamos diferenças significativas (p<0.05) em todas as combinações entre cenários sem e com a presença de peixes — independentemente da riqueza e abundância das espécies de peixes e da variação na saúde

dos corais — foram estatisticamente diferentes entre si. Em contraste, as combinações de cenários onde em ambos havia peixes ou onde havia apenas corais não diferiram estatisticamente. Por fim, a comparação entre os cenários extremos — 145,00 reais (CSPD, o melhor conservado) vs. R\$112,00 (CBPA, o mais degradado) — permite estimar o impacto econômico direto da degradação recifal. Considerando a média de 130.000 visitantes por ano na APARC (Feitosa., 2002), e a disposição do visitante a pagar em média R\$145,00 pelo passeio no cenário melhor conservado (com diversidade de peixes e corais saudáveis), poderíamos estimar uma perda potencial de receita associada à degradação, de aproximadamente 4,3 milhões de reais anuais, ou seja, ao invés de um montante anual de aproximadamente R\$18.850.000,00 pela visita no melhor cenário possível, haveria uma desvalorização de 23 % na receita anual gerada para o Estado em caso de degradação do ambiente (Fig. 5).

Avaliamos se o estado de conservação dos recifes influencia a disposição a pagar (DAP) por experiências turísticas em ambientes recifais dos visitantes da Área de Proteção Ambiental Recifes de Corais, no Rio Grande do Norte. Testamos a hipótese de que cenários com maior integridade ecológica — corais saudáveis e maior diversidade de peixes — seriam mais valorizados pelos turistas, principalmente por aqueles que já visitaram um recife. Os resultados confirmaram parcialmente essa expectativa pois a variação entre os valores foi pouca: o cenário com corais saudáveis e quatro espécies de peixes apresentou o maior valor médio de DAP (145 reais), seguido por outros cenários com diferentes componentes, como o cenário com corais branqueados e uma única espécie de peixe (141 reais) e cenário com corais branqueados e quatro espécies de peixes (137 reais), o cenário com corais saudáveis porém com uma única espécie de peixe obteve uma valoração média de (134 reais). Em contraste, cenários mais degradados como o cenário que representava o recife branqueado sem peixes foram 23% menos valorizados (112 reais), seguido pelo cenário com corais saudáveis, porém sem peixes, que teve valor médio similar (113 reais). Os visitantes demonstraram clara preferência por cenários com peixes, independentemente das espécies presentes, e valorizaram menos, os cenários com a presença apenas dos corais, zoantídeos e algas, os quais foram menos valorizados. Testamos também, se a experiência prévia dos visitantes teve influência na DAP pelos diferentes cenários, o resultado mostra que a experiência do turista em outro recife não influenciou sua DAP em nenhum dos cenários. Isso sugere que a percepção estética da saúde dos recifes — expressa por meio de elementos visuais, como a diversidade de peixes e a vitalidade (cor) dos corais — é valorada de maneira semelhante entre visitantes que já estiveram ou não em um ecossistema recifal.

A distribuição dos entrevistados por categoria de renda mostra uma predominância de turistas pertencentes às classes C e B, portanto, um perfil de renda média entre os visitantes da APARC, potencialmente favorecendo a DAP por cenários mais conservados (Carson et al., 2001). A desigualdade no acesso ao turismo de vida selvagem, reflete o que a literatura aponta sobre as injustiças socioambientais na distribuição dos benefícios dos serviços ecossistêmicos, evidenciando que populações com menores rendas ou com menos acesso a recursos, tendem a ser excluídas dessas oportunidades (Remoundou et al., 2009; Silva et al., 2020). Políticas públicas que utilizem instrumentos econômicos para financiar a conservação, como taxas ambientais ou fundos de visitação, devem considerar o perfil socioeconômico dos visitantes (Martin, McGuire & Sullivan., 2013). Caso contrário, podem acabar reforçando ainda mais desigualdades e, elitizando o acesso a ambientes bem conservados, como ocorre em Fernando de Noronha, por exemplo.

Outros fatores externos à biodiversidade submersa, como a transparência da água, a presença de recifes expostos ou a própria estética da paisagem acima da superfície, também podem influenciar a valoração dos turistas — especialmente daqueles que não entram na água para ver os organismos recifais. Conforme Waechter et al., (2024) imagens de recifes com componentes visíveis fora d'água, como formações expostas na maré baixa, tendem a ser mais valorados por visitantes com menor familiaridade com o ambiente subaquático. É necessário considerar também a tendência humana de valorizar mais os organismos animais do que os vegetais, ou outros grupos menos carismáticos — fenômeno conhecido como zoochauvinismo (Allen., 2019; Balding & Williams., 2016). Nos recifes, isso pode se refletir na preferência por cenários com presença de peixes, enquanto os corais, muitas vezes notados como “plantas” ou “rochas” ou até meros fundos de cenários, podem não despertar o mesmo interesse visual ou emocional, o que contribui com a desvalorização ambiental.

Isso ficou claro na comparação entre os cenários com corais saudáveis ou branqueados, porém sem peixe, sendo os menos valorizados pelos turistas. Então a estética percebida pelos visitantes, pode ser mediada por fatores subjetivos e contextuais, e não somente pela biodiversidade presente e experiência prévia. A simples visita, sem mergulho ou interpretação do ambiente no qual a pessoa está inserida, pode não gerar conexão emocional suficiente ou conhecimento sobre o ecossistema (Ballantyne et al., 2011). Isso pode dificultar que turistas, mesmo com vivência em um outro recife, diferenciem cenários mais conservados dos menos conservados, especialmente em recifes menos coloridos e de menor complexidade estrutural (Tribot et al., 2018; Waechter et al., 2024). Apesar da ausência de diferença significativa associada à experiência prévia, é importante destacar o papel das experiências educativas no turismo de natureza, como visitas guiadas e mergulhos interpretativos, que possam gerar maior compreensão e conexão com o recife, e consequentemente, maior valorização pelo ecossistema (Camp & Fraser., 2012). Guias locais capacitados podem ter um papel-chave nesse processo.

O recife conservado, com corais saudáveis e presença de peixes, apresentou uma média de arrecadação anual com visitas, estimada em R\$18,85 milhões, enquanto o recife menos conservado, com corais branqueados e completa ausência de peixes, gera aproximadamente R\$ 14,56 milhões. A manutenção da integridade ecológica dos recifes pode resultar em um incremento de até R\$ 4,29 milhões por ano somente em relação aos passeios aos parrachos. Esses dados reforçam a importância da conservação dos recifes não apenas por sua biodiversidade, mas também pelo seu valor socioeconômico e, de manutenção do turismo local, especialmente em um cenário em que mudanças climáticas e outras pressões crescentes, como a poluição, tem acelerado a deterioração de áreas costeiras.

Conclusão

Este estudo quantifica a disposição a pagar (DAP) por experiências turísticas em recifes, com base em atributos visuais, contribuindo para a valoração econômica de serviços ecossistêmicos marinhos. A metodologia, que utiliza imagens representando diferentes cenários de conservação, mostrou-se prática, eficiente e replicável, mesmo para visitantes sem experiência prévia em ambientes recifais. Os resultados indicam que a diversidade de cores, a presença de peixes e a complexidade estrutural são fatores determinantes na percepção de valor pelos turistas. Guias turísticos capacitados em educação ambiental podem reforçar comportamentos compatíveis com a conservação, além de orientar os visitantes sobre

a importância da biodiversidade. Atuando em estratégias de gestão participativa, sugerindo visitas ao museu “De Olho nos Corais” na própria APARC, taxas diferenciadas conforme a condição econômica e passeios educativos em escolas públicas, podem promover tanto a conservação quanto a inclusão social, garantindo que o acesso a recifes bem conservados seja mais equitativo.

Entre as limitações do estudo estão o uso de imagens estáticas, que não reproduzem a experiência sensorial completa, a possibilidade de cansaço dos entrevistados ou respostas influenciadas por comparações imediatas entre cenários, e o fato de nem todos os visitantes mergulharem no ambiente. Futuras pesquisas podem utilizar realidade virtual para simular mergulhos, permitindo que os turistas vivenciem os atributos estéticos e ecológicos dos recifes de forma mais realista. Além disso, métodos de valoração revelada, como o custo de viagem, podem complementar a análise, estimando a DAP com base no comportamento real dos visitantes. No entanto, esta pesquisa reforça a importância de conservar os recifes não apenas pela biodiversidade, mas também pelo seu valor econômico e cultural, mostrando como experiências turísticas bem planejadas podem fortalecer a conexão dos visitantes com o ambiente e apoiar a gestão sustentável na APARC.

Referências

- ALLEN, W. L. Animal bias: towards a more inclusive understanding of wildlife. *People and Nature*, v. 1, n. 3, p. 376–390, 2019.
- BALDING, M.; WILLIAMS, K. J. H. Plant blindness and the implications for plant conservation. *Conservation Biology*, v. 30, n. 6, p. 1192–1199, 2016.
- BARKLEY, H. C. et al. Repeat bleaching of a central Pacific coral reef over the past six decades (1960–2016). *Communications Biology*, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2018.
- BLEUEL, J.; PENNINO, M. G.; LONGO, G. O. Coral distribution and bleaching vulnerability areas in Southwestern Atlantic under ocean warming. *Scientific Reports*, v. 11, 12833, 2021.
- CALADO, J. F.; MOREIRA, A. L. P.; MENDES, L. F. O que sabemos sobre os impactos ambientais do turismo nos recifes tropicais do Brasil? *Revista Brasileira de Pesquisa em Turismo*, São Paulo, v. 16, e-2420, 2022.
- CAMP, E.; FRASER, D. Influence of conservation education dive briefings as a management tool on the timing and nature of recreational SCUBA diving impacts on coral reefs. *Ocean & Coastal Management*, v. 61, p. 30–37, 2012.
- CARSON, R. T.; FLORES, N. E.; MEADE, N. F. Contingent valuation: Controversies and evidence. *Environmental and Resource Economics*, v. 19, n. 2, p. 173–210, 2001.
- CHENG, T. M.; WU, H. C. How do environmental knowledge, environmental sensitivity, and place attachment affect environmentally responsible behavior? An integrated approach for sustainable island tourism. *Journal of Sustainable Tourism*, v. 23, n. 4, p. 557–576, 2015.
- CHUNG, M. G.; DIETZ, T.; LIU, J. Global relationships between biodiversity and nature-based tourism in protected areas. *Ecosystem Services*, v. 34, p. 11–23, 2018.

COSTANZA, R. et al. Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change*, v. 26, p. 152–158, 2014. Disponível em:

D'AGATA, S. Ecosystems services at risk. *Nature Climate Change*, v. 12, p. 13–14, 2022.

FEITOSA, F. A. N.; MACHADO, R. C. A.; KOENING, M. L.; BASTOS, R. B.; JALES, M. C. Phytoplankton productivity and hydrology of Porto de Galinhas reef ecosystem (Pernambuco, Brazil). *Journal of Coastal Research*, v. 30, n. 2, p. 371–378, 2014. FRANÇA, F. M. et al. Climatic and local stressor interactions threaten tropical forests and coral reefs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 375, n. 1794, 20190116, 2020.

GIGLIO, V. J. et al. Tourists' perceptions and willingness to pay for environmental conservation: A study in Brazilian marine ecosystems. *Journal of Coastal Research*, v. 85, p. 594–598, 2018.

GIL, M. A. et al. Rapid tourism growth and declining coral reefs in Akumal, Mexico. *Marine Biology*, v. 162, n. 11, p. 2225–2233, 2015.

GOMES, M. P.; VITAL, H. Reviews of geomorphological compartmentation of the continental shelf of Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Geociências*, v. 40, p. 321–329, 2010.

GOMES, L. C.; MONTEIRO, J. F.; CARVALHO, R. A.; SOUZA, M. A. Avaliação da saúde dos recifes de coral em unidades de conservação marinhas no Brasil. *Revista Brasileira de Oceanografia*, v. 64, n. 2, p. 157–170, 2016.

HAUSMANN, A. et al. Ecotourism marketing alternative to charismatic megafauna can also support biodiversity conservation. *Animal Conservation*, v. 20, p. 91–100, 2017.

HOEGH-GULDBERG, O.; PENDLETON, L.; KAUP, A. People and the changing nature of coral reefs. *Regional Studies in Marine Science*, v. 30, 100699, 2019.

HUANG, Y.; COELHO, V. R. Sustainability performance assessment focusing on coral reef protection by the tourism industry in the Coral Triangle region. *Tourism Management*, v. 59, p. 510–527, 2017.

HUGHES, T. P. et al. Coral reefs in the Anthropocene. *Nature*, v. 546, p. 82–90, 2017. HUGHES, T. P. et al. Global warming transforms coral reef assemblages. *Nature*, v. 556, n. 7702, p. 492–496, 2018.

Kulbicki, M.; Parravicini, V.; Bellwood, D. R.; Arias-González, E.; Chabanet, P.; Floeter, S. R.; Friedlander, A.; McPherson, J.; Myers, R. E.; Vigliola, L. (2013) *Global Biogeography of Reef Fishes: A Hierarchical Quantitative Delineation of Regions*.

LIN, B. et al. Coral reefs and coastal tourism in Hawaii. *Nature Sustainability*, 2023. LIU, S. et al. Valuing ecosystem services: Theory, practice, and the need for a transdisciplinary synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1185, n. 1, p. 54–78, 2010.

- LUCREZI, S.; SAAYMAN, M.; VAN DER MERWE, P. Drivers of satisfaction and dissatisfaction for recreational scuba divers. *Environmental Management*, v. 64, p. 665–677, 2019.
- LUZA, A. L. et al. Low functional vulnerability of fish assemblages to coral loss in Southwestern Atlantic marginal reefs. *Scientific Reports*, v. 12, p. 17164, 2022.
- MCWILLIAM, M. J. et al. Biogeographical disparity in the functional diversity and redundancy of corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 12, p. 3084–3089, 2018.
- MOBERG, F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*, v. 29, p. 215–233, 1999.
- NIELSEN-PINCUS, M. et al. The influence of place on the willingness to pay for ecosystem services. *Society & Natural Resources*, v. 30, n. 12, p. 1423–1441, 2017. PELLLOWE, K. E. et al. Global analysis of reef ecosystem services reveals synergies, trade-offs and bundles. *Ecosystem Services*, v. 63, 101545, 2023.
- REMONDOU, K.; KOUNDOURI, P.; KONTOGIANNI, A.; NUNES, P. A. L. D.; SKOURTOS, M. Valuation of natural marine ecosystems: an economic perspective. *Environmental Science & Policy*, v. 12, n. 7, p. 1040–1051, 2009. Disponível em: ROBERSTS, C. M. et al. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*, v. 295, n. 5558, p. 1280–1284, 2002.
- RODRIGUES, R. R. et al. The severe 2020 coral bleaching event in the tropical Atlantic linked to marine heatwaves. *Communications Earth & Environment*, v. 6, 208, 2025.
- ROOS, N. C. et al. Drivers of abundance and biomass of Brazilian parrotfishes. *Marine Ecology Progress Series*, v. 623, p. 117–130, 2019.
- ROVIRA, K.; TORRES-PULLA, M.; MARTÍNEZ, A.; GARCÍA, M. D. Ecological condition of coral reefs and human perceptions in a marine protected area of the Colombian Caribbean. *Ocean and Coastal Management*, v. 174, p. 143–154, 2019.
- SHIFFMAN, R. In Tahiti, reefs are sacred. Now they're under siege. *Reuters Investigates*, 2022.
- SILVA, A. R. et al. Who is watching the coast? Understanding the role of stakeholders in the governance of Brazilian Marine Protected Areas. *Ocean and Coastal Management*, v. 189, 105145, 2020.
- SPALDING, M. et al. Mapping the global value and distribution of coral reef tourism. *Marine Policy*, v. 82, p. 104–113, 2017.
- TRIBOT, A. S.; DETER, J.; MOUQUET, N. Integrating the aesthetic value of landscapes and biological diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 285, n. 1886, 20180971, 2018.

TRIBOT, A.-S.; DETER, J.; MOUQUET, N. Integrating the aesthetic value of landscapes and biological diversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 285, n. 1886, p. 20180971, 2018.

TRIBOT, A.-S.; MOUQUET, N.; VILLÉGER, S.; et al. Taxonomic and functional diversity increase the aesthetic value of coralligenous reefs. *Scientific Reports*, v. 6, p. 34229, 2016.

WAECHTER, L. S. et al. The aesthetic value of Brazilian reefs: From species to seascape. *Ocean & Coastal Management*, v. 247, 106882, 2024.

Anexos

Figura 1 – Mapa da Área de Proteção Ambiental Recifes de Corais no Rio Grande do Norte

Figura 2 – A) corais saudáveis com quatro espécies de peixes sendo três indivíduos de cada espécie e 12 indivíduos no total (CSPD). B) corais saudáveis com uma espécie de peixe com 12 indivíduos presentes na imagem (CSPI). C) corais branqueados com quatro

Figura 3 – Número de entrevistados por categoria de renda. As categorias seguem a classificação socioeconômica utilizada no estudo, (A) mais de R\$ 10.000, (B) R\$ 6.000 – 10.000, (C) R\$ 3.000 – 6.000, (D) R\$ 1.000 – 3.000. O gráfico ilustra a representati

Figura 4 – Valores monetários atribuídos pelos visitantes aos 6 cenários de conservação do recife. As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), com a linha interna indicando a mediana. Os "bigodes" se estendem até 1,5 vezes o intervalo interq

Tabela 1 – Comparações múltiplas entre os pares dos diferentes cenários de conservação dos recifes, com base nos valores monetários atribuídos pelos visitantes, C1: representa CSPD, C2: CSPI, C3: CBPD 3, C4: CSPA, C5: CBPI e C6: CBPA.

Figura 5 – Diferença potencial de arrecadação anual com base na disposição a pagar dos turistas por cenários distintos de conservação do recife.

Figura S1 – Avaliação da adequação do modelo a partir da análise dos resíduos simulados utilizando. O gráfico à esquerda apresenta o QQ-plot dos resíduos simulados, indicando a aderência à distribuição esperada. O gráfico à direita exibe a relação entre r

Figura S2 – Valores monetários atribuídos pelos entrevistados aos diferentes cenários de conservação do recife, separados por condição de visita. As caixas representam os quartis (Q1 e Q3), a linha interna indica a mediana, os whiskers correspondem a 1

Entrevista

Termo de consentimento

CÓDIGO: SB1117

AUTOR: RIVA DANIELLY DE ARAUJO ALVES

ORIENTADOR: GISLENE MARIA DA SILVA GANADE

TÍTULO: Carga polínica e utilização de recursos florais por abelhas nativas e exóticas num experimento de restauração da caatinga.

Resumo

A presente pesquisa analisou a carga polínica e a utilização de recursos florais por abelhas nativas e exóticas em um experimento de restauração da Caatinga, realizado na Floresta Nacional de Açu (RN). Foram coletados 42 indivíduos pertencentes a quatro gêneros (*Apis*, *Xylocopa*, *Megachile* e *Centris*) durante os períodos de estiagem e de chuva. Os resultados mostraram forte influência da sazonalidade sobre a abundância e diversidade de abelhas, com maior atividade na estação chuvosa. *Apis mellifera*, espécie exótica, foi a mais abundante em todas as coletas, apresentando comportamento generalista e competitivo, mas baixa diversidade de morfoespécies de pólen. Já as abelhas nativas, embora pouco coletadas, exploraram uma maior variedade, desempenhando papel relevante na manutenção das interações planta-polinizador. Conclui-se que a diversidade vegetal das áreas restauradas favorece diferentes grupos de abelhas, contribuindo para redes de polinização mais complexas e resilientes. Esses resultados reforçam a importância de considerar tanto abelhas nativas quanto exóticas no manejo da restauração ecológica da Caatinga.

Palavras-chave: Polinização. *Apis mellifera*. Sazonalidade. Restauração.

TITLE: Pollen Load and Floral Resource Use by Native and Exotic Bees in a Caatinga Restoration Experiment

Abstract

This study analyzed pollen load and floral resource utilization by native and exotic bees in a Caatinga restoration experiment conducted in the Açu National Forest (RN). Forty-two individuals belonging to four genera (*Apis*, *Xylocopa*, *Megachile*, and *Centris*) were collected during the dry and rainy seasons. The results showed a strong seasonal influence on bee abundance and diversity, with greater activity during the rainy season. *Apis mellifera*, an exotic species, was the most abundant in all collections, exhibiting generalist and competitive behavior but low diversity of pollen morphospecies. Native bees, although rarely collected, explored a greater variety, playing a relevant role in maintaining plant-pollinator interactions. The conclusion is that the plant diversity of the restored areas favors different groups

of bees, contributing to more complex and resilient pollination networks. These results reinforce the importance of considering both native and exotic bees in managing the ecological restoration of the Caatinga.

Keywords: Pollination. Apis Mellifera. Seasonality. Restoration.

Introdução

A Caatinga constitui a maior floresta sazonalmente seca das Américas e ocupa vasta área do território nacional. Apesar de sua importância, permanece pouco estudada e sofre intensa degradação (Antongiovanni et al., 2020). É também um dos biomas mais suscetíveis à perda de área devido às mudanças climáticas (Bezerra et al., 2020), o que ameaça sua biodiversidade e os serviços ecossistêmicos associados (Melo, 2017; Manhães et al., 2016). Nesse contexto, torna-se um bioma prioritário para projetos de restauração ecológica.

A resiliência ecossistêmica e a manutenção da diversidade dependem de interações entre espécies. Nas comunidades vegetais, a complementaridade funcional favorece o uso eficiente de recursos (Wagg et al., 2017), enquanto a facilitação melhora condições microclimáticas que permitem germinação, crescimento e sobrevivência de plantas (Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2018; Teixeira et al., 2020). Outro processo fundamental é a polinização, essencial para a reprodução da maioria das angiospermas — cerca de 90% dependem de animais, especialmente insetos (Ollerton, 2011). Entre estes, as abelhas se destacam, sendo responsáveis pela polinização de um terço das culturas humanas (Khalifa et al., 2021) e consideradas espécies-chave para o funcionamento dos ecossistemas (Garibaldi et al., 2013).

A perda de habitat e de recursos florais ameaça polinizadores e, consequentemente, a estabilidade das comunidades (Pan et al., 2024). Somam-se a esses fatores as mudanças climáticas, que intensificam a perda de espécies em redes ecológicas altamente conectadas (Burkle, 2013). Projetos de restauração podem se beneficiar da compreensão dessas interações, unindo processos de facilitação e complementaridade entre plantas à dinâmica planta-polinizador, favorecendo comunidades mais resilientes.

As redes planta-polinizador apresentam flexibilidade temporal, e sua estabilidade depende da capacidade dos polinizadores em explorar diversas fontes florais (Burkle & Alarcón, 2011). Assim, compreender a diversidade de interações é essencial para propor estratégias de manejo. Diferentes abordagens metodológicas podem auxiliar nesse entendimento, incluindo análises baseadas em traços presentes nos próprios polinizadores (Bosch, 2009; Whipple & Bowser, 2023).

Neste trabalho, propomos identificar os grãos de pólen aderidos ao tegumento de abelhas coletadas em campo e catalogar as espécies em floração (arbóreas e herbáceas) no experimento de restauração da Caatinga conduzido pelo Laboratório de Ecologia da Restauração da UFRN. A análise permitirá compreender a diversidade de recursos florais utilizados pelas abelhas mais abundantes dentro e ao redor do experimento, inferindo como esses recursos são distribuídos entre espécies. Ainda que possa haver plantas chave como principais fornecedoras de

pólen, buscamos avaliar de que forma a variedade e a proporção de uso de diferentes recursos influenciam a dinâmica das interações planta-polinizador.

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 (Figura 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 16 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, no total, 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 dos insetos foi realizada em dois momentos do ano, na estação de estiagem e na estação chuvosa, no perímetro e arredores do experimento, nos horários das 06:00 às 10:30 da manhã e 14:30 às 17:00 horas da tarde. As coletas ocorreram através de metodologias ativas de captura (utilizando puçá entomológico), para os indivíduos das diferentes espécies de abelhas que ocorrem nas parcelas e arredores do experimento. Foi priorizada a captura de *Apis mellifera* por sua relevância como espécie invasora e econômica no bioma da caatinga. Adicionalmente, foram coletados também indivíduos das abelhas nativas solitárias *Xylocopa* sp. (mamangava), *Megachile* sp. (abelha-cortadeira) e *Centris* sp. (abelha do óleo).

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. As amostras de pólen foram agrupadas de acordo com as morfoespécies, foi criado um documento para a identificação visual das morfoespécies durante as análises das lâminas. (Anexo 1). Adicionalmente, a identificação taxonômica do pólen ocorreu por pesquisas de artigos com referência do nome das espécies

vegetativas presente no experimento e seguida do termo palynology nos sites como da Scielo, Google acadêmico e ResearchGate.

Durante a extração do pólen dos espécimes de abelhas coletados os indivíduos de *Apis* foram subclassificados dentro de cada estação como Forrageadoras de néctar (FN) e Forrageadoras de pólen (FP). (Figura 2) Pois, foram analisadas em laboratório que as abelhas da mesma coleta mostraram diferença na sua carga de pólen, as classificadas como Fp tinham a estrutura da corbícula cheia Enquanto, as classificadas como Fn estavam com a corbícula vazia e só possuíam alguns poucos grãos de pólen em seu corpo, provavelmente adquiridos de forma não intencional. A corbícula é uma estrutura na tíbia do último par de patas das abelhas de quatro tribos da família Apidae: abelhas melíferas, mamangavas, abelhas sem ferrão e abelhas-das-orquídeas. Devido a isto, elas também são chamadas de abelhas corbiculadas. A carga de pólen presente na corbícula das abelhas dessa família dá indícios da intencionalidade de forrageio do indivíduo coletado, já que indivíduos que forrageiam por pólen estão, em geral, em busca de nutrição protéica proveniente dessa substância para fornecê-la á uma prole em desenvolvimento ou colônia em expansão. Enquanto o indivíduo que tem a corbícula vazia está forrageando para alimentar-se, ou para armazenar alimento de sustento da colônia.

Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas descritivas no programa R levando em consideração média e proporção, bem como a confecção de representações gráficas para compreender a composição, variação e quantidade de grãos de pólen coletados pelas abelhas.

Resultados e Discussões

Foram avaliadas 42 indivíduos de abelhas, pertencentes a 4 gêneros diferentes: *Apis* (mellifera), *Megachile*, *Xylocopa* e *Centris*. Dentre eles, 39 foram coletados na estação chuvosa e apenas 3 na estação de estiagem. Provenientes de 3 expedições a campo que ocorreram nas datas de 21 à 28 de janeiro, 14 à 21 de abril e 1 à 4 de agosto sendo caracterizados o mês de janeiro e abril como o período de estação chuvosa e agosto como período de estiagem. *Apis mellifera* representou a espécie mais abundante (n = 22), seguida por *Xylocopa* (n = 9), *Megachile* (n = 8) e *Centris* (n = 3).

A carga média de pólen variou entre as espécies e estações, *Apis mellifera* apresentou maiores valores, especialmente na estiagem (FP: 2267 grãos; FN: 0), em contraste com a estação chuvosa (FP: 895; FN: 41,1). Entre as abelhas nativas, destacaram-se *Xylocopa*, com média de 426,9 grãos distribuídos em 11 morfoespécies distintas, e *Megachile*, com média de 764 grãos. *Centris* apresentou a menor média (68,3 grãos).

A composição de pólen das espécies de abelhas durante os meses de coletas foram: *Apis mellifera* em janeiro, foi registrada quatro morfoespécies: morfoespécie 20 (2.200 grãos), morfoespécie 15 (305 grãos), morfoespécie 16 (82 grãos) e morfoespécie 7 (7 grãos). No mês de abril, a composição reduziu para três

morfoespécies: morfoespécie 1 (4.054 grãos), morfoespécie 8 (50 grãos) e morfoespécie 7 (10 grãos). Já em agosto, também foram observadas três morfoespécies, com predominância da morfoespécie 20 (6.110 grãos), seguida pelas morfoespécies 15 (400 grãos) e 7 (290 grãos). (Anexo 2)

Centris foi registrada apenas nas coletas de abril com 7 morfoespécie: morfoespécie 1 (2 grãos), morfoespécie 7 (25 grãos), morfoespécie 15 (30 grãos), morfoespécie 24 (50 grãos), morfoespécie 25 (10 grãos), morfoespécie 26 (3 grãos) e morfoespécie 27 (85 grãos). (Anexo 3)

Megachile foi registrada apenas nas coletas realizadas em janeiro, apresentando a maior riqueza de grãos entre todas as abelhas amostradas, com 15 morfoespécies identificadas. Dentre elas, destacaram-se a morfoespécie 7 (2.580 grãos), morfoespécie 1 (1.388 grãos) e morfoespécie 15 (1.035 grãos), que juntas representaram a maior parte do material coletado. As demais morfoespécies apresentaram abundâncias variando entre 3 e 400 grãos. (Anexo 3)

Xylocopa foi registrada apenas nas coletas de janeiro, apresentando um total de onze morfoespécies. As quantidades observadas foram: morfoespécie 1 (10 grãos), morfoespécie 5 (20 grãos), morfoespécie 6 (20 grãos), morfoespécie 7 (758 grãos), morfoespécie 21 (485 grãos), morfoespécie 22 (203 grãos), morfoespécie 23 (15 grãos), morfoespécie 24 (1.950 grãos), morfoespécie 25 (120 grãos), morfoespécie 26 (250 grãos) e morfoespécie 27 (25 grãos). (Anexo 3)

As análises mostram que a composição e abundância das abelhas variaram de acordo com a sazonalidade, refletindo diretamente na diversidade das morfoespécies de pólen encontradas. Enquanto *Apis mellifera* manteve-se como a espécie mais representativa em ambas as estações, as abelhas nativas apresentaram padrões de ocorrência mais restritos e especializados, explorando uma maior diversidade de recursos florais em períodos específicos. Esse resultado ressalta a importância das abelhas nativas solitárias como polinizadores-chave, uma vez que interagiram com um número maior de morfoespécies do que a *Apis* ampliando dessa forma a rede de interações e contribuindo de forma mais significativa para a manutenção e restauração da biodiversidade local. Isso evidencia a influência da sazonalidade e da composição vegetal sobre a dinâmica das interações planta-polinizador em áreas de Caatinga em processo de restauração. (Figura 3)

Observa-se que a sazonalidade exerce forte influência sobre a abundância e diversidade de abelhas e na composição da carga de pólen. A maior representatividade de indivíduos durante a estação chuvosa pode confirmar que a disponibilidade de flores nesse período é um fator relevante para a manutenção das populações de polinizadores em florestas secas tropicais, como a Caatinga (Burkle & Alarcón, 2011). Por outro lado, a baixa coleta de indivíduos na estiagem ressalta a limitação de recursos florais em ambientes sazonais, situação que já foi apontada como obstáculo à resiliência das redes planta-polinizador (Pan et al., 2024).

A predominância da *Apis mellifera* em todas as coletas, e na estiagem, reforça seu papel como espécie generalista e competitiva, capaz de explorar recursos mesmo em condições adversas. Esse padrão é consistente com estudos que evidenciam a ampla plasticidade dessa espécie, tanto em ambientes naturais como

agrícolas (Garibaldi et al., 2013; Khalifa et al., 2021). Além disso, pesquisas demonstram que o comportamento das abelhas africanizadas também sofre influência da sazonalidade, com diferenças na defensividade e nas atividades de forrageamento entre os períodos seco e chuvoso, o que indica que a disponibilidade de recursos está diretamente associada ao padrão sazonal de atividade dessa espécie (Silveira et al., 2015). No entanto, apesar de sua elevada abundância, observou-se baixa riqueza de morfoespécies de pólen encontrados nas suas amostras. Esse padrão sugere um comportamento oportunista, baseado no uso de espécies vegetais abundantes, mas com poucas interações com plantas nativas. Essa estratégia pode favorecer sua dominância, mas representa riscos à manutenção das abelhas nativas, uma vez que sua presença em alta densidade está associada à redução da diversidade funcional em comunidades polinizadoras (Burkle et al., 2013).

As abelhas nativas, embora em menor número, mostram padrões relevantes para a compreensão de dinâmicas planta-polinizador na caatinga. *Xylocopa* e *Megachile* apresentaram maior diversidade de morfoespécies de pólen em um único período de coleta, demonstrando que, quando disponíveis, exploram uma ampla gama de recursos florais. Esse comportamento oportunista pode ser um mecanismo relevante para a persistência dessas espécies em ambientes restaurados, onde a disponibilidade de recursos pode variar de acordo com a composição arbórea implantada (Whipple & Bowser, 2023). Já a *Centris* apresentou menor carga polínica e ocorrência restrita, o que pode refletir tanto a baixa abundância natural quanto a necessidade de recursos florais específicos, alinhando-se à ideia de que a especialização aumenta a vulnerabilidade de espécies polinizadoras em ambientes sujeitos a mudanças (Burkle, 2013). Nesse âmbito, é importante destacar que abelhas solitárias desempenham papel fundamental na polinização e na conservação da biodiversidade, sendo essenciais tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas (Valério et al., 2023).

No contexto da restauração, os resultados sugerem que a diversidade de espécies vegetais nas parcelas experimentais possuem potencial para favorecer diferentes grupos de abelhas, criando uma rede de interações mais complexa e resiliente, particularmente relevante para a manutenção de populações de abelhas nativas. Essa diversidade, aliada a mecanismos de complementaridade e facilitação entre plantas, pode contribuir para maior estabilidade das comunidades restauradas e alta produtividade primária, fornecendo a abundância e variedade de recursos necessárias para sustentar múltiplas populações de abelhas (Wagg et al., 2017; Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2018; Teixeira et al., 2020). Assim, compreender como abelhas nativas e exóticas exploram os recursos florais ao longo da sazonalidade é bastante relevante para planejar estratégias de manejo que equilibrem a presença de *Apis mellifera* e promovam a conservação de polinizadores nativos na Caatinga.

Conclusão

O presente estudo mostrou que a sazonalidade pode influenciar diretamente a abundância e diversidade de abelhas, assim como a composição das cargas

polínicas, com maior atividade registrada no período chuvoso devido à maior disponibilidade de recursos florais. A predominância de *Apis mellifera* tende a confirmar seu papel como espécie competitiva, mas também ressalta a importância de atenção ao impacto que ela pode ter sobre as abelhas nativas. Apesar de menos abundantes, as abelhas nativas mostraram estratégias importantes de coleta de recursos, destacando-se o potencial das abelhas solitárias para a manutenção da diversidade de interações planta-polinizador. Os resultados reforçam a importância da diversidade vegetal em áreas restauradas como um elemento importante para a resiliência ecológica e para a conservação das comunidades de polinizadores na Caatinga.

Referências

- CORDERO-SCHMIDT, Eugenia; MARUYAMA, Pietro Kiyoshi; VARGAS-MENA, Juan Carlos; OLIVEIRA, Paulino Pereira; SANTOS, Francisco de Assis R.; MEDELLÍN, Rodrigo A.; RODRIGUEZ-HERRERA, Bernal; VENTICINQUE, Eduardo M.. Bat-flower interaction networks in Caatinga reveal generalized associations and temporal stability. *Biotropica*, [S.L.], v. 53, n. 6, p. 1546-1557, 24 jul. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/btp.13007>.
- 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.
- 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.
- 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
- PATERNIO 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
- 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
- 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
- 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>.
- 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>.

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>

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>.

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>.

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>.

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>.

VALÉRIO, Brenda; RIGO, Maria Regina; DE CARLI, Mayara; JUNGBECK, Lucas; ROGALSKI, Juliana Marcia. Conhecendo a vida das abelhas e sua importância ecológica. 11º Seminário de Extensão Res. Bento Gonçalves, RS, v. 11, nov. 2023. ISSN 2594-7893.

SILVEIRA, Daniel Casimiro da; MARACAJÁ, Patrício Borges; SILVA, Rosilene Agra da; SOUSA, Raimundo Maciel; SOTO-BLANCO, Benito. Variações diurna e sazonal da defensividade das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 16, n. 4, p. 925-934, out./dez. 2015. DOI:10.1590/S1519-99402015000400016. ISSN 1519-9940.

ANDRADE, E.M., Aquino, D., Chaves, L.C.G., Lopes, F.B. (2017). Water as Capital and Its Uses in the Caatinga. In: Silva, J.M.C., Leal, I.R., Tabarelli, M. (eds) *Caatinga*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_10.

Anexos

Figura 1 - Mapa do Experimento de Restauração.

Anexo 1 - Identificação visual das morfoespécies de pólen.

Figura 2 - Exemplo de corbícula de uma forrageadora de néctar, sem pólen, à esquerda.
Exemplo de corbícula de uma forrageadora de pólen, com pólen, à direita.

Anexo 2 - Composição do pólen presente no tegumento de *Apis* nos diferentes momentos de coleta.

Anexo 3 - Composição da carga de pólen presente no tegumento de abelhas solitárias amostradas nos meses de janeiro e abril.

Figura 3 - Composição da carga de pólen presente no tegumento de abelhas solitárias amostradas nos meses de janeiro e abril.

CÓDIGO: SB1118

AUTOR: LEVY DE OLIVEIRA LEMOS

ORIENTADOR: VANIA SOUSA ANDRADE

TÍTULO: Análise comparativa do perfil de sensibilidade de isolados de fungos dermatófitos frente a antifúngicos tradicionais e ao óleo essencial de *Lippia grata*.

Resumo

O tratamento das dermatomicoses representam um desafio significativo devido ao aumento da resistência aos antifúngicos convencionais. A pesquisa possui caráter exploratório, experimental, com abordagem quantitativa e de natureza básica. O estudo teve como objetivo geral, determinar a concentração fungicida mínima (CIM) e a concentração fungistática mínima (CFM) de antifúngico de uso tradicional frente à isolados clínicos de fungos dermatófitos e leveduras e, posteriormente, comparar com a atividade antifúngica do óleo essencial (OE) de *Lippia grata* (Verbenaceae). A atividade antifúngica (CIM e CFM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes do Comitê Brasileiro de testes de susceptibilidade à antimicrobianos (BrCAST), contra cinco cepas de dermatófitos e cinco cepas de *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que o OE de *L. grata* apresentou atividade antifúngica. Constatou-se atividade antifúngica do OE para 100% das cepas testadas com CIM e CFM variando entre 390.62 µg/mL a 3.125 µg/mL para cepas de *C. albicans*. Para dermatófitos, a CIM variou entre 48.82 µg/mL a 390.62 µg/mL, enquanto a CFM variou de 48.82 µg/mL a 781.25 µg/mL. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o OE de *L. grata* demonstrou significativa atividade antifúngica *in vitro* contra todos os isolados clínicos testados. Assim, deve-se considerar o potencial promissor do OE, como motivação para novos estudos, vislumbrando o desenvolvimento futuro de um fitoterápico.

Palavras-chave: Lippia grata. Óleo Essencial. Fungos. Antimicrobianos. Produto natural

TITLE: Evaluation of the antifungal activity of essential oil from *Lippia grata* Schauer (Verbenaceae) against dermatophyte fungi and yeasts

Abstract

The treatment of dermatomycoses represents a significant challenge due to increased resistance to conventional antifungal agents. The research is exploratory, experimental, quantitative, and basic in nature. The overall objective of the study was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of traditional antifungal use against clinical isolates of dermatophyte fungi and yeasts and subsequently compare it with the antifungal activity of *Lippia grata* (Verbenaceae) essential oil (EO). Antifungal activity (MIC and MFIC) was determined by the broth microdilution method, following the guidelines of the Brazilian Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), against five strains of dermatophytes and five strains of *Candida albicans*. The results showed that the EO of *L. grata* exhibited antifungal activity. Antifungal activity of the EO was observed for 100% of the strains tested with MIC and CFM ranging

from 390.62 $\mu\text{g/mL}$ to 3,125 $\mu\text{g/mL}$ for strains of *C. albicans*. For dermatophytes, MIC ranged from 48.82 $\mu\text{g/mL}$ to 390.62 $\mu\text{g/mL}$, while CFM ranged from 48.82 $\mu\text{g/mL}$ to 781.25 $\mu\text{g/mL}$. Based on the results obtained, it is concluded that *L. grata* EO demonstrated significant antifungal activity *in vitro* against all clinical isolates tested. Thus, the promising potential of EO should be considered as motivation for further studies, with a view to the future development of an antifungal herbal medicine.

Keywords: Lippia grata. Essential oil. Fungi. Antimicrobials. Natural product.

Introdução

Os fungos patogênicos configuram uma preocupação significativa para a saúde pública global, causando infecções que acometem milhões de pessoas em diversas regiões do mundo. Apesar dos avanços da medicina moderna, que têm sido fundamentais no controle de inúmeras doenças infecciosas, alguns grupos fúngicos ainda apresentam grande relevância clínica. Entre eles, destacam-se os fungos filamentosos queratinofílicos, conhecidos como dermatófitos, responsáveis pelas dermatofitoses, também chamadas de tineas, tradicionalmente agrupados nos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Martinez-Rossi, 2021). Além dos dermatófitos, a levedura *Candida* spp., habitualmente comensal da microbiota humana, pode causar infecções oportunistas. Atualmente, mais de 150 espécies de *Candida* foram descritas, das quais cerca de 20 estão associadas a doenças humanas. A espécie *Candida albicans* é responsável por aproximadamente 70% das infecções fúngicas no mundo (Morad, 2018).

O manejo clínico das dermatomicoses baseia-se, principalmente, em três classes de antifúngicos: alilaminas, azóis e griseofulvina (Pereira, 2021). Apesar da eficácia desses medicamentos, o aumento da resistência fúngica de forma geral tem se tornado um desafio crescente, contribuindo para falhas terapêuticas (Mei et al., 2022). Esse fenômeno resulta de múltiplos fatores, incluindo a pressão seletiva do sistema imunológico e o uso prolongado de fármacos, que favorecem a seleção de cepas resistentes (Jartarkar et al., 2021). No caso das infecções por *Candida*, os tratamentos mais utilizados são os azóis, polienos e equinocandinas; contudo, sua eficácia é reduzida diante da formação de biofilmes por *C. albicans*. Além disso, limitações como efeitos adversos em altas doses, indisponibilidade de formulações sistêmicas e o desenvolvimento de resistência tornam essas terapias insuficientes (Macia-Paz, 2023).

Diante desse cenário, há um crescente interesse em alternativas naturais com potencial terapêutico, utilização a bioprospecção. Os óleos essenciais (OEs), metabólitos secundários produzidos por diferentes órgãos vegetais, têm se destacado por sua capacidade de proteger as plantas contra microrganismos patogênicos (Rasheed et al., 2023). Estudos indicam que os OEs apresentam atividade antifúngica significativa e vêm sendo explorados como fontes de novas moléculas antibacterianas, conservantes naturais e alternativas para o tratamento de infecções (Houl et al., 2022). Diversos trabalhos também relatam os mecanismos de ação dos OEs contra fungos patogênicos, incluindo alterações na membrana celular e inibição de processos metabólicos essenciais (Lopes et al., 2020).

No contexto brasileiro, o gênero *Lippia* (Verbenaceae), com aproximadamente 120 espécies distribuídas nos biomas Caatinga e Cerrado, é amplamente utilizado na medicina popular devido às suas propriedades medicinais reconhecidas. A família Verbenaceae é uma das mais estudadas quanto à atividade antifúngica de seus óleos essenciais (Pereira, 2021). Além do uso terapêutico, os OEs apresentam aplicações diversificadas, incluindo produtos

farmacêuticos, cosméticos, detergentes, sabonetes, fragrâncias e fungicidas (Houl et al., 2022).

Diante do aumento da resistência aos antifúngicos convencionais e da relevância clínica das dermatomicoses, a busca por novas estratégias terapêuticas torna-se imperativa. Nesse contexto, os OEs surgem como alternativas promissoras, demandando estudos que avaliem sua eficácia, toxicidade, segurança e viabilidade econômica, consolidando seu emprego no controle de infecções fúngicas (Mutlu-Ingok et al., 2020).

Metodologia

Em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), foi possível a obtenção e avaliação química do óleo essencial da planta *L. grata* utilizado no presente estudo. Foram utilizadas dez cepas, das quais cinco foram de *Candida albicans* e as demais de dermatófitos. Do total de microrganismos, oito foram provenientes de isolados clínicos e dois foram amostras de referência (*Trichophyton interdigitale* ATCC9533 e *Candida albicans* ATCC90028), As cepas foram fornecidas pelas Coleções de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF/IOC - Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ), Fungos Patogênicos (CFP/IOC - Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ), Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS/INCQS/IOC - Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ), acervo da Micoteca URM604 (Departamento de Micologia/UFPE) e acervo do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEAN).

Os microrganismos foram ativados (processo em que as amostras são retiradas de seu estado de preservação), isolados e identificados pelas curadoras das referidas coleções citadas acima e mantidos no Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEAN) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências (DMP/UFRN), local de realização da pesquisa. A cepa ATCC9533 e ATCC90028 foram utilizadas como controle para isolamento das espécies de dermatófitos e *Candida* respectivamente, A preparação e padronização dos inóculos de *C. albicans* e dermatófitos ocorreu conforme o estabelecido pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (BrCAST, 2020) conforme esquematizado nas Figura 1 e Figura 2.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OE frente às espécies de fungos, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo sobre placas de 96 poços de fundo chato, de acordo com o estabelecido pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (BrCAST, 2020).

Previamente, foram preparadas soluções estoque dos antifúngicos, obtendo a concentração desejadas, em seguida, após a adição de 100 µL de meio RPMI 1640 (com L-glutamina e indicador de pH sem bicarbonato) suplementado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) em concentração final de 0,165 mol/L, pH 7.0, as diluições seriadas do OE da *L. grata* e um inóculo padronizado pode ser obtido do raspado das colônias crescidas após o cultivo do dermatófito em Ágar Batata dextrose (INLAB®, Brasil) por pelo menos 7 dias a 28 ± 2 °C, para obter uma concentração final recomendada de $2-5 \times 10^5$ conídios mL. Enquanto as colônias das culturas de *C. albicans*, crescidas em Ágar Sabouraud

Dextrose (INLAB®, Brasil) incubadas a 37 ± 2 °C durante 48 h. foram ressuspensas e tiveram ajustadas a densidade celular da suspensão de leveduras de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Por fim, as suspensões de conídios, foram agitadas em vortex e diluídas de 1:10 para inoculação de 100 µL da suspensão final alcançando a concentração recomendada em todos os poços, com exceção dos poços controles de esterilidade do meio RPMI e água destilada. Para cada placa, foram incluídos os controles de esterilidade (meio RPMI e água destilada), controle de crescimento (meio + inóculo) e controle do diluente (meio + DMSO a 5%). Além disso, para o controle do Tween 20 a 0,1%, utilizado durante as lavagens para obtenção de conídios, uma placa de Petri contendo meio ágar batata dextrose, foi semeada, com o intuito de comprovar que a substância não interfere no desenvolvimento micelial das cepas de dermatófitos. Seguidamente, as placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por dois dias e a 28 ± 2 °C entre quatro a sete dias para os demais fungos. Após o período, a concentração inibitória mínima foi determinada visualmente através de leitura das placas, registrando o grau de crescimento fúngico com base na turvação dos poços. Por fim, a CIM foi então determinada como a menor concentração dos antifúngicos, responsável por inibir o crescimento visível dos microrganismos.

Determinação da concentração fungistática mínima (CFM)

A avaliação do caráter fungicida e fungistático do OE contra espécies de fungos foi realizada conforme a metodologia descrita por Sakita et al. (2019). Aliquotas de 10 µL dos poços sem crescimento visível foram semeadas em “spot” sobre meio Ágar Sabouraud dextrose (INLAB®, Brasil), em quadrantes previamente delimitados. As placas foram incubadas nas temperaturas recomendadas para cada microrganismo. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração do OE capaz de impedir o crescimento. A classificação entre efeito fungicida e fungistático seguiu os critérios de Neto et al. (2022), considerando-se fungicida quando a relação CIM/CFM ≤ 4 e fungistático quando CIM/CFM > 4 . Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

Resultados e Discussões

Constatou-se atividade antifúngica do óleo essencial de *L. grata* para 100% das cepas testadas com CIM e CFM variando entre 390.62 µg/mL a 3.125 µg/mL para cepas de *C. albicans*. Para dermatófitos, a CIM variou entre 48.82 µg/mL a 390.62 µg/mL, enquanto a CFM variou de 48.82 µg/mL a 781.25 µg/mL. Em síntese, a atividade antimicrobiana dos OEs está centrada na membrana plasmática como principal alvo, levando à desestabilização estrutural e funcional, perda de homeostase iônica e energética, culminando em morte celular. Adicionalmente, os OEs podem agir em enzimas, proteínas e processos de biossíntese, o que amplia seu espectro de ação (Mutlu-Ingok et al., 2020) Além disso, frente a espécies de dermatófitos, o gênero *Lippia* é o segundo mais estudado (Pereira., 2021)

Quanto à concentração fungicida mínima (CFM), o OE de *L. grata* apresentou valores entre 390,62 µg/mL e 48,82 µg/mL, demonstrando efeito fungicida em 100% das cepas de *C. albicans*. Foram observadas CFMs específicas de 1.562 µg/mL em duas cepas (33,3%) e de 1.566 µg/mL, 3.125 µg/mL e 390,62 µg/mL em uma cepa cada. Em comparação, a anfotericina B exibiu CIMs entre 0,25 e 1,0 µg/mL, com inibição registrada em duas cepas a 1 µg/mL, uma a 0,5 µg/mL e duas a 0,25 µg/mL (Figura 3).

Para os dermatófitos, o OE também inibiu 100% das cepas, com concentrações variando entre 48,82 µg/mL e 390,62 µg/mL. Especificamente, foram verificadas CIMs de 48,82 µg/mL em duas cepas e de 390,62 µg/mL em três cepas. Já o itraconazol apresentou CIMs entre 0,06 e 1 µg/mL, sendo observadas concentrações de 0,12 µg/mL em três cepas, 0,25 µg/mL em duas, além de 0,06; 0,5 e 1 µg/mL em uma cepa cada (12,5%) (Figura 4).

O OE de *L. grata* utilizado neste estudo apresentou como constituintes principais carvacrol e timol, que em conjunto representaram mais de 70% da composição total, seguidos por p-cimeno e γ-terpineno. Esta composição está alinhada com estudos anteriores que reportam a existência de um quimiotipo timol/carvacrol nesta espécie Felix et al., 2025. Os compostos majoritariamente detectados no OE de *L. grata* apresentam atividade antimicrobiana relatada na literatura Costa., 2017, Sales, Souza (2023).

O potencial antifúngico do OE da *L. grata* foi relatado em alguns estudos anteriores em diferentes espécies fúngicas, tais como o experimento de Oliveira et al (2008) em que a *L. grata* inibiu o crescimento de outros fungos filamentosos na concentração de 126 µL mL⁻¹. enquanto trabalhos de Sales, Souza (2023) demonstram atividade frente fungicida o OE de *L. grata* frente a leveduras. Um estudo com *Lippia microphylla* demonstrou que seu OE, rico em timol, provocou alterações morfológicas significativas em *C. albicans*, incluindo retração celular e desintegração da membrana, observadas por meio de microscopia eletrônica.

Em comparação com antifúngicos convencionais, o OE de *L. grata* mostrou-se menos potente em termos de concentrações absolutas (a anfotericina B exibiu CIMs de 0,25-1,0 µg/mL contra *Candida*, e o itraconazol apresentou CIMs de 0,06-1 µg/mL contra dermatófitos). No entanto, é crucial ressaltar que os OEs são misturas complexas cuja eficácia deve ser avaliada não apenas pela potência, mas também por seu perfil de segurança, baixo potencial de resistência e múltiplos alvos de ação. Estudos recentes têm demonstrado que outros óleos do gênero *Lippia*, como *L. sidoides* e *L. alba*, apresentam atividade antifúngica comparável, corroborando o potencial deste gênero botânico (Barreto, 2025).

Conclusão

Este estudo demonstrou que o óleo essencial de *L. grata* apresentou atividade antifúngica *in vitro* significativa contra cepas de *C. albicans* e dermatófitos, com valores de CIM e CFM capazes de inibir o crescimento de 100% das cepas avaliadas. A eficácia observada, aliada ao efeito fungicida em diferentes isolados, evidencia seu potencial como agente alternativo no controle de infecções fúngicas, especialmente diante do aumento da resistência aos fármacos disponíveis.

O gênero *Lippia* é amplamente reconhecido por seu uso na medicina tradicional e pela diversidade de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, o que reforça a relevância etnofarmacológica da exploração de *L. grata*. Contudo, faz-se necessário avaliar a atividade antifúngica, isoladamente, de cada um dos fitoconstituintes majoritários, além de estudos adicionais para averiguar a toxicidade e estabilidade farmacêutica. Essas etapas serão essenciais para validar o óleo essencial de *L. grata* como um produto de ação antifúngica seguro.

Referências

BRCAS. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 10.0. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2020.

BARRETO, Jaqueline Oliveira et al. Antifungal and antibiofilm activity of Lippia microphylla Cham. essential oil. (Verbenaceae) on Candida albicans and human cell cytotoxicity. **Archives of oral biology**, v. 174, n. 106243, p. 106243, 2025.

COSTA, Patrícia Silva et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero Lippia sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158–171, 2017.

DINIZ-NETO, H. et al. Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant Candida spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022.

HOU, Tianyu et al. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. **Food bioscience**, v. 47, n. 101716, p. 101716, 2022.

JARTARKAR, Shishira R. et al. Pathogenesis, immunology and management of dermatophytosis. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 1, p. 39, 2021.

LOPES, Ana I.; TAVARIA, Freni K.; PINTADO, Manuela E. Conventional and natural compounds for the treatment of dermatophytosis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 58, n. 6, p. 707–720, 2020.

MACIAS-PAZ, Ignacio Uriel et al. Candida albicans the main opportunistic pathogenic fungus in humans. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 55, n. 2, p. 189–198, 2023.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce M. et al. State-of-the-art dermatophyte infections: Epidemiology aspects, pathophysiology, and resistance mechanisms. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 8, p. 629, 2021.

MEI, Angela et al. Plant-based therapies for dermatophyte infections. **Tasman Medical Journal**, v. 4, n. 3, p. 21–37, 2022.

MORAD, Hassan O. J. et al. Pre-clinical imaging of invasive candidiasis using ImmunoPET/MR. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1996, 2018.

MUTLU-INGOK, Aysegul et al. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, p. 4711, 2020.

PEREIRA, Fillipe de Oliveira. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 59, n. 4, p. 313–326, 2021.

RASHEED, Shahryar; ZAHID, Shafaq; JAMIL, Irum; et al. A Comprehensive Review on Biomedical Application of plant-derived Essential oils. **Materials Chemistry and Mechanics**, v. 1, n. 1, p. 1–23, 2023.

SALES, Fábio do Nascimento. Atividade antifúngica do óleo essencial de Lippia grata Schauer frente Candida albicans e dermatófitos. 2023. 132 f. Dissertação (Mestrado em

Biologia Parasitária) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

SOUZA, Ana Beatriz de. Potencial antifúngico do óleo essencial proveniente da *Lippia grata* Schauer frente a isolados clínicos do complexo *Cryptococcus neoformans*. 2023. 55 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

Anexos

Figura 1 – Esquema ilustrativo da padronização de inóculo para leveduras.

Figura 2 – Esquema ilustrativo da padronização de inóculo para dermatófitos

Figura 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial frente cepas de dermatófitos

Figura 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial frente cepas de *Candida albicans*

CÓDIGO: SB1123

AUTOR: NINA BEVILAQUA CAMMAROTA

COAUTOR: GENEDY KARIELLY DA SILVA APOLINARIO

COAUTOR: ANA LUIZI BARACHO DA SILVA

COAUTOR: RAQUEL LÚCIA SOUTO DE ARAÚJO

COAUTOR: RODRIGO OLIMPIO ORVATE ARRUDA

ORIENTADOR: JANINE INEZ ROSSATO

TÍTULO: Qual a natureza da amnésia induzida pelo bloqueio da reconsolidação da memória espacial?

Resumo

A navegação eficaz é essencial para a sobrevivência animal, permitindo que encontrem recursos e parceiros e evitem predadores. O sucesso dessa navegação depende da memorização de marcos e rotas por meio da memória espacial, uma capacidade cognitiva mediada principalmente pelo hipocampo. Para estudar a memória espacial, o método mais utilizado é o Labirinto Aquático de Morris (LAM). Neste teste, o animal deve usar pistas externas para localizar uma plataforma de escape submersa. A aprendizagem é demonstrada pela redução do tempo para encontrar a plataforma e pela preferência pelo quadrante em que ela está. No entanto, a memória espacial pode se tornar instável quando reativada na ausência da plataforma, exigindo o processo de reconsolidação para ser reestabilizada. A PKM ζ , uma enzima encontrada no hipocampo, é crucial para essa reestabilização. A inibição da PKM ζ logo após a reativação da memória no LAM causa amnésia, impedindo que os animais lembrem do local da plataforma no dia seguinte. Porém, não se sabe se essa amnésia é reversível ou se a memória é completamente apagada. Para investigar isso, injetamos um inibidor específico da PKM ζ , o ZIP, no hipocampo de ratos. Se a inibição da PKM ζ apagar a memória, a reaquisição da habilidade de navegação exigirá um novo processo de aprendizado completo. Por outro lado, se a amnésia for reversível e incompleta, o reaprendizado da tarefa acontecerá de forma mais rápida.

Palavras-chave: Memória espacial. Reconsolidação. Labirinto aquático de Morris.

TITLE: What is the nature of amnesia induced by blockage of spatial memory reconsolidation?

Abstract

Effective navigation is essential for animal survival, allowing them to find resources and mates and avoid predators. The success of this navigation depends on memorizing landmarks

and routes, which involves spatial memory, a cognitive ability primarily mediated by the hippocampus. To study spatial memory, the most commonly used method is the Morris Water Maze (MWM). In this test, an animal must use external cues to locate a submerged escape platform. Learning is demonstrated by a reduction in the latency to find the platform and a preference for the quadrant where it is located. However, spatial memory can become unstable when reactivated without the platform, requiring the process of reconsolidation to be re-stabilized. PKM ζ , an enzyme found in the hippocampus, is crucial for this re-stabilization. Inhibiting PKM ζ immediately after reactivating the memory in the MWM causes amnesia, preventing the animals from remembering the platform's location the next day. Yet, it is unknown whether this amnesia is reversible or if the memory is completely erased. To investigate this, we injected a specific PKM ζ inhibitor, ZIP, into the hippocampus of rats. If the inhibition of PKM ζ erases the memory, reacquiring the navigation skill will require a complete new learning process. On the other hand, if the amnesia is reversible and incomplete, relearning the task will be faster.

Keywords: Spatial memory. Reconsolidation. Morris water maze.

Introdução

A navegação eficaz no ambiente é vital para a sobrevivência da maioria dos animais, permitindo-lhes encontrar recursos essenciais, como alimento e abrigo, localizar parceiros e escapar de predadores. O sucesso dessa navegação depende amplamente da utilização de marcos externos e do entendimento das relações espaciais para gravar na memória locais importantes e as rotas que os conectam.

O hipocampo desempenha um papel crucial na formação das memórias espaciais contendo informações aloclínicas, ou seja, aquelas com respeito à disposição dos itens no espaço (Rinaldi et al., 2020). Um dos métodos mais comuns para estudar a memória espacial em roedores é o Labirinto Aquático de Morris (LAM; Morris, 1981; Vorhees e Williams, 2006; Othman et al., 2022).

No LAM o animal nada em uma piscina circular e deve guiar-se usando pistas externas para encontrar uma plataforma de escape submersa e escondida. A aprendizagem espacial é demonstrada por uma diminuição progressiva na latência de escape, pelo desenvolvimento de uma preferência duradoura pelo quadrante da plataforma (Morris et al., 1984), e pelo desenvolvimento de uma estratégia de busca (Moser et al., 1993).

Quando o animal reativa a memória espacial na ausência da plataforma, esta pode ficar instável (Rossato et al., 2006) e, para que persista, precisa passar pelo processo de reconsolidação (Przybylski e Sara, 1997; Nader et al., 2000), o qual é caracterizado pela reestabilização da memória lembrada. No contexto específico do LAM, o processo de reestabilização depende da proteína quinase M ζ (PKM ζ) no hipocampo, uma isoforma da PKC que se mantém constitutivamente ativa.

Sabemos que a inibição da PKM ζ hipocampal logo após um teste na ausência da plataforma de escape impede a reestabilização da memória espacial e por isso induz amnésia. Quando os animais são testados um dia mais tarde, eles não lembram do local onde a plataforma esteve localizada durante o treino. Porém, pouco sabemos acerca da natureza da amnésia induzida pela inibição da PKM ζ hipocampal após a reativação da memória espacial no LAM. Em

particular, ainda desconhecemos se a amnésia causada é reversível ou, pelo contrário, decorre do apagamento seletivo do traço mnemônico.

Para responder esta pergunta, estudamos os efeitos da administração intra-hipocampal de um inibidor específico da PKM ζ , ZIP, na persistência da memória espacial. Hipotetizamos que se a inibição da PKM ζ hipocampal após a reativação da memória a apagasse efetivamente, então sua reaquisição durante um re-treino deveria requerer dos mesmos processos moleculares e do mesmo número de sessões que o aprendizado original, os quais não seriam necessários se a amnésia observada fosse consequência apenas do bloqueio da reativação ou expressão da memória espacial.

Metodologia

Sujeitos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 280-330 g. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Setorial do Instituto do Cérebro-BISIC da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os animais foram tratados conforme a Lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. 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, já aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN. O aluno envolvido possui o curso de manejo de animais (Anexo 1).

Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, seguindo as coordenadas do atlas Paxinos e Watson (2007) para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas 1,0 cm acima da região CA1 do hipocampo dorsal. A cirurgia foi realizada com os animais sobre o efeito de anestésico (quetamina e xilazina), administrados intra-peritonealmente (i.p.), nas doses de 80 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. As cânulas para infusão das drogas foram confeccionadas manualmente a partir de agulhas (3G) Os animais receberam meloxicam (2 mg/kg, s.c.) como analgésico imediatamente antes da cirurgia e nos três dias subsequentes. Os animais foram mantidos nas suas gaiolas moradia originais e os experimentos começaram 7 a 10 dias após a cirurgia. A associação de ketamina + xilazina possui efeito anestésico de leve a moderado. As cirurgias para implantação de cânulas no hipocampo duram em média 25-30 min.

Infusão dos fármacos

Os animais receberam microinjeções bilaterais através de cânulas posicionadas na região CA1 do hipocampo dorsal mediante cirurgia estereotáxica. Os fármacos foram administrados no volume de 1 uL/lado. A infusão da droga/veículo foi realizada por meio de uma agulha gengival conectada a uma microseringa Hamilton (Hamilton Company®, USA). A agulha gengival foi acoplada à cânula de infusão permitindo que a droga/veículo seja administrada na região de estudo. A velocidade de infusão foi controlada por uma bomba de infusão (Insight) que permite controlar o volume e a velocidade da infusão (0,25 uL/min). Ao término de cada infusão, a agulha foi mantida no local por 30 segundos para evitar refluxo.

Tarefa do labirinto aquático de Morris

Os animais foram treinados na versão espacial do labirinto aquático de Morris (LAM), que consiste de uma piscina circular de cor preta (200 cm de diâmetro), conceitualmente dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos. Dois centímetros abaixo da superfície da água (mantida entre 21-23°C durante todo o experimento) e oculta da vista do rato se colocará uma plataforma de escape com 12 cm de diâmetro. O LAM está localizado em uma sala ampla e iluminada, com dicas de localização espacial nas paredes. Antes de serem treinados os animais foram manipulados por alguns minutos além de serem colocados na piscina por 1 minuto para sua habituação. O treino consiste de uma sessão diária, por 7 dias. Cada sessão é composta por 8 largadas consecutivas, durante os quais a plataforma submersa é mantida em uma posição constante. A duração máxima de cada largada é de 60s e o intervalo inter-largada é de 30s. No oitavo dia a plataforma é removida e os animais são submetidos à uma sessão de teste com duração de 60s. Imediatamente após o teste na ausência da plataforma os animais receberam infusão intra-hipocampal de VEH ou ZIP e no dia seguinte foram testados novamente ou submetidos a um novo treinamento na versão espacial do LAM, quando avaliamos se os animais amnésicos para a localização da plataforma precisavam aprender tudo novamente ou se o aprendizado ocorria de forma mais rápida.

Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas por meio da análise de variância (ANOVA) ou por teste t de Student. Quando necessário, a ANOVA foi seguida do teste post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações.

Resultados e Discussões

Para compreender o papel da PKM ζ na reconsolidação da memória espacial, infundimos ZIP na região CA1 do hipocampo dorsal logo após uma sessão de teste (PT1), a qual ocorreu um dia depois da última sessão de treino onde os ratos passaram por sessões diárias de treinamento (TR1) na versão espacial do LAM por 7 dias seguidos. Cada sessão consistia de 8 trials, de Tr1 a Tr8. O círculo cinza indica onde a plataforma de escape estava. Para testar a memória espacial, foi feito um teste (PT1) 1 dia após a última sessão, com a plataforma de escape removida. Logo em seguida, foi injetado VEH ou ZIP nos animais. Para testar a amnésia causada pela injeção de ZIP, 1 dia após submetemos os ratos a um segundo teste (PT1), também com a plataforma de escape removida. Observamos que o tratamento com ZIP induz perda da memória espacial uma vez que os animais não nadam seletivamente no quadrante onde a plataforma esteve localizada e sim randomicamente em toda a piscina (Fig. 1B, $F(2, 28) = 5.028$, $p = 0.0136$ para Tratamento; $F(1, 28) = 8.324$, $p = 0.0074$ para Sessão PT; $F(2, 28) = 6.116$, $p = 0.0063$ para Tratamento x Sessão PT, em ANOVA de duas vias). Também fizemos um teste t de amostra única comparado ao valor 25% (chance) que está representado como #. Com esses resultados, corroboramos que a infusão de ZIP induz amnésia para a memória espacial aprendida. Com isso fomos estudar se essa amnésia é total ou parcial. Para tal, em outro experimento, submetemos novos animais a um desenho experimental que conta com mais um protocolo de treinamento (TR2) um dia após o PT1, com duração de dois dias. O protocolo de treinamento no LAM (TR1) utilizado em nosso estudo (Fig. 2A: Ratos passaram por sessões diárias de treinamento (TR1) na versão espacial do LAM por 7 dias seguidos. Cada sessão consistia de 8 trials, de Tr1 a Tr8. O círculo cinza indica onde a plataforma de escape estava presente) resultou em um aprendizado espacial

significativo, como demonstrado pela diminuição progressiva na latência de escape ao longo das sessões de treinamento (Fig. 2B; $F(3.455, 38.01) = 50.06$, $p < 0.001$, em ANOVA unidirecional para medidas repetidas com correção de Greenhouse e Geisser). Para testar a memória espacial, foi feito um teste (PT1). Logo em seguida, foi injetado VEH ou ZIP nos animais. Após um dia, os animais foram submetidos a mais um treinamento (TR2), dessa vez com duração de apenas dois dias. Observamos que a latência de escape no TR2 (cada ponto no gráfico representa a média dos 8 trials de latência de fuga por animal em cada sessão) permanece com valores semelhantes nos grupos VEH e ZIP (Fig. 2C, $F(2,63)=2.49$, $p=0.091$, em ANOVA unidirecional), o que sugere que o reaprendizado dos animais que receberam ZIP não ocorre como se fosse a primeira vez. Nossos resultados indicam que este reaprendizado ocorre a partir de alguma informação parcial, a qual pode preservar estratégias de busca e a relação das informações espaciais do ambiente do labirinto aquático, mesmo na ausência da informação para a localização da plataforma.

Conclusão

Nossos resultados demonstram que a amnésia induzida pelo bloqueio da PKM ζ durante a reconsolidação da memória espacial não é total, o que é indicado pelo rápido reaprendizado da tarefa pelos animais amnésicos. Assim, a natureza da amnésia observada deve ser vista de forma complexa, pois no treinamento no LAM, não apenas componentes espaciais são adquiridos, mas os componentes não espaciais como aprender estratégias de busca e aprender que existe uma fuga não são comumente considerados nos estudos, no entanto, são componentes essenciais da memória espacial.

Referências

- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12, 239–260. doi: 10.1016/0023-9690(81)90020-5
- Morris, R. G. M. (1984). Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Moser, E., Moser, M. B., and Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13, 3916–3925. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-09-03916.1993
- Nader, K., Schafe, G. E., and Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726. doi: 10.1038/35021052
- Othman, M. Z., Hassan, Z., and Has, A. T. C. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Exp. Anim.* 71, 264–280. doi: 10.1538/expanim.21-0120
- Paxinos GW. & Watson C. Academic, San Diego, 2007.
- Przybylski, J., and Sara, S. J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* 84, 241–246. doi: 10.1016/S0166-4328(96)00153-2

Rinaldi, A., De Leonibus, E., Cifra, A., Torromino, G., Minicocci, E., De Sanctis, E., et al. (2020). Flexible use of allocentric and egocentric spatial memories activates differential neural networks in mice. *Sci. Rep.* 10:11338. doi: 10.1038/s41598-020-68025-y

Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem.* 2006 Jul-Aug;13(4):431-40.

Vorhees, C. V., and Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1, 848–858. doi: 10.1038/nprot.2006.116

Anexos

Figura 1: Infusão de ZIP da região CA1 hipocampal intra-dorsal gera amnésia.

Figura 2: Amnésia provocada pela infusão de ZIP da região CA1 hipocampal intra-dorsal não apaga o traço mnemônico completamente.

Anexo 1: Certificado de curso de manejo de animais

CÓDIGO: SB1130

AUTOR: WESLEY VIEIRA CORINGA

ORIENTADOR: JANEUSA TRINDADE DE SOUTO

TÍTULO: Investigação da atividade de análogos de Caulerpina no infiltrado leucocitário em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Resumo

Algas marinhas do gênero *Caulerpa* têm papel relevante para a comunidade científica. Estudos do nosso laboratório apontam que o alcaloide caulerpina (CLP) apresenta atividade anti-inflamatória em modelos de peritonite, colite e lesão pulmonar aguda. Devido a isso, foi proposta a elaboração de análogos de CLP, mais lipossolúveis e mais permeáveis às membranas biológicas, para avaliação de suas propriedades. Esse estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios do análogo N-metil (CLPN) da CLP clássica (CLPc) em modelo murino de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS. Para tal, camundongos Swiss machos foram pré-tratados com CLP (2 mg/kg), CLPN (2 mg/kg) ou com dexametasona (1 mg/kg). Após 1h, os animais foram estimulados com LPS (100 µg/kg). Depois de 24h, os camundongos foram eutanasiados, o lavado broncoalveolar (LBA) coletado, centrifugado, as células foram usadas para contagem total e diferencial de leucócitos, e o sobrenadante para determinação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e nitrito (derivado do NO), e os pulmões coletados para a análise histológica. Os dados obtidos mostraram que os animais tratados com a CLPc e CLPN, nas doses de 2 mg/kg, apresentaram redução do número células, especialmente polimorfonucleares, na cavidade peritoneal, dos níveis de IFN-γ, IL-1β, IL-6, TNF-α e de nitrito no LBA, e redução dos danos teciduais no parênquima pulmonar. Em síntese, a CLP e o análogo CLPN apresentam potencial anti-inflamatório no modelo de LPA induzida por LPS.

Palavras-chave: Processo inflamatório; Produto natural; Imunomodulação.

TITLE: Investigation of N-methyl and N-methyl-O-ethyl analogs of caulerpine in a murine model of acute lung injury caused by LPS.

Abstract

Marine algae of the *Caulerpa* genus play a relevant role in the scientific community. Studies from our laboratory indicate that the alkaloid caulerpine (CLP) exhibits anti-inflammatory activity in models of peritonitis, colitis, and acute lung injury. Therefore, the development of CLP analogs, which are more lipid-soluble and permeable to biological membranes, was proposed to evaluate their properties. This study evaluated the anti-inflammatory effects of the N-methyl analog (CLPN) of classical CLP (CLPc) in a murine model of LPS-induced acute lung injury (ALI). Male Swiss mice were pretreated with CLP (2 mg/kg), CLPN (2 mg/kg), or dexamethasone (1 mg/kg). After 1 h, the animals were challenged with LPS (100 µg/kg). After 24 h, the mice were euthanized, the bronchoalveolar lavage (BAL) was collected and centrifuged, the cells were used for total and differential leukocyte counts, and

the supernatant was used to determine the levels of pro-inflammatory cytokines and nitrite (a NO derivative), and the lungs were collected for histological analysis. The data obtained showed that animals treated with CLPc and CLPN, at doses of 2 mg/kg, showed a reduction in the number of cells, especially polymorphonuclear cells, in the peritoneal cavity, in the levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , and nitrite in the BAL, and a reduction in tissue damage in the lung parenchyma. In summary, CLP and the CLPN analogue have anti-inflammatory potential in the LPS-induced ALI model.

Keywords: Inflammatory process; Natural product; Immunomodulation.

Introdução

O organismo humano, durante a invasão por um patógeno, utiliza uma variedade de respostas de defesa, por exemplo, a reação inflamatória (1). Além disso, o processo inflamatório também pode ser desencadeado por substâncias químicas, interação antígeno-anticorpo ou contra autoantígenos (1,2). Cada estímulo evoca um padrão característico de resposta (3).

A fase inicial da inflamação caracteriza-se por eventos vasculares - vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, e produção de mediadores responsáveis por mediar a contração das células endoteliais (4, 5). Após isso, há o aumento do fluxo sanguíneo local e o influxo de líquido e seu acúmulo nos interstícios (6). O exsudato líquido é drenado nos vasos linfáticos e transportado para os linfonodos locais, em que os produtos do microrganismo podem iniciar uma resposta imunológica (7).

A inflamação aguda tem vários processos programados, incluindo a fibrose tecidual crônica ou reparo completo do tecido e, quando não tratada de forma adequada, pode evoluir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (1, 5). Diante disso, muitos modelos podem ser utilizados para avaliar o processo inflamatório, os quais podem ser instalados utilizando substâncias químicas ou microbiológicas, como a injeção intraperitoneal de zimosan - componente da parede celular fúngica - ou o lipopolissacarídeo presente na parede celular de bactérias gram negativas, gerando modelos de inflamação aguda autorresolutiva, amplamente usados no estudo do processo inflamatório (8 - 11).

Os modelos simples de inflamação podem evoluir para modelos mais complexos, por exemplo, a sepse, caracterizada por uma resposta imunológica exacerbada a um processo infeccioso. A sepse pode levar a diversas complicações, como a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), precedida pela lesão pulmonar aguda, caracterizada pelo edema pulmonar e hipoxemia grave. É válido salientar que o SARS-CoV-2 representa um dos principais agentes causadores de LPA e, com isso, a covid-19 pode evoluir para SDRA (12).

Diante do exposto, o modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS pode ser utilizado para a avaliação da LPA/SDRA. Esse modelo é baseado na injeção intranasal de LPS em camundongos. Ao ser administrado, via intranasal, o LPS induz um intenso recrutamento celular, formação de edema pulmonar e produção de citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF, e gera dano tecidual (13). É válido ressaltar que o LPS gera essa resposta mediante o seu reconhecimento pelo TLR4, o qual, via MyD88, ativa o fator de transcrição NF- κ B, que, por sua vez, induz a produção de citocinas de caráter inflamatório (14).

Nosso grupo de pesquisa, ao longo dos anos, utilizou extratos de algas marinhas do gênero *Caulerpa* e seus produtos purificados, a fim de verificar o efeito protetor dessas substâncias

em modelos inflamatórios (15, 16). A caulerpina, alcaloide besindólico, oriunda da alga *Caulerpa racemosa*, foi testada em modelos murinos de peritonite induzida por zimosan e colite induzida por dextrana sulfato de sódio, reduzindo a migração celular, os danos teciduais e os níveis de citocinas inflamatórias (9).

Tendo em vista que estudos do nosso laboratório apontam que a caulerpina apresenta atividade anti-inflamatória em modelos de peritonite (17), edema de orelha e lesão pulmonar aguda (18), mediante a inibição da migração de leucócitos e redução da produção de citocinas inflamatórias, foi proposta a elaboração de análogos de caulerpina, para a avaliação de suas atividades biológicas. Esses análogos, obtidos a partir da adição de grupos alquilas (metila e etila) na molécula de caulerpina, caracterizam-se pela elevada lipofilicidade, amplificando a sua permeabilidade às membranas biológicas, podendo potencializar sua atividade.

Diante das considerações expostas anteriormente, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos anti-inflamatórios do análogo N-metil da caulerpina em modelo murino lesão pulmonar aguda induzida por LPS (figura 1).

Metodologia

Animais de Experimentação: camundongos Swiss machos de 6 a 8 semanas de idade, obtidos no Biotério Central do Centro de Biociências do Departamento de Biofísica e Farmacologia, com livre acesso à água e ração e regime claro-escuro de 12 em 12h. Todos os procedimentos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRN), sob o protocolo de número 013/2023.

Obtenção da *Caulerpa racemosa* e isolamento e modificações da caulerpina: As amostras de *Caulerpa racemosa* foram obtidas na praia de Pirambúzios (Nísia Floresta/RN, 5° 59' 23.642" S, 35° 6' 45.935" W) em formações rochosas durante a maré de sizígia. Após a coleta, as algas foram lavadas e secas em estufa a 70°C. As amostras foram enviadas ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, onde a professora Dr^a Bárbara Viviana de Oliveira Santos e equipe realizaram a extração da caulerpina (CLP) e a obtenção dos análogos, que nos foram cedidos para a realização das análises.

Modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS: camundongos Swiss machos foram anestesiados, via intraperitoneal (ip), com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e, posteriormente, receberam 200 µL dos tratamentos por via oral: o análogo de CLP N-metil (2 mg/kg) e CLP clássica (2 mg/kg) (dose com melhor efeito protetor em outros estudos do nosso laboratório - usada como controle dos análogos) ou com dexametasona (1 mg/kg), por via ip, como droga controle padrão. Após 1h, a lesão pulmonar aguda foi induzida mediante a inoculação intranasal de 60 µL de solução de LPS a 100 µg/kg (3 inoculações repetidas de 20 µL nas narinas dos animais) (19). Depois de 24h, os animais foram eutanasiados com dose letal de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), via ip, o lavado broncoalveolar foi coletado para a determinação total e diferencial de células, dosagem de citocinas e nitrito, e os pulmões foram coletados para análises histológica.

Lavado Bronco-Alveolar (LBA): após a eutanásia dos camundongos, os animais tiveram a traqueia canulada e os pulmões lavados três vezes com 0,8 mL de solução salina (NaCl, 0,9%). O líquido obtido foi centrifugado, a 1.400 rpm, durante 10 min, o sobrenadante foi

colocado em tubos falcon de 15 mL (Vitchlab) e armazenado a -20°C (Electrolux) e o pellet resultante foi diluído em 500 µL de NaCl 0,9% e o número de células determinados pela contagem em câmara de Neubauer, seguida de citocentrifugação em lâminas e coloração das células com corante panótico rápido para contagem diferencial em microscópio (objetiva de aumento de 100x). Os animais inoculados com 60 µL de solução salina 0,9% pela via intranasal e pela via oral com 200 µL da solução de goma arábica a 5% (dilúente da CLP e CPLN) foram utilizados como controles negativos e os animais inoculados com 60 µL de LPS pela via intranasal e por via oral com 200 µL de solução de goma arábica a 5%, como controles positivos. Foram realizados três experimentos independentes que asseguraram a significância estatística e a reprodutibilidade dos dados.

Dosagem de citocinas por ELISA: Para a dosagem IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF avaliadas no LBA, por ELISA, utilizando kits da eBioscience e da R&B Systems, utilizou-se placa de ELISA de 96 poços, na qual foram pipetados 50 µL do anticorpo de captura e incubação por 24h a 4°C. Após isso, os poços foram lavados com solução de lavagem e a curva padrão foi montada. Posteriormente, adicionou-se 50 µL das amostras e a placa foi incubada, durante 24h, a 4°C. Após isso, os poços foram lavados e 50 µL do anticorpo de detecção foi adicionado em cada poço da placa, a qual foi incubada, durante 1h, a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados e 50 µL da enzima (Avidina-HRP) foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 30 min. Após isso, os poços foram lavados e 50 µL de substrato foram adicionados em cada poço da placa, a qual foi incubada a temperatura ambiente por 15 min. Após esse tempo, foram adicionados 25 µL da solução de parada (ácido sulfúrico, 1M) em cada poço da placa e realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 450nm.

Dosagem de Nitrato/Nitrito: em uma placa de fundo chato de 96 poços, montou-se a curva padrão com nitrito de sódio. Posteriormente, adicionou-se 50 µL do sobrenadante. Em seguida, adicionou 50 µL do reagente de Griess em cada poço da placa, a qual foi coberta com papel alumínio e incubada a temperatura ambiente por 10 min. Após isso, realizou-se a leitura da placa no espectrofotômetro a 540 nm.

Processamento histológico dos pulmões: os pulmões foram coletados (5 animais/grupo) e fixados em formalina tamponada a 10%. Após 48h, os espécimes foram cortados transversalmente, desidratados em álcool, diafanizados e emblocados em parafina. Após isso, os blocos foram seccionados (4 µm) para a obtenção das lâminas, que foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Após isso, foram realizadas as análises histológicas, em microscópio óptico, para determinar o escore de lesão pulmonar padronizado pela Sociedade Torácica Americana (20). Para cada animal, selecionou-se 05 campos aleatórios consecutivos, utilizando a objetiva de 40x para a análise de cada parâmetro histopatológico (total de 125 campos analisados em um total de 25 animais nos 5 grupos). Ao término da análise, foi determinando o escore total de cada animal, baseando-se pela fórmula $[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{número de campos analisados} \times 100)$. Esse processo foi realizado no Departamento de Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da UFRN, em colaboração com a Prof.^a. Dr.^a. Ericka Janine da Silveira.

Análise estatística dos dados: Os resultados foram dispostos como média $\pm$ desvio padrão e foram submetidos a testes de análise de variância (ANOVA) One-way ou two-way, com teste post-hoc de Tukey. Os testes foram realizados através de programa de estatística especializado (GraphPad Prism 8, GraphPad Software).

Resultados e Discussões

Após a realização das etapas experimentais descritas na metodologia do presente estudo, verificou-se que, no modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, os animais inoculados com LPS pela via intranasal e por via oral com solução de goma arábica a 5% apresentaram níveis elevados de nitrito, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α no BAL, elevada celularidade na cavidade pulmonar, marcada, sobretudo, pela presença de neutrófilos, e danos teciduais significativos nos pulmões quando comparados aos camundongos inoculados com solução salina 0,9% pela via intranasal e pela via oral com solução de goma arábica (diluente da CLP e análogos). Por outro lado, os animais tratados com a caulerpina clássica (2 mg/kg) e seu análogo (caulerpina N-metil - 2 mg/kg) apresentaram redução significativa no número de células presentes na cavidade pulmonar (figuras 2 e 3), nos níveis de IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α (figura 4), nos níveis de nitrito (figura 5) e nos danos teciduais pulmonares (figuras 6 e 7), similar ao que se observou quando animais foram tratados com dexametasona.

O potencial da caulerpina N-metil - análogo da caulerpina clássica - assim como a molécula de origem testada em outros estudos, caracteriza-se como promissor, visto que, devido às mudanças estruturais, essa molécula apresenta melhor solubilidade e melhora sua lipofobicidade, mostrando dados similares aos já obtidos pela CLPc. Machado-Aranda, (2014) em seus estudos, apontam como a lesão pulmonar aguda é responsável pelo recrutamento de um grande número de leucócitos, sobretudo, polimorfonucleares, para a cavidade pulmonar, além de gerar uma alta quantidade de exsudato, edema e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (21). Além disso, Santos (2002) demonstra que a atividade neutrofílica, associada à produção de citocinas pró-inflamatórias estão, intrinsecamente, ligadas ao dano tecidual provocado no parênquima pulmonar (22). Diante disso, verificar a redução dos níveis de IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , de óxido nítrico e do número de células no lavado broncoalveolar dos animais tratados com a caulerpina clássica e o seu análogo N-metil, assim como ocorreu com os animais tratados com dexametasona, (anti-inflamatório utilizado como controle padrão), como também verificar a capacidade protetora dessas moléculas contra o dano no tecido pulmonar, representa um avanço importante para os estudos acerca da utilização de compostos naturais marinhos na pesquisa científica. É importante destacar que, apesar do mecanismo de ação dessas substâncias ainda não estar completamente elucidado, consegue-se enfatizar a importância dos produtos marinhos e das suas modificações estruturais para o estudo da atividade biológicas desses compostos nos processos inflamatórios.

Conclusão

Baseando-se nos dados obtidos durante as etapas experimentais do estudo, infere-se que a caulerpina clássica e o análogo N-metil apresentam potencial anti-inflamatório no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, reduzindo os níveis de IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF- α no lavado broncoalveolar, inibindo migração de células leucocitárias para a cavidade peritoneal, reduzindo os níveis de óxido nítrico e amenizando os danos teciduais no parênquima pulmonar dos animais estudados nesse modelo.

Referências

1. MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-35, 2008.
2. CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 48, n.2, p. 137-158, 1998.
3. CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O.L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M.; MOLLNES, T.E. Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory response Syndrome and Sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 69, p. 479–491, 2009.
4. SANTOS JUNIOR, J. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. *Revista brasileira de coloproctologia*, v. 23, p. 206-210, 2003.
5. SERHAM, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro- resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, v.8, p. 349-361, 2008.
6. MURPHY, H. S.; WARD, P. A. Inflamação. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. Rubin, *Patologia: bases clinicopatológicas da medicina*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.43-85.
7. KONO, H.; ROCK, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 279–289, 2008.
8. CASH JL, WHITE GE, GREAVES DR. Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the Study of Inflammation. *Methods Enzymol*. 2009;461:379-96.
9. LUCENA AMM, et al. The Bisindole Alkaloid Caulerpin, from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*, Attenuated Colon Damage in Murine Colitis Model. *Mar Drugs*. 2018; 7:16(9). pii: E318.
10. ITO Y, KINASHI H, KATSUNO T, SUZUKI Y, MIZUNO M. Peritonitis-induced peritoneal injury models for research in peritoneal dialysis review of infectious and non-infectious models. *Ren Replace Ther* 3, 16 (2017). <https://doi.org/10.1186/s41100-017-0100-4>.
11. NGUYEN M, et al. Intra-Abdominal Lipopolysaccharide Clearance and Inactivation in Peritonitis: Key Roles for Lipoproteins and the Phospholipid Transfer Protein. *Front. Immunol*. 2021, 12:622935. doi: 10.3389/fimmu.2021.622935.
12. THEPMANKORN, P. et al. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection: The spectrum of its neurological manifestations. *Cytokine*, v. 138, n. September 2020, p. 155404, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155404>>.
13. LU Y, LIU J, LI H, GU L. Piperine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via modulating NFkB signaling pathways. *Inflammation*. v. 39, n. 3, p. 303-308, 2016.
14. HU R, XU H, JIANG H, ZHANG Y, SUN Y. The role of TLR4 in the pathogenesis of indirect acute lung injury. *Front Biosci (Landmark Ed)*. v. 1, n. 18, p. 1244-1255, 2013.

15. SOUZA, CÁSSIO RICARDO MEDEIROS. Efeito antiinflamatório do extrato metanólico de *Caulerpa mexicana* em modelo murinho de inflamação generalizada induzida por zimozan. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.
16. SOUZA CRM, BEZERRA WP, SOUTO JT. Marine Alkaloids with Anti-Inflammatory Activity: Current Knowledge and Future Perspectives. *Mar. Drugs* 2020, 3, 147.
17. SILVA, ANA BEATRIZ RAMALHO DA. Efeito do alcalóide indólico *Caulerpina* nos modelos murinos de peritonite e edema de orelha. 2020. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.
18. MAGGI, ÍCARO VALENTIM CÂMARA. Atividade anti-inflamatória do alcaloide *caulerpina* em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.
19. SZARKA, R. J. et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *Journal of Immunological Methods*, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.
20. MATUTE-BELLO, G. et al. An official american thoracic society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.
21. Machado-Aranda D., V. Suresh M., Yu B., Dolgachev V., Hemmila M. R., and Raghavendran K., Alveolar macrophage depletion increases the severity of acute inflammation following nonlethal unilateral lung contusion in mice, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. (2014) 76, no. 4, 982–990, <https://doi.org/10.1097/TA.000000000000163>, 2-s2.0-84897069139, 24662861.
22. Da Silva-Santos J. E., Santos-Silva M. C., Cunha Fde Q., and Assreuy J., The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (2002) 300, no. 3, 946–951, <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.946>, 2-s2.0-0036179266, 11861802.

Anexos

Figura 1 - Representação estrutural da *caulerpina* clássica e dos análogos *Caulerpina* N-metil e *caulerpina* N-metil-O-etil.

Figura 2 - Efeito do tratamento com CLPc e CLPNmt na migração de leucócitos para a cavidade pulmonar de camundongos submetidos ao modelo de lesão pulmonar aguda.

Figura 3 - Efeito do tratamento com CLPc e CLPNmt na migração de leucócitos para a cavidade pulmonar de camundongos submetidos ao modelo de lesão pulmonar aguda.

Figura 4 - Efeito do tratamento com CLPc e CLPNmt nos níveis citocinas no lavado broncoalveolar de camundongos submetidos ao modelo de lesão pulmonar aguda.

Figura 5 - Efeito do tratamento com CLPc e CLPNmt no nível de nitrito no LBA de camundongos submetidos ao modelo de LPA.

Figura 6 - Análise morfológica dos pulmões de camundongos Swiss 24 horas após a indução de LPA de acordo com os grupos.

Figura 7 - Mensuração do dano do tecido pulmonar de camundongos 24 horas após a indução de LPA.

CÓDIGO: SB1135

AUTOR: ANA JULIA TAVARES DA SILVA

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Análise do tecido adiposo associado ao tumor no microambiente tumoral do câncer colorretal após tratamento com nanossistema de Goma Caju associado ao agonista de TLR7/8, curcumina e paclitaxel.

Resumo

Neste estudo, foi avaliada a distribuição do tecido adiposo no microambiente tumoral (MT) do câncer colorretal após tratamento com nanopartículas de goma de caju contendo paclitaxel (PTX), curcumina (CURC), agonistas de receptores Toll-like 7/8 (TLR7/8) isolados ou em combinação (CURC+TLR). Amostras tumorais foram coletadas do laboratório Laici, coradas por H&E e analisadas histopatologicamente, por meio de escores estabelecidos e pelo programa de software ImageJ, quanto à presença de tecido adiposo, infiltrado inflamatório, necrose e fibrose. Os resultados mostraram que o tratamento com CURC+TLR e TLR isolado reduziu significativamente a quantidade de tecido adiposo no MT ($p < 0,0001$), enquanto a curcumina isolada apresentou efeito intermediário e o PTX não demonstrou alterações relevantes. Além disso, os grupos tratados com CURC, CURC+TLR e PTX apresentaram aumento da necrose tumoral ($p < 0,0001$) e maior presença de infiltrado inflamatório, enquanto a fibrose não sofreu alterações significativas. Esses achados evidenciam o potencial de estratégias terapêuticas combinadas que podem modular os adipócitos associados ao câncer no microambiente tumoral do câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Tecido adiposo; Curcumina; Toll-like receptor

TITLE: Analysis of Tumor-Associated Adipose Tissue in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer After Treatment with Cashew Gum Nanosystem Combined with TLR7/8 Agonist, Curcumin, and Paclitaxel

Abstract

This study evaluated the distribution of adipose tissue in the tumor microenvironment (TME) of colorectal cancer following treatment with cashew gum nanoparticles containing paclitaxel (PTX), curcumin (CURC), Toll-like receptor 7/8 agonists (TLR7/8), either alone or in combination (CURC+TLR). Tumor samples were collected from the Laici laboratory, stained with H&E, and analyzed histopathologically using established scoring systems and ImageJ software to assess the presence of adipose tissue, inflammatory infiltrate, necrosis, and fibrosis. The results showed that treatment with CURC+TLR and TLR alone significantly

reduced the amount of adipose tissue in the TME ($p < 0.0001$), while curcumin alone exhibited an intermediate effect, and PTX showed no relevant changes. Furthermore, the groups treated with CURC, CURC+TLR, and PTX presented increased tumor necrosis ($p < 0.0001$) and higher inflammatory infiltrate, whereas fibrosis did not show significant changes. These findings highlight the potential of combined therapeutic strategies to modulate cancer-associated adipocytes within the tumor microenvironment of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer; Adipose tissue; Curcumin; Toll-like receptor

Introdução

O câncer representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Segundo a OMS, a estimativa é que até 2050 haja 35 milhões de novos casos globalmente (KAMAL et al., 2022). Trata-se de uma doença caracterizada por crescimento celular descontrolado, decorrente de alterações genéticas e moleculares que favorecem a multiplicação e sobrevivência de células anormais. A massa tumoral surge a partir de eventos malignos como escape da apoptose, imortalidade replicativa, angiogênese e metástase (Su, 2015).

Dentre os tipos de câncer, o colorretal (CCR) é o terceiro mais incidente e a segunda causa de morte por câncer (Roshandel, 2024). Seu desenvolvimento envolve múltiplos fatores de risco: predisposição genética, histórico familiar, inflamações intestinais crônicas, dietas ricas em carnes vermelhas e ultraprocessados, sedentarismo e obesidade (Sawick, 2021). Entre esses, a obesidade é um dos fatores modificáveis mais significativos. Uma meta-análise ampla constatou que o excesso de peso aumenta em cerca de 36% o risco de CCR, sendo maior em homens (Ungvari, 2025).

O tecido adiposo, anteriormente considerado apenas um reservatório energético, é hoje reconhecido como um órgão endócrino altamente especializado, capaz de regular o metabolismo de ácidos graxos, a homeostase da glicose e a resposta inflamatória sistêmica (Luo, 2016). Em condições de obesidade, esse tecido sofre alterações estruturais funcionais, como hipertrofia dos adipócitos, hipóxia local, inflamação crônica e remodelação da matriz extracelular (Ritter, 2023). Essas modificações levam à secreção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , bem como ao aumento de leptina e resistina e à redução de adiponectina, que normalmente exerce efeito protetor contra o desenvolvimento tumoral (Saha, 2023). Assim, a interação entre tecido adiposo e sistema imune contribui para a carcinogênese colorretal, especialmente em contextos metabólicos alterados (Del, 2018).

Diante do impacto referente ao CCR e a sua relação com fatores como a obesidade e inflamação crônica, torna-se importante compreender como o microambiente tumoral (MT) em conjunto com adipócitos e estruturas que cercam o tumor, influenciam o crescimento e a sua resposta a tratamentos. O sistema imune tem um papel fundamental visto que, em condições normais ele identifica e elimina células malignas, porém, pode ser manipulado para favorecer a sobrevivência de células tumorais (LV, 2022). Células imunossupressoras, como os macrófagos do tipo M2, e mediadores inflamatórios liberados por tecido adiposo disfuncional criam um cenário que favorece a progressão da doença e a resistência a terapias. (Liu, 2018).

Para enfrentar esse cenário, novas abordagens terapêuticas buscam modular esse microambiente, reduzindo processos inflamatórios e regulando a presença do tecido adiposo. Entre essas estratégias, destacam-se nanoformulações imunomoduladoras. Neste estudo, foi investigado o uso da goma de caju como matriz natural para nanopartículas, proporcionando liberação controlada de fármacos, maior estabilidade, biodisponibilidade e potencial

terapêutico (Dias, 2016). Essa plataforma foi associada a diferentes agentes: Paclitaxel (PTX), quimioterápico que induz morte imunogênica e bloqueia divisão celular em tumores de rápida proliferação (Lau, 2020); Curcumina (CURC), composto anti-inflamatório e antitumoral que interfere no crescimento e sobrevivência celular (Fadus, 2016); e agonistas Toll-like 7/8 (TLR7/8), que estimulam a resposta imune inata e adaptativa, promovendo a produção de citocinas antitumorais e modulando macrófagos associados ao tumor para um perfil mais combativo (Rodell, 2018).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto dessas terapias, isoladas ou combinadas, sobre a distribuição do tecido adiposo no MT e sobre parâmetros histopatológicos relevantes à evolução do CCR, trazendo novas perspectivas para o uso da imunoterapia e da nanotecnologia, desta doença.

Metodologia

Obtenção de Amostras Histológicas Tumorais

Para elaboração do projeto foram utilizadas lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina de amostras de tumores de CCR provenientes do repositório do Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação da UFRN (LAICI-DMOR/UFRN) (Souza, 2025). As amostras selecionadas de um projeto prévio do grupo de pesquisa, separadas em 5 grupos, todos associados a goma de caju. Grupo 1: Salina (grupo controle) o qual foi dividido em três cortes, Grupo 2: PTX (paclitaxel); Grupo 3: CURC (curcumina); Grupo 4: TLR (agonista de TLR7/8).

Análises histopatológicas

A avaliação morfológica do tecido foi conduzida em um aumento total de 400x, permitindo assim uma visualização mais detalhada das estruturas observadas. No decorrer das análises histopatológicas, foram determinados escores quantitativos de 1 a 4 (1 = ausente, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = severo), para a avaliação de necrose, fibrose e infiltrado inflamatório, pertinentes a estudos anteriores (Guo, 2021), divididos em campos, permitindo maior detalhe e visualização parâmetros alvo. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica em campo claro no microscópio de luz LED Nikon E200 (Microscope Central, PA, EUA), e as imagens registradas por câmera digital Moticam (San Antonio, TX, EUA).

Para a quantificação percentual do tecido adiposo, foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), com esse aplicativo, foi possível obter dados quantitativos dos adipócitos presentes no microambiente tumoral, seguindo uma estrutura técnica brevemente descrita (Schneider, 2012).

Cada parâmetro foi avaliado independentemente por dois observadores cegos quanto à identificação das amostras. A média dos escores obtidos foi utilizada para análise final.

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 $\pm$ desvio padrão (DP). As comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância não paramétrica (ANOVA). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado como indicativo devido ao número de grupos nas diferentes análises. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, tendo como grau de significância esses parâmetros: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$).

Resultados e Discussões

Com base nas análises realizadas a partir dos dados coletados, foram obtidos resultados significativos referentes à avaliação do grau de distribuição do tecido adiposo e suas relações com outras características presentes no tecido tumoral.

Avaliação do grau de distribuição do tecido adiposo no tumor

Os resultados evidenciaram que quando comparado o grupo controle com os tratamentos, a combinação CURC+TLR apresentou uma maior significância estatística, revelando, na figura 1, uma redução no grau de distribuição de adipócitos distribuídos no tecido tumoral. O tratamento com o agonista do TLR 7/8 isolado demonstrou resultados semelhantes ao combinado dito anteriormente. Entretanto, na Figura 1 pode-se observar que o tratamento PTX não mostrou redução significativa como os demais, uma vez que seus resultados quantitativos foram semelhantes ao grupo salina, sem uma alteração relevante.

em atenção ao número de grupos nas diferentes técnicas realizadas, considerando estatisticamente significativo o valor $p < 0,05$. Diante disso, estes dados estatísticos demonstram que os tratamentos mostraram uma eficácia quanto a diminuição do grau de tecido adiposo distribuído no tecido tumoral, uma vez que se obteve um resultado de $P = **** < 0,0001$.

Na figura 1, pode-se observar os grupos distribuídos no gráfico, destacando diferença estatística dando mais foco na combinação de CURC+TLR e o TLR. Os demais tratamentos, como CURC apresentou uma menor significância, enquanto o PTX não obteve resultados significativos, isso pode ser visto pela presença do (*) presente no gráfico.

Necrose tumoral

Na análise da necrose tumoral, conforme a figura 2, observou-se comportamento distinto em relação à distribuição de adipócitos. O tratamento com CURC isolada apresentou maior significância estatística comparado ao grupo salina, seguido pela combinação CURC+TLR, que mostrou resultado próximo ao CURC. Os demais tratamentos apresentaram alterações importantes, entretanto quando comparados com o grupo controle, não houve diferença tão significativa, como as anteriores. Na figura 2, pode-se observar o gráfico com a presença dos grupos e seu grau de distribuição referente a necrose tumoral, há um aumento significativo dos três tratamentos, CURC isolada, CURC+ TLR e por fim o PTX, para justificar o que está visualmente no gráfico, os dados obtidos foram analisados estatisticamente (teste de Kruskal-Wallis), apresentando valor de $p < 0,0001$ para CURC isolada e CURC+TLR.

Fibrose

Na análise da distribuição de fibrose no tecido tumoral, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo salina

($p > 0,05$), como se pode ver na Figura 4. Todos os tratamentos apresentaram valores próximos aos do controle, demonstrando ausência de um padrão consistente de aumento ou redução da fibrose que pudesse indicar efeito terapêutico relevante. Embora alguns tratamentos tenham apresentado valores discretamente superiores ao grupo salina, esse aumento não atingiu significância estatística e, portanto, não pode ser interpretado como totalmente relevante, diferentemente do observado em outros parâmetros analisados, como necrose tumoral e infiltrado inflamatório.

Infiltrado Inflamatório

A análise da presença de infiltrado inflamatório no tecido tumoral é um achado muito importante, uma vez que desempenha papéis cruciais tanto na resposta ao tratamento quanto na progressão tumoral, podendo atuar como estimulador de resposta antitumorais ou favorecer imunossupressão. A análise dos grupos foi satisfatória, principalmente para a combinação de CURC+TLR, PTX e em menor grau o TLR isolado, quando comparados ao grupo salina, uma vez que uma maior concentração de células do sistema imune pode ser benéfica, por poder apresentar uma resposta antitumoral eficaz. Os resultados apresentaram significância estatística $p < 0,0001$, reforçando o impacto desses tratamentos na modulação da resposta inflamatória no microambiente tumoral. A figura três demonstra por meio do gráfico os grupos que possuem uma maior concentração de infiltrado, nele é possível observar as diferenças significativas quando comparados ao salina.

Discussão

Os resultados encontrados mostraram um grande diferencial, quanto a correlação do tecido adiposo no microambiente tumoral junto aos tratamentos que tinham como objetivo diminuir a proliferação de células cancerígenas. A presença de tecido adiposo no microambiente tumoral pode apresentar diferentes efeitos, dependendo da circunstância. No entanto, o tecido adiposo e as células tumorais podem se envolver em uma simbiose metabólica, promovendo o crescimento do tumor, a metástase e a quimiorresistência, contribuindo para a agressividade e o risco de câncer (Lengyel E, 2018). Com base nisso, as análises no tecido tumoral nos permitiram ver esse diferencial, quanto à distribuição do tecido adiposo em diferentes cenários, levando em consideração a comparação com o grupo controle .

Os diferentes resultados observados diante da comparação dos tratamentos com o grupo controle é um ponto crucial a ser discutido. A significativa redução de tecido adiposo nos tratamentos, nos traz dados satisfatórios, uma vez que o aumento quantitativo dessas células no microambiente tumoral não seria tão benéfica, junto com outros fatores associados à promoção tumoral, como alta incidência de citocinas inflamatórias influenciando a progressão do câncer. Diante disso, a análise desse microambiente tumoral nos trouxe importantes resultados, uma vez que os tratamentos se mostraram significativos, destacando o tratamento com a ativação de TLR, esse resultado pode estar ligado à ação desses receptores que tem como uma de suas funções diminuir a diferenciação celular e proliferação desse tecido e induzirem a resposta imune com liberação de citocinas pró-inflamatórias que promovem a lipólise nos adipócitos, (Grant RW, 2015). Somado a isso, os TLRs são expressos nos adipócitos, e sua ativação pode inibir a diferenciação adipocitária, o que é totalmente benéfico para uma resposta antitumoral (Poulain, 2010).

Quando associado a curcumina, mostrou dados mais pertinentes, isso potencializa o fator antiproliferativo, pela ação da CURC que possui propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidante. Seu papel modulador de vias metabólicas combinadas com o TLR, favoreceram na redução do armazenamento lipídico nos adipócitos (Fadus, 2016). Desse modo, ambos os tratamentos juntos se mostraram promissores, uma vez que o TLR induz a resposta imune, enquanto a curcumina inibe a renovação de células tumorais e favorece um metabolismo energético mais ativo no tecido adiposo. Essas características tornam o microambiente menos favorável à progressão do câncer.

Na avaliação da necrose tumoral, pode-se observar na figura, os tratamentos com CURC isolada e CURC + TLR, apresentando significância estatística ($p < 0,0001$), indicando potente efeito na indução de morte celular. Os dados obtidos mostraram um aumento, isso pode estar relacionado aos tratamentos sobre o tecido tumoral. Isso evidencia que tais agentes não só podem interromper a proliferação tumoral como também possuem potencial de promover a supressão parcial da massa tumoral. A curcumina (CURC) está associada a múltiplos mecanismos pró-degenerativos em células tumorais. Estudos in vitro demonstraram que a curcumina pode induzir necrose celular mesmo em linhagens sem função de p53, por meio da via mitocondrial com translocação de Bax e liberação de citocromo c, seguida da ativação de caspases — constituindo uma forma de morte celular programada não-apoptótica (necrópsia) e eficiente (Feie, 2015). Junto a curcumina, a ativação de TLRs desempenha um papel importante, por desempenhar uma amplificação da resposta imune antitumoral, em fases iniciais proliferativas, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e reprogramação de macrófagos associados ao tumor (Zeng, 2019).

A combinação de CURC+TLR funciona por dois mecanismos que se complementam, que afetam tanto o tecido tumoral quanto o tecido adiposo no microambiente tumoral. Enquanto a curcumina ajuda a eliminar as células cancerígenas por meio de processos internos, como a ação nas mitocôndrias e na morte celular programada, exerce efeitos diretos sobre os adipócitos: ela induz apoptose em pré adipócitos, inibindo sua diferenciação e multiplicação — como comprovado em modelos celulares 3T3-L1, onde ocorre ativação de caspases e direciona para morte programada via caminhos intrínsecos e extrínsecos (Wu LY, 2019). Os TLRs fortalecem a resposta do sistema imunológico no ambiente ao redor do tumor, o que pode induzir lipólise nos adipócitos (Braunstein, 2018). A união desses dois efeitos pode explicar o aumento na inibição do tumor, especialmente pela necrose, que é a morte celular mais rápida e desorganizada.

Quando observamos uma maior quantidade de células inflamatórias nos tratamentos com CURC+TLR e PTX, isso pode indicar que o sistema imunológico está mais ativo no ambiente ao redor do tumor. Esse infiltrado pode ser formado por células como os linfócitos T CD8⁺, os macrófagos M1, que são importantes na defesa do corpo contra as células cancerígenas (Van, 2024). Em vários tipos de câncer, a presença desses infiltrados mais intensos costuma estar relacionada a um prognóstico melhor e a uma resposta mais eficaz às terapias que estimulam o sistema imunológico. Quando o tecido adiposo está presente em torno do tecido tumoral, sua influência inflamatória é altamente significativa. Adipócitos disfuncionais liberam adipocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e MCP-1, que

promovem o recrutamento de células imunes, incluindo macrófagos, e alimentam um estado de inflamação crônica que favorece a progressão tumoral (Himbert C, 2017). Diante dos dados observados, os resultados indicam uma tendência de resposta antitumoral, na qual a imunidade efetora demonstrou destaque em alguns dos tratamentos avaliados. Isso pode ser explicado pela redução do tecido adiposo, que elimina uma parcela significativa de adipocinas imunossupressoras. Com a redução de adipócitos, o microambiente se torna menos favorecedor à polarização M2 e menos pressionado à tolerância tumoral, potencializando a ação citotóxica do infiltrado (Huang, 2018). Portanto, o aumento do infiltrado inflamatório e à redução do tecido adiposo representam um cenário ideal de combate ao tumor

A análise da distribuição de fibrose no tecido tumoral revelou que não houve alterações significativas entre os tratamentos testados em comparação ao grupo controle. Embora alguns tratamentos tenham apresentado valores ligeiramente superiores, esse aumento não se mostrou estatisticamente relevante. Isso indica que possivelmente os tratamentos aplicados não foram eficazes em remodelar ou reduzir a quantidade de fibrose no microambiente tumoral. O tecido fibrótico, caracterizado por sua rigidez aumentada, é um fator reconhecido na tumorigênese e progressão do câncer, além de dificultar a vascularização uniforme do tumor e, consequentemente, comprometer a entrega de agentes quimioterápicos (Lengyel, 2018). Apesar desse achado, outros parâmetros avaliados, como o aumento do infiltrado inflamatório e a ativação de processos de morte celular neoplásica, demonstraram efeitos positivos do tratamento, indicando que a estratégia apresenta potencial terapêutico. No entanto, a ausência de impacto sobre a fibrose sugere que o microambiente fibrogênico, sustentado pelo tecido adiposo, pode atuar como uma barreira física e bioquímica, limitando a eficácia total da terapia (Sun, 2023).

Observou-se que alterações na quantidade e distribuição dos adipócitos podem repercutir sobre a resposta imune local, afetando a produção de citocinas, pró e anti-inflamatórias, que por sua vez regulam a progressão tumoral (Wang, 2023).

Conclusão

O presente estudo demonstrou resultados oportunos sobre a distribuição do tecido adiposo no microambiente tumoral. Os dados obtidos evidenciaram que o tecido adiposo exerce papel significativo na modulação do câncer colorretal, podendo influenciar processos como inflamação e necrose tumoral. Além disso, a análise dos diferentes tratamentos paclitaxel (PTX), curcumina (CURC), ativadores de receptores Toll-like 7/8 (TLR) e a combinação CURC + TLR evidenciou que a modulação terapêutica do microambiente tumoral é capaz de impactar o grau de infiltrado inflamatório e a necrose tumoral, sugerindo efeitos complementares entre estratégias imunomoduladoras e quimioterápicas.

Apesar de não terem sido observadas alterações significativas para o parâmetro de fibrose analisado, os resultados reforçam o potencial terapêutico da modulação do tecido adiposo no câncer colorretal, destacando a necessidade de estudos adicionais para complementar os mecanismos envolvidos e validar esses resultados em modelos clínicos.

Referências

- BRAUNSTEIN, Marc J.; KUCHARCZYK, John; ADAMS, Sylvia. Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy. *Targeted Oncology*, v. 13, n. 5, p. 583–598, out. 2018.
- DEL CORNÒ, Manuela; CONTI, Lucia; GESSANI, Sandra. Innate Lymphocytes in Adipose Tissue Homeostasis and Their Alterations in Obesity and Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2556, 5 nov. 2018.
- DIAS, Sávia Francisca Lopes et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. *Carbohydrate Polymers*, v. 143, p. 254–261, jun. 2016.
- FADUS, Matthew C. et al. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 7, n. 3, p. 339–346, jul. 2017a.
- FADUS, Matthew C. et al. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 7, n. 3, p. 339–346, jul. 2017b.
- GRANT, Ryan W.; STEPHENS, Jacqueline M. Fat in flames: influence of cytokines and pattern recognition receptors on adipocyte lipolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 309, n. 3, p. E205–E213, 1 ago. 2015.
- GUO, Qiuyun et al. PEGylated Serp-1 Markedly Reduces Pristane-Induced Experimental Diffuse Alveolar Hemorrhage, Altering uPAR Distribution, and Macrophage Invasion. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 8, p. 633212, 16 fev. 2021.
- HIMBERT, Caroline et al. Signals from the Adipose Microenvironment and the Obesity–Cancer Link—A Systematic Review. *Cancer Prevention Research*, v. 10, n. 9, p. 494–506, 1 set. 2017.
- HUANG, Lan; XU, Huaxi; PENG, Guangyong. TLR-mediated metabolic reprogramming in the tumor microenvironment: potential novel strategies for cancer immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 15, n. 5, p. 428–437, maio 2018.
- LAU, Tat San et al. Paclitaxel Induces Immunogenic Cell Death in Ovarian Cancer via TLR4/IKK2/SNARE-Dependent Exocytosis. *Cancer Immunology Research*, v. 8, n. 8, p. 1099–1111, 1 ago. 2020.
- LENGYEL, Ernst et al. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends in Cancer*, v. 4, n. 5, p. 374–384, maio 2018.
- LI, Feie et al. Curcumin induces p53-independent necrosis in H1299 cells via a mitochondria-associated pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 12, n. 5, p. 7806–7814, nov. 2015.

LIU, Zhou et al. Lipid-associated macrophages in the tumor-adipose microenvironment facilitate breast cancer progression. *OncolImmunology*, v. 11, n. 1, p. 2085432, 31 dez. 2022.

LUO, Liping; LIU, Meilian. Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, v. 231, n. 3, p. R77–R99, dez. 2016.

LV, Bingzhe et al. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 844142, 6 jul. 2022.

POULAIN-GODEFROY, Odile et al. Inflammatory Role of Toll-Like Receptors in Human and Murine Adipose Tissue. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, p. 1–9, 2010.

RITTER, Andreas et al. Cancer-educated mammary adipose tissue-derived stromal/stem cells in obesity and breast cancer: spatial regulation and function. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 42, n. 1, p. 35, 30 jan. 2023.

RODELL, Christopher B. et al. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nature Biomedical Engineering*, v. 2, n. 8, p. 578–588, 21 maio 2018.

ROSHANDEL, Gholamreza; GHASEMI-KEBRIA, Fatemeh; MALEKZADEH, Reza. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers*, v. 16, n. 8, p. 1530, 17 abr. 2024.

SAHA, Achinto; KOLONIN, Mikhail G.; DIGIOVANNI, John. Obesity and prostate cancer — microenvironmental roles of adipose tissue. *Nature Reviews Urology*, v. 20, n. 10, p. 579–596, out. 2023.

SAWICKI, Tomasz et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, v. 13, n. 9, p. 2025, 22 abr. 2021.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 671-675, jul. 2012.

Souza SVP, Aguiar ACV, Albuquerque ECS, Eich C, Cruz LJ, Lara P, Jorquera-Cordero C, Gomes RF, Paula RCM, Freire RS, de Araújo Júnior AJRF. M1 Macrophage Extracellular Vesicles and TLR3 Agonist Nanoparticles Down-Regulate Immunosuppression and Metastasis via AKT/TAM in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Carcinog*. 2025 Sep;64(9):1450-1461. doi: 10.1002/mc.70003. Epub 2025 Jun 24. PMID: 40553053; PMCID: PMC12370002.

SU, Zhenyi et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, v. 14, n. 1, p. 48, dez. 2015.

SUN, Kai; LI, Xin; SCHERER, Philipp E. Extracellular Matrix (ECM) and Fibrosis in Adipose Tissue: Overview and Perspectives. In: PRAKASH, Y. S. (Org.). *Comprehensive Physiology*. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2023. p. 4387–4407.

UNGVARI, Zoltan et al. Overweight and obesity significantly increase colorectal cancer risk: a meta-analysis of 66 studies revealing a 25–57% elevation in risk. *GeroScience*, v. 47, n. 3, p. 3343–3364, 8 out. 2024.

VAN ELSAS, Marit J. et al. Immunotherapy-activated T cells recruit and skew late-stage activated M1-like macrophages that are critical for therapeutic efficacy. *Cancer Cell*, v. 42, n. 6, p. 1032- 1050.e10, jun. 2024.

WANG, Weihua et al. Targeting adipocyte–immune cell crosstalk to control breast cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 149, n. 10, p. 7969–7979, ago. 2023.

WU, Liang-Yi et al. Curcumin Attenuates Adipogenesis by Inducing Preadipocyte Apoptosis and Inhibiting Adipocyte Differentiation. *Nutrients*, v. 11, n. 10, p. 2307, 28 set. 2019.

ZENG, Qin; JEWELL, Christopher M. Directing toll-like receptor signaling in macrophages to enhance tumor immunotherapy. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 60, p. 138–145, dez. 2019.

Anexos

Figura 1 - Tecido adiposo

Figura 2 - Necrose

Figura 3 - Fibrose

Figura 4 - Infiltrado Inflamatório

CÓDIGO: SB1176

AUTOR: GIOVANA AZEVEDO BRAGA

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: Análise fenotípica de pacientes com Síndrome de Ehlers-Danlos em Natal/RN

Resumo

A síndrome de Ehlers-Danlos é uma doença genética rara caracterizada pela tríade: hiper mobilidade articular, instabilidade das articulações e hiperextensibilidade da pele. Atualmente, conforme o critério de diagnóstico do ano de 2017, 13 subtipos foram oficializados e mais de 20 genes associados a síndrome, contudo, novos subtipos e variantes patogênicas estão sendo avaliados e, no ano de 2026, visa-se o desenvolvimento de um novo critério internacional para o diagnóstico da síndrome.

Apesar de ser todos os 13 subtipos serem classificados como raros, discussões sobre esse assunto são frequentes, principalmente quanto ao subtipo Hiper móvel, o qual é o subtipo mais frequente na população e não apresenta diagnóstico molecular. A principal tese apresentada é que a síndrome apresenta alta taxa de subnotificação, existindo, na população, mais pacientes sem o diagnóstico do que com o diagnóstico. Interferindo na elaboração da epidemiologia da doença e na execução de políticas públicas que ajudem os pacientes. Nosso estudo propôs a avaliação do fenótipo de 3 pacientes com a síndrome que residem na capital do Rio Grande do Norte, Natal. Ambas apresentavam sintomas típicos de seus subtipos, sendo 1 paciente com o diagnóstico de SED vascular e outras 2 pacientes com SED hiper móvel. Além dos sintomas e sinais da síndrome, também promovemos a escuta ativa de suas experiências, nos levando a observar a repetição de padrões descritos em artigos científicos sobre o tópico.

Palavras-chave: Doenças raras. Síndrome de Ehlers-Danlos. Doença crônica

TITLE: Phenotypic analysis of patients with Ehlers-Danlos Syndrome in Natal/RN

Abstract

Ehlers-Danlos syndrome (EDS) is a rare genetic disorder characterized by the triad of joint hypermobility, joint instability, and skin hyperextensibility. Currently, according to the 2017 diagnostic criteria, 13 subtypes have been officially identified and more than 20 genes have been associated with the syndrome. However, new subtypes and pathogenic variants are being evaluated, and the goal is to develop new international diagnostic criteria for the syndrome by 2026.

Although all 13 subtypes are classified as rare, discussions on this topic are frequent, particularly regarding the Hypermobility subtype, which is the most common

subtype in the population and lacks a molecular diagnosis. The main thesis presented is that the syndrome has a high rate of underreporting, with more undiagnosed patients than diagnosed patients in the population. This impacts the development of the disease's epidemiology and the implementation of public policies to help patients.

Our study proposed evaluating the phenotype of three patients with the syndrome residing in Natal, the capital of Rio Grande do Norte. Both presented symptoms typical of their subtypes: one patient diagnosed with vascular EDS and the other two with hypermobile EDS. In addition to the symptoms and signs of the syndrome, we also actively listened to their experiences, leading us to observe the repetition of patterns described in scientific articles on the topic.

Keywords: Rare diseases. Ehlers-Danlos Syndrome. Chronic illness

Introdução

Popularmente conhecida como síndrome do homem-elástico, a Síndrome de Ehlers-Danlos (SED) é uma condição rara e complexa, caracterizada por ampla diversidade de sintomas e por múltiplas variantes patogênicas já datadas. Mais de 20 genes já foram associados à doença, envolvendo tanto a codificação do colágeno, principal proteína estrutural do tecido conjuntivo, quanto de enzimas e outras proteínas essenciais para a integridade da matriz extracelular. As primeiras descrições clínicas da síndrome foram publicadas oficialmente no início do século XX pelos dermatologistas Edvard Ehlers e Henri-Alexandre Danlos. Posteriormente, o nome Síndrome de Ehlers-Danlos foi proposto por Frederick Park-Weber, em reconhecimento aos primeiros relatos formais da condição (MALFAIT et al., 2020). Trata-se de um grupo altamente heterogêneo de transtornos genéticos que comprometem a produção e a manutenção do tecido conjuntivo. Embora o colágeno seja a proteína mais frequentemente afetada, outras proteínas e enzimas também podem apresentar alterações estruturais ou funcionais, como acima destacado, contribuindo para a variabilidade clínica observada nos pacientes.

Baseado na classificação internacional, publicada em 2017 (MALFAIT et al., 2017), atualmente existem 13 subtipos da síndrome, os quais são: Clássico; Tipo-Clássico; Cardíaca-valvar; Vascular; Hipermóvel; Artrocalásia; Dermatoparaxis; Cifoesciolítica, Síndrome da Córnea Frágil; Espondilodisplásica; Musculocontratural; Miopática e Periodontal; contudo, um décimo quarto subtipo, chamado SED Tipo-Clássico II, foi descrito logo após a classificação internacional e será, provavelmente incluído em novos consensos. Dentre esses subtipos, ocorrem diferentes prevalências, sendo o subtipo mais comum, o Hipermóvel, com uma ocorrência de 1 caso a cada 5000 pessoas. Já outros subtipos são classificados como ultra-raros, podendo suas prevalências chegarem a 1 caso a cada 1 milhão de pessoas, contudo, pela subnotificação dos casos, os dados epidemiológicos não indicam a real prevalência de cada subtipo (MALFAIT et al., 2020).

Como descrito acima, um grande espectro de variantes patogênicas pode levar ao desenvolvimento da síndrome, contudo, alguns sintomas e sinais são comumente

observados entre os subtipos, como a presença da hipermobilidade articular, com uma maior propensão a instabilidade articular, causando luxações e deslocamentos das articulações; pele frágil, com textura aveludada e com hiperextensibilidade; fragilidade geral de tecidos, com facilidade a lesões e má estruturação de órgãos, levando a um maior risco de rupturas e prolapsos. Ademais, é comum o diagnóstico de comorbidades nos pacientes com SED, principalmente no subtipo hipermóvel, sendo os principais transtornos associados a Síndrome da taquicardia ortostática postural (POTS), um tipo de Disautonomia, o qual é um grupo de distúrbios do sistema nervoso autônomo; Síndrome da ativação mastocitária (SAM); Transtorno do espectro autista e Síndrome de Chiari (RILEY, 2020b).

Metodologia

Para a execução do trabalho, foi primeiramente realizada uma revisão de literatura, com objetivo de compreender melhor o tópico de interesse. Para isso, durante todo o período do projeto, foram realizadas pesquisas no banco de dados “Pubmed”, contudo também foram analisados artigos e publicações encontrados por recomendações de associação de artigos filtrados pelas palavras-chave, as quais foram “ehlers-danlossyndrome” e “hypermobilitysyndrome”. Como critérios de inclusão, foram incluídos artigos que, como população, estão pacientes com diagnóstico de SED, sendo analisados artigos de ensaios clínicos randomizados, estudos observacionais e revisões sistemáticas, nos idiomas português e inglês, com data de publicação entre 2014 e 2025. Os artigos que foram então selecionados por essa análise inicial, passaram por uma segunda análise, a qual constou em análise das temáticas dos artigos, buscando identificar e excluir aqueles que não se enquadram com os objetivos dessa etapa inicial, por fim, as publicações que se adequam a todas essas características foram lidas na íntegra para a confirmação da elegibilidade do material. A demais, após essa etapa, e com auxílio do projeto de extensão “AÇÕES DE SAÚDE PARA PESSOAS COM A SÍNDROME DE EHLERS-DANLOS (SED): UMA DOENÇA SUBDIAGNOSTICADA NO BRASIL”, o qual buscou a divulgação científica da síndrome por meio da criação da conta no Instagram “@ehlersdanlos.ufrn”, pacientes com o diagnóstico da síndrome na cidade de Natal, capital do Rio Grande do Norte, foram convocados para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e então incluídos na pesquisa.

Após a assinatura do TCLE, os pacientes foram então solicitados a doar 1 tubo de sangue, coletado durante a avaliação, para que o material genético contido na amostra possa ser extraído e assim futuramente analisado, buscando a melhor compreensão genética da síndrome. Mediante a autorização do paciente, a coleta seguiu o seguinte protocolo: a) Organização do material que foi usado na coleta e identificação do tubo com o número correspondente ao paciente; b) Acomodação do paciente de forma confortável, com o braço esticado e apoiado em uma superfície plana; c) Os equipamentos de proteção individual (EPIs) foram vestidos; d) Foi realizada a antisepsia do local da punção utilizando álcool 70% e um algodão; e) foi aplicado o torniquete acima do lugar de punção; f) Foi realizada a coleta do sangue utilizando uma seringa e um tubo; Seguida a etapa de coleta, as amostras

foram processadas, por meio da centrifugação da amostra a 6000g por 15 minutos, para a obtenção do precipitado

Por fim, foi realizada a extração do DNA das amostras utilizando o protocolo do fabricante do kit QIAamp DNA mini. Do precipitado da amostra foi pipetado uma amostra de 200 µL para um eppendorf de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K previamente pipetada. Em seguida, 200 µL de tampão AL foram adicionados ao tubo e colocados no vórtex por 15s. Após essa etapa, a mistura foi posta em um banho seco a 56 graus Celsius por 10 minutos, sendo o tudo posteriormente posto no spin por 10 segundos para remover quaisquer gotas da borda dele. Foi adicionado 200 µL de etanol PA (96% a 100%) à amostra, e então agitado no vórtex por 15 segundos e no spin por 5 segundos. O volume total, de 650 µL, foi transferido para outro eppendorf contendo um filtro, após isso, o tubo foi centrifugado a 6000 g durante 1 minuto. Em seguida, o filtro foi novamente transferido para outro tubo, descartando o excesso de conteúdo do tubo anterior e pipetando 500 µL de Buffer AW1 para o novo tubo, seguido de uma nova centrifugação a 6.000 g por 1 min. O processo será repetido, transferindo o filtro para outro tubo, descartando o excesso de conteúdo do tubo anterior e a pipetagem de 500 µL de Buffer AW2, seguido de centrifugação a 20.000 g ou 14.000 rpm por 3 min. Após isso, o filtro foi novamente colocado em um novo tubo, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, o filtro será colocado em um novo eppendorf de 1,5 mL pré-identificado pelo número do paciente e teve a adição de 50 µL de Tampão AE. Para finalizar, o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugado a 6.000 g por 1 minuto e, por fim, o filtro foi descartado e o conteúdo de DNA armazenado no freezer -80° C do Instituto de Medicina Tropical – IMT da UFRN.

Com o objetivo de coletar informações cruciais para a avaliação fenotípica dos pacientes e a observação da epidemiologia da síndrome no Rio Grande do Norte, os pacientes tiveram que responder perguntas voltadas para os seus processos de diagnóstico, subtipo diagnosticado, se o diagnóstico foi clínico ou genético, quanto tempo demorou para o diagnóstico acontecer e qual subespecialidade médica o realizou; quais os sintomas apresentados e o score de Beighton; e o seu local de nascimento (imagem do questionário utilizado em anexo).

Resultados e Discussões

Com base na metodologia proposta para a execução do trabalho, foram encontrados 191 artigos em potencial, os quais foram lidos em íntegra, em seguida selecionados conforme os critérios descritos acima (Metodologia) e por fim suas contribuições desenvolvidas a seguir. A princípio, será discutido sobre a genética e os fenótipos encontrados na SED. A SED compreende um grupo heterogêneo de transtornos genéticos raros que afetam a produção e manutenção do tecido conjuntivo, por conta de alterações estruturais no colágeno, em enzimas ou em outras proteínas da matriz extracelular. Atualmente, a síndrome é classificada em 13 subtipos, cada qual associado a genes específicos: o Clássico, relacionado aos genes COL5A1, COL5A2 e COL1A1; o Vascular, associado a COL3A1 e COL1A1; o Artrocalásia, envolvendo COL1A1 e COL1A2; o Dermatoparaxis, ligado a ADAMTS2; o Cardíaco-Valvar, relacionado a COL1A2 e FLNA; o Cifoesciolítico,

associado a PLOD1 e FKBP14; o Tipo-Clássico, vinculado a TNXB; o Miopático, ligado a COL12A1; o Periodontal, relacionado a C1R e C1S; o Musculocontratual, associado a DSE e CHST14; a Síndrome da Córnea Frágil, relacionada a ZNF469 e PRDM5; e o Espondilodisplásico, vinculado a B4GALT7, B3GALT6 e SLC39A13 (MALFAIT et al., 2017).

Já o subtipo Hipermóvel, o mais prevalente, permanece sem um gene causal conhecido, contudo, em casos familiares pontuais, variantes patogênicas já foram associadas aos sintomas. Além desses, recentemente, foi descrito um novo subtipo provisório, denominado Tipo-Clássico II, associado ao gene AEBP1 (MALFAIT et al., 2020). Essa diversidade demonstra que, embora o mapeamento genético tenha avançado, o genótipo da SED ainda não está completamente elucidado, havendo casos em que diferentes variantes produzem fenótipos típicos da síndrome.

Apesar da variabilidade genética, os subtipos compartilham três características principais: hipermobilidade articular, fragilidade tecidual e pele hiperextensível (RITELLI; COLOMBI, 2020). A partir desse núcleo clínico, cada subtipo se diferencia pela gravidade e pelas manifestações adicionais. No subtipo hipermóvel, por exemplo, observa-se ampla diversidade fenotípica: além das manifestações articulares, há distúrbios gastrointestinais severos, como refluxo, gastrite, gastroparesia e dismotilidade intestinal (RITELLI; COLOMBI, 2020), dor crônica com forte associação à hipermobilidade e sobreposição à fibromialgia (ALSIRI et al., 2023), além de instabilidade crânio-cervical. Estudos de imagem sugerem que a dor não se correlaciona apenas a lesões estruturais, mas também à frouxidão ligamentar e alterações biodinâmicas articulares, o que ajuda a explicar o caráter persistente e difuso desse sintoma. Já o subtipo vascular representa um dos quadros mais graves, pois está associado a risco elevado de aneurismas, rupturas arteriais, prolapsos e dissecções espontâneas, incluindo artérias cervicais (ADHAM et al., 2021) e renais (ADHAM et al., 2021). Mulheres com SED vascular apresentam risco ainda maior durante a gestação, devido ao estresse hemodinâmico do parto (HAEM et al., 2024). Além disso, procedimentos invasivos, como colonoscopias ou intervenções neurovasculares, podem gerar complicações graves, incluindo perfurações e hemorragias, devido à extrema fragilidade dos tecidos. Por essa razão, esse subtipo exige cuidados específicos em exames e cirurgias (SPEAKE et al., 2020), (EL MASRI et al., 2018) (D'HONDT; VAN DAMME; MALFAIT, 2018) (SHABANI et al., 2023). Por fim, entre os subtipos ultra-raros, destaca-se o Artrocalásia, com menos de 50 casos descritos mundialmente. Causado por variantes nos genes COL1A1 ou COL1A2, leva a luxações congênitas, hipermobilidade articular severa, subluxações recorrentes, hipotonia muscular e alterações craniofaciais, como micrognatia e hipertelorismo (MARTÍN-MARTÍN et al., 2022).

O impacto psicológico da SED é cada vez mais reconhecido como um componente central da condição, influenciando de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes e a perspectiva de melhora dos pacientes (CLARK et al., 2024; KENNEDY et al., 2022). Se, por um lado, a síndrome é conhecida pelas manifestações físicas, por outro, os efeitos emocionais e psicossociais representam um desafio igualmente debilitante, que muitas vezes recebe menos atenção no manejo clínico. Estudos de revisão sistemática, como o conduzido por Clark et al. (2024), demonstram que pacientes com SED apresentam uma elevada prevalência de ansiedade, depressão,

estresse crônico e até transtornos do espectro pós-traumático. Essa vulnerabilidade emocional está relacionada a múltiplos fatores. Primeiramente, destaca-se o atraso no diagnóstico, que em muitos casos ultrapassa uma década, levando os pacientes a anos de incerteza, peregrinação por diferentes especialidades médicas e sensação de desamparo diante de sintomas inexplicados. Essa demora compromete a confiança no sistema de saúde e gera sentimento de frustração, desesperança e perda do senso de controle sobre a própria vida.

Outro fator importante é o convívio constante com a dor crônica, a qual é frequentemente incapacitante. Pesquisas mostram que a dor persistente, além de limitar atividades cotidianas e reduzir a autonomia, está fortemente associada à baixa qualidade de vida, insônia, isolamento social e maior risco de desenvolver transtornos depressivos. Em muitos casos, a intensidade da dor relatada não corresponde à gravidade dos achados em exames de imagem, o que leva pacientes a se sentirem incompreendidos ou até mesmo desacreditados por profissionais de saúde e familiares, agravando o sofrimento emocional.

A imprevisibilidade da condição também contribui para altos níveis de ansiedade. Como a síndrome apresenta flutuações diárias nos sintomas — especialmente na dor, fadiga e instabilidade articular — muitos pacientes vivem em estado de alerta constante, preocupados com novas lesões, quedas ou complicações graves, como no caso do subtipo vascular. Esse estado de hipervigilância perpetua um ciclo de ansiedade que interfere no sono, no apetite e na vida social. Do ponto de vista social, a SED também impõe limitações significativas. Pacientes frequentemente relatam abandono de esportes, hobbies, estudos ou trabalhos em função da dor e da fadiga, o que pode gerar sensação de perda de identidade e autoestima rebaixada. Esse afastamento social, somado à incompreensão de colegas, familiares e até de profissionais da saúde, favorece o isolamento e a solidão, elementos sabidamente associados à piora da saúde mental.

Um aspecto frequentemente relatado em estudos qualitativos é a vivência de luto, não pela morte, mas pela perda da identidade anterior, de planos de vida e da sensação de um futuro previsível. Essa experiência de luto crônico pode se manifestar como tristeza persistente, resignação ou até revolta, o que amplia o risco de depressão clínica. Frente a esse cenário, diversas pesquisas investigam intervenções psicológicas específicas para pacientes com SED. Entre as estratégias mais promissoras está a Terapia Cognitivo-Comportamental (TCC), que auxilia o paciente a identificar padrões de pensamento disfuncionais relacionados à dor, ao medo e à incapacidade, propondo novas formas de enfrentamento. Estudos mostram que a TCC não apenas reduz sintomas de ansiedade e depressão, mas também diminui a percepção da dor e melhora a funcionalidade, reforçando a importância de abordagens integradas. Outras intervenções, como terapia ocupacional, manejo de estresse, programas de habilidades de enfrentamento e mindfulness, também apresentam benefícios, especialmente quando adaptadas à faixa etária e ao contexto social do paciente.

Em crianças e adolescentes, a atenção ao aspecto psicológico é ainda mais crítica. Nessa faixa etária, os sintomas podem comprometer a socialização escolar, o desenvolvimento emocional e o senso de pertencimento. Abordagens terapêuticas adaptadas, que envolvam também a família e a escola, são fundamentais para

evitar impactos de longo prazo no desenvolvimento psíquico e na qualidade de vida. Assim, o impacto psicológico da SED não pode ser considerado apenas uma consequência secundária dos sintomas físicos, mas sim uma dimensão central da síndrome, que deve ser abordada de forma ativa pelos profissionais de saúde. O cuidado psicológico precoce, aliado ao manejo multidisciplinar, contribui não apenas para a melhora da saúde mental, mas também para a redução da dor, do sofrimento e do isolamento social. Reconhecer e tratar os aspectos emocionais da síndrome é, portanto, um passo essencial para garantir um cuidado integral e humanizado aos pacientes

No que diz respeito ao manejo clínico, embora não exista cura, diversas abordagens terapêuticas podem melhorar os sintomas. A fisioterapia permanece como a intervenção conservadora mais utilizada, voltada para o fortalecimento e estabilização articular. Estudos demonstram benefícios também de exercícios neurocognitivos, que ajudam a modificar a percepção da dor, e de estimulação sensorial rítmica, que reduz a percepção dolorosa por meio de estímulos auditivos e somatossensoriais. Além disso, em alguns casos, a aplicação de dextrose a 10% em articulações específicas mostrou bons resultados na redução da hipermobilidade localizada, como na articulação temporomandibular.

Com base no descrito acima, por meio das redes sociais, 3 pacientes, moradoras da cidade de Natal, Rio Grande do Norte (RN), foram identificadas e tiveram os seus respectivos TCLEs assinados. A primeira paciente, 01, recebida no nosso laboratório, Laboratório de Genética e Metabolismo - LabGeM, no dia 26/05/2025, recebeu o diagnóstico de SED Vascular após avaliação clínica e genética, com a variante patogênica C547G>A p.(Gly183Ser) no gene COL3A1. A paciente apresentou um score 8, sem hiper inclinação frontal, na escala de Beighton, com histórico de aneurismas diversos, motivo pelo qual foi levantada a hipótese da síndrome, fadiga crônica, pele fina, transparente e com elasticidade, possui retração de gengiva e possui hematomas frequentes e espontâneos, todos sintomas presentes no critério de diagnóstico do ano de 2017. Além disso, relata tratamento psiquiátrico e psicoterapêutico para ansiedade generalizada.

Nossa segunda paciente, 02, teve o TCLE assinado e avaliação fenotípica realizados no dia 20/06/2025. Seu diagnóstico de SED hipermóvel, ocorreu em 2024, mais de 50 anos após seu nascimento. Nesse caso, a paciente estava no aguardo do laudo referente ao exoma realizado anteriormente à convocação da pesquisa, contudo, já possuía o laudo do subtipo hipermóvel. Apesar da paciente apresentar um score atual de 2, apenas dorsiflexão do dedo mínimo esquerdo e extensão excessiva do cotovelo direito, na escala de Beighton, ela destaca um histórico de hipermobilidade articular. Além disso, relata dor crônica, hematomas frequentes, histórico de derrames articulares, fraturas espontâneas, lesões articulares, retração gengival, enxaqueca e distúrbios de sono. Por fim, apresenta, como comorbidade, hipotireoidismo (condição na qual a glândula tireoide não produz a quantidade suficiente de hormônio da tireoide), fibromialgia (doença crônica caracterizada por dor generalizada, fadiga e transtornos de sono), lipedema (condição crônica e inflamatória que causa um acúmulo excessivo e desproporcional de gordura em partes do corpo, como pernas), depressão (transtorno de humor caracterizado pelo estado de tristeza constante), endometriose (crescimento de tecido semelhante ao endométrio (o revestimento interno do útero)

em locais fora do útero), arterite (inflamação nas células da parede arterial), entesófito (calcificação óssea que se forma na junção entre um tendão/ligamento e um osso) e um tumor cerebral benigno.

A paciente de código 03, teve o TCLE assinado e avaliação fenotípica realizados no dia 07/07/2025. Seu diagnóstico de SED hipermóvel também ocorreu já na vida adulta, onde foi observado um score 7, dorsiflexão do dedo mínimo esquerdo, oposição dos polegares, extensão excessiva dos cotovelos e extensão excessiva dos joelhos, na escala de Beighton, pele hiperextensíveis e aveludado, pápulas piezogênicas bilaterais nos calcanhares, estrabismo, escoliose, cifose, genu valgo e hipotensão. Além disso, a paciente relata cistites de repetição, cálculos renais, labirintite, hipotireoidismo de Hashimoto, depressão, transtorno de atenção e hiperatividade (TDAH), SAM, endometriose, trombose ocular, desvio de septo, retração gengival, má oclusão e agenesia dentária. A paciente realizou um sequenciamento completo do exoma e DNA mitocondrial para o descarte do subtipo vascular da síndrome, contudo não foram identificadas variantes patogênicas/provavelmente patogênicas que possam explicar o quadro clínico.

Conforme descrito acima e o critério de diagnóstico do ano de 2017 (MALFAIT et al., 2017), pacientes com SED vascular apresentam um alto risco de desenvolvimento de aneurismas e outras lesões vasculares. Nossa paciente 01 apresenta aneurismas nos braços e pernas, já tendo realizado tratamentos cirúrgicos para alguns deles. Apesar do critério de diagnóstico destacar que a condição apresenta um padrão de herança autossômico dominante, apenas uma antepassada da paciente apresenta sintomatologia da síndrome, tendo morrido em idade jovem, contudo, pelas limitações da época, o diagnóstico não foi realizado. Os pais da paciente, apesar de vivos, não foram testados para a variante da paciente. Já nos casos dos pacientes com SED hipermóvel, observa-se a grande variedade de sintomas e de outros diagnósticos presentes nas pacientes. As informações relatadas pelas pacientes são insuficientes para compararmos com o critério vigente, contudo, o laudo médico foi utilizado como base para a inclusão das pacientes na pesquisa.

Todos os achados clínicos das pacientes do estudo, tirando os diagnósticos de tumor cerebral benigno, entesófitos e hipotireoidismo, apesar de que já foi observado o desenvolvimento de doenças autoimunes, como o Hipotireoidismo de Hashimoto, em pacientes com SED, já estão incluídos no critério diagnóstico da síndrome de 2017 ou já foram amplamente associados à síndrome na literatura, nos indicando que apesar da pluralidade da síndrome, diversos sintomas em comum podem ser encontrados em intensidades diferentes, promovendo um espectro, como estudiosos da área já demonstram. O alvo da avaliação dos sintomas não incluiu relato dos sintomas e diagnósticos do trato gastrointestinal, já que a avaliação desses sintomas e como a nutrição pode reduzi-los é conduzida por outra aluna de iniciação científica do laboratório.

Apesar de um dos objetivos do trabalho ser compreender melhor a epidemiologia da síndrome na capital, os dados coletados foram insuficientes para o desenvolvimento de conclusões já que somente 1 das pacientes é nascida na capital, enquanto outras 2, apesar de morarem na cidade a muitos anos e, portanto, sofrendo com a falta de conhecimento público sobre a condição, não nasceram no estado.

Conclusão

Com base nos resultados e na discussão proposta acima, pode-se concluir que a SED é um transtorno genético com alto grau de complexidade genotípica e fenotípica, com uma vasta descrição de sintomas e sinais em diferentes órgãos, os quais, durante a maioria da vida do paciente são rotulados como “normais” tanto por familiares quanto por profissionais da área da saúde, colaborando para um atraso no diagnóstico e piora dos próprios sintomas, levando a uma piora significativa da qualidade de vida do indivíduo.

Os pacientes do Rio Grande do Norte incluídos na pesquisa apresentam sintomas típicos de seus diagnósticos e que só foram corretamente nomeados como sintomas de uma síndrome genética já na vida adulta. Outro ponto importante são os relatos sobre falta de tratamento e de profissionais que possam auxiliar no diagnóstico de comorbidades e no tratamento, tópico esse de extrema importância já que o acompanhamento contínuo multidisciplinar, ex. médicos de várias especialidades, fisioterapeuta, fonoaudiólogo, nutricionista etc, é de extrema importância, sendo, até o momento, a única forma de “tratamento” para a síndrome.

Sendo assim, é de extrema importância que o estudo realizado pela nossa equipe laboratorial continue, alcançando novos pacientes, tanto no RN, quanto em outros estados no Brasil. por meio do projeto online “@ehlersdanlos.ufrn” e alterações no processo de filtragem e seleção de pacientes, proporcionando a eles conhecimento de qualidade sobre a SED e outras comorbidades associadas à síndrome, além de proporcionar o aumento do nosso grupo amostral, levando a avaliações mais coerentes com a população e sem desvio. Contudo, novos estudos clínicos devem ser estimulados para que novos grupos de pacientes possam ser triados e novos fenótipos e genótipos identificados, refinando os critérios de diagnóstico já existentes.

Referências

MALFAIT, F. et al. The Ehlers–Danlossyndromes. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 6, n. 1, 2020.

MALFAIT, F. et al. The 2017 international classification of the Ehlers–Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, v. 175, n. 1, 2017.

RILEY, B. The many facets of hypermobile ehlers-danlos syndrome. *Journal of the American Osteopathic Association*, v. 120, n. 1, p. 30–32, 2020b.

RITELLI, M.; COLOMBI, M. Molecular genetics and pathogenesis of ehlers–danlos syndrome and related connective tissue disorders. *GenesMDPI AG*, , 1 maio 2020.

ALSIRI, N. et al. The concomitant diagnosis of fibromyalgia and connective tissue disorders: A systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*, v. 58, 1 fev. 2023.

ADHAM, S. et al. Spontaneous Cervical Artery Dissection in Vascular Ehlers-Danlos Syndrome: A Cohort Study. *Stroke*, v. 52, n. 5, p. 1628–1635, 1 maio 2021.

HAEM, T. et al. Vascular Ehlers-Danlos syndrome and pregnancy: A systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2024.

SPEAKE, D. et al. Management of colonic complications of type IV Ehlers-Danlos syndrome: a systematic review and evidence-based management strategy. *Colorectal Disease*, v. 22, n. 2, p. 129–135, 1 fev. 2020.

EL MASRI, H. et al. Bowel perforation in type IV vascular Ehlers-Danlos syndrome. A systematic review. *Techniques in Coloproctology*, v. 22, n. 5, p. 333–341, 1 maio 2018.

D'HONDT, S.; VAN DAMME, T.; MALFAIT, F. Vascular phenotypes in nonvascular subtypes of the Ehlers-Danlos syndrome: a systematic review. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, v. 20, n. 6, p. 562–573, 1 jun. 2018.

SHABANI, M. et al. Vascular aneurysms in Ehlers-Danlos syndrome subtypes: A systematic review. *Clinical genetics*, v. 103, n. 3, p. 261–267, 1 mar. 2023.

MARTÍN-MARTÍN, M. et al. Ehlers-Danlos Syndrome Type Arthrochalasia: A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health*, v. 19, n. 3, 1 fev. 2022.

CLARK, N. L. et al. Psychological interventions to improve pain, fatigue, anxiety, depression, and quality of life in children and adults with hypermobility spectrum disorders and Ehlers-Danlos syndrome: a systematic review. *Rheumatology International*, v. 44, n. 1, p. 41–55, 1 jan. 2024.

KENNEDY, M. et al. The psychological burden associated with Ehlers-Danlos syndromes: a systematic review. *Journal of osteopathic medicine*, v. 122, n. 8, p. 381–392, 1 ago. 2022.

Anexos

Questionário aplicado nos pacientes com SED

CÓDIGO: SB1184

AUTOR: LUCA DE MELO MOLLIK

COAUTOR: ANA PAULA GARCIA DELGADO

COAUTOR: MARIA ELOISA GOMES TEIXEIRA PEIXOTO

COAUTOR: MARIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ANAMARIA DAL MOLIN

TÍTULO: PERFIS DE ENTOMOFAUNA DE VOO ATIVO EM ÁREA DE MATA ATLÂNTICA SUJEITA A INFLUÊNCIA URBANA NO RIO GRANDE DO NORTE

Resumo

Até hoje, foram catalogadas cerca de um milhão de espécies de insetos, correspondendo a cerca de 70% de todas as espécies de animais e 52% de todas as espécies catalogadas no planeta. Dessa forma, estudos acerca da sua biologia, diversidade e distribuição são de fundamental importância. Atualmente já se discute sobre as evidências do efeito negativo que a ação antrópica tem sobre as populações de insetos. Assim, como insetos realizam muitos serviços essenciais e são vitais aos ecossistemas, é fundamental monitorar continuamente as populações a fim de determinar quando e onde essas comunidades estão em declínio. As armadilhas de interceptação de voo do tipo Malaise são expressivamente eficazes em termos de captura, por permitirem a coleta de uma grande variedade de espécies e reduzirem erros na captura ao realizarem a amostragem passiva de insetos voadores. Dessa forma, o presente trabalho representa uma contribuição para o levantamento da entomofauna do Rio Grande do Norte, com o levantamento a nível de ordem de insetos coletados a partir de armadilhas do tipo Malaise no Parque Estadual das Dunas de Natal.

Palavras-chave: Insetos. Mata Atlântica. Biodiversidade

TITLE: ACTIVE FLIGHT ENTOMAFUNA IN AN AREA OF ATLANTIC FOREST
SUBJECT TO URBAN INFLUENCE IN RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL

Abstract

To date, almost one million insect species have been cataloged, corresponding to approximately 70% of all animal species and 52% of all cataloged species on the planet. Therefore, studies on their biology, diversity, and distribution are of fundamental importance. Evidence of the negative effects of human activity on insect populations is currently under discussion. Since insects perform many essential services and are vital to ecosystems, continuous monitoring of populations is crucial to determine when and where these communities are declining. Malaise-type flight interception traps are highly effective in terms of capture, allowing the collection of a wide variety of species and reducing capture errors by passively sampling flying insects. Thus, this work represents a contribution to the survey of the entomofauna of Rio Grande do Norte, with an order-level survey of insects collected from Malaise traps in the Natal Dunas State Park.

Keywords: Insects. Atlantic Forest. Biodiversity

Introdução

Sabe-se que os insetos representam um dos grupos de maior abundância e diversidade de animais terrestres, desempenhando diversas funções ecológicas, como polinização, decomposição, predação, entre outros. Entretanto, a crescente quantidade de evidências do declínio das populações de insetos no mundo levanta questões sobre o impacto desse fenômeno nos ecossistemas (CARDOSO, et al., 2020; WAGNER, 2020; WAGNER, et al. 2021). Em comparação com vertebrados, uma fração menor dos insetos é conhecida e estudada, e para a maioria das mais de um milhão de espécies já descritas, não se sabe essencialmente nada sobre a sua biologia, distribuição ou abundância (GOULSON, 2019). Até hoje, foram catalogadas cerca de um milhão de espécies de insetos, correspondendo a cerca de 70% de todas as espécies de animais e 52% de todas as espécies catalogadas no planeta (RAFAEL, et al., 2024). Dessa forma, estudos acerca da sua biologia, diversidade e distribuição são de fundamental importância.

Atualmente já se discute sobre as evidências do efeito negativo que a ação antrópica tem sobre as populações de insetos (THOMAZINI, et al., 2002), bem como a destruição de importantes ecossistemas como a Mata Atlântica, que se restringe a apenas 7% do seu tamanho original (SCORIZA & PIÑA-RODRIGUES, 2014) e carece de estudos acerca da entomofauna presente. Como insetos realizam muitos serviços essenciais e são vitais aos ecossistemas, é fundamental monitorar continuamente as populações a fim de determinar quando e onde essas comunidades estão em declínio (UHLER, et al., 2022). Nesse contexto, o projeto Lifeplan, ao qual este trabalho se vincula, busca criar a primeira base de dados global com ampla cobertura, tanto espacial como temporal, para medir a influência de processos locais e regionais ligados à urbanização nos padrões de abundância e diversidade em escala planetária.

Dada a grande diversidade e número de espécies existentes de insetos, são necessários diferentes métodos de coleta, visto que cada grupo possui exigências próprias, tanto para ser coletado quanto para ser armazenado (CAMARGO, et al., 2015). No entanto, é tido que armadilhas de interceptação de voo tornaram-se uma das ferramentas mais importantes em termos de captura por permitirem a coleta de uma grande variedade de espécies e reduzirem erros na captura ao realizar a amostragem passiva de insetos tanto durante o dia quanto durante a noite. Nesse sentido, armadilhas Malaise são expressivamente eficazes em estudos que buscam obter um panorama significativo das comunidades locais de insetos e são práticas para o monitoramento em longo prazo por exigirem pouca manutenção (UHLER, et al., 2022).

Apesar do crescente histórico de pesquisas, dados do Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil indicam que a entomofauna do Rio Grande do Norte ainda é pouco documentada, contando com apenas 735 registros formais de espécies de insetos, em comparação com cerca de 9882 para a região Nordeste e 91153 para o Brasil (CTFB - <http://fauna.jbrj.gov.br>). Nota-se, então, que o estado ainda carece de estudos como este, que constitui um dos primeiros levantamentos abrangentes da entomofauna geral de voo ativo do Parque Estadual das Dunas de Natal.

Dessa forma, o presente trabalho representa uma contribuição para o levantamento da entomofauna do Rio Grande do Norte, especificamente em áreas de Mata Atlântica sujeitas a

diferentes níveis de influência urbana, com o levantamento a nível de ordem de insetos coletados a partir de armadilhas do tipo Malaise no Parque Estadual das Dunas de Natal.

Metodologia

A análise inclui amostras coletadas em um fragmento de Mata Atlântica inserido em área urbana, o Parque Estadual das Dunas da cidade de Natal (5°49'S, 35°11'W), localidade que se insere em área com clima Tropical tipo Aw (Koppen). Com um tempo de amostragem estendendo-se por doze meses, de janeiro a dezembro de 2023, as coletas ocorreram semanalmente, nos períodos em que correspondem às estações chuvosa e seca no Rio Grande do Norte.

Foram utilizadas armadilhas de interceptação de voo do tipo Malaise, que foram posicionadas com o frasco de álcool direcionado para direção norte e com a parte coletora em posição mais elevada do que a armadilha, conforme protocolo (Lifeplan, 2022). As armadilhas localizaram-se em áreas planas, cercadas por vegetação alta e uma grande quantidade de serrapilheira. Todo o material amostrado foi recolhido semanalmente em álcool etílico 95% e armazenado no laboratório sob refrigeração.

As amostras, após recolhidas passaram pelo processo de triagem, em que os espécimes coletados foram devidamente separados e classificados taxonomicamente a nível de Ordem, com base na classificação adotada por Rafael et al. (2024). Para tal, contou-se com o auxílio de um microscópio estereoscópico Motic SMZ. Após triagem, os espécimes foram transferidos para tubos de centrífuga tipo “falcon” e frascos eppendorf.

Os dados obtidos nas triagens foram planilhados com auxílio de programas como Google Sheets e Excel. Também foram plotados gráficos referentes à flutuação mensal do número de indivíduos por ordem, bem como a variação do número de indivíduos coletados por mês e a variação do número de indivíduos por ordem em relação ao número total. Além disso, foi calculada a média por coleta mensal ($mC = n_i/nC$), onde “ n_i ” representa o número de indivíduos coletados ao todo naquele mês e “ nC ” representa o número de coletas realizadas no respectivo mês.

Ao final da triagem, o material coletado será 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 47 coletas semanais no período correspondente ao ano de 2023, de janeiro a dezembro. Entretanto, a parcela das amostras que foram devidamente triadas e contabilizadas restringiu-se ao período de 03 de fevereiro de 2023 a 30 de junho de 2023, totalizando assim, 22 amostras de coleta.

Houve uma perda de material no que corresponde ao período de 28 de janeiro a 03 de fevereiro ocasionada por problemas durante o transporte e armazenamento da amostra. Dessa forma, foram consideradas 21 das 22 amostras coletadas de fevereiro a junho para esta análise.

Ao todo foram triados 42546 indivíduos distribuídos em quatro principais ordens de Insecta: Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera, e outros táxons como Collembola, bem como outras 14 ordens de Insecta e não-insetos.

Ao longo do período de amostragem, pode-se observar que os meses com o maior número de indivíduos coletados foram março/2023, representando 28,58% da abundância total (12161 indivíduos), fevereiro/2023, representando 28,27% (12028 indivíduos), e abril, representando 24,78% (10457 indivíduos), de acordo com a tabela 1.

A nível de ordem, pode-se observar que Diptera obteve os maiores números de indivíduos totais, correspondendo a 42,63% (18141 indivíduos) do valor total da amostragem, seguido de Hymenoptera, correspondendo a 9,40% (4000 indivíduos), Coleoptera, correspondendo a 8,88% (3781 indivíduos), outras ordens, correspondendo a 3,89% (1657 indivíduos) e Lepidoptera, correspondendo a 3,77% (1604 indivíduos) (figura 3).

Muitos estudos realizados com armadilhas Malaise citam a ordem Diptera como o grupo mais abundante (BORDIN & SARTOR, 2016), neste caso, praticamente determinando as flutuações observadas para o conjunto das ordens de Insecta. O destaque para Diptera pode também ser atribuído ao fato de a ordem ser considerada megadiversa (OLIVEIRA, et al. 2013). Além disso, outras ordens como Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera e outros táxons, como Collembola, mantêm padrões semelhantes de abundância com os retratados no presente trabalho (VASCONCELLOS, et al. 2010).

Pode-se traçar alguns padrões nas curvas de flutuação de algumas ordens. Diptera, considerada a ordem mais abundante do levantamento, seguiu um padrão parecido com outros táxons como Collembola, crescente nos primeiros meses e decrescente nos meses seguintes (figura 1). Hymenoptera manteve seu padrão de decrescimento gradual ao longo dos meses, bem como Coleoptera e Lepidoptera (este último tendo um leve crescimento ao final da amostragem). Outras ordens como Orthoptera e Psocoptera mantiveram curvas semelhantes de decrescimento (figura 1). Hemiptera, das demais ordens, obteve a maior abundância em número de indivíduos (831) e uma curva acentuada de crescimento nos primeiros dois meses e decrescimento nos meses seguintes (figura 4).

Algumas ordens como Neuroptera, Phasmatodea, Blattodea, Dermaptera, Zygentoma, Mantodea, Isoptera, Archaeognatha, Thysanoptera, Siphonaptera e Embioptera não tiveram presença significativa nas amostras coletadas, embora tenham aparecido algumas vezes durante o tempo de amostragem (figura 4).

Conclusão

O presente trabalho contribui para a caracterização da entomofauna do Rio Grande do Norte, oferecendo um panorama da ocorrência de diversos táxons no Parque Estadual das Dunas de Natal. As ordens melhor amostradas foram Diptera, Hymenoptera e Coleoptera. No entanto, a disparidade entre as duas primeiras e Coleoptera se deu de uma forma mais acentuada, evidenciando que armadilhas do tipo Malaise são mais eficientes na captura e interceptação de insetos de voo rápido. Os meses com maior abundância no número de indivíduos capturados foram março, fevereiro e abril, respectivamente. Entretanto, é necessário dar continuidade ao esforço de triagens, adicionando os dados até o mês de dezembro daquele ano para uma caracterização mais precisa e um panorama mais vasto, bem como melhores padrões temporais de flutuação das ordens em questão. Há também a repetição da

amostragem que está presentemente sendo repetida, ao longo do ano de 2025, o que permitirá verificar se os padrões se mantêm. Além disso, fica também evidente que será necessário realizar coletas utilizando outras técnicas e que levantamentos de entomofauna precisam ser realizados em diferentes estratos de vegetação para melhor medir as diferentes ocorrências de fauna. Apesar disso, este trabalho apresenta dados como a abundância de diversas ordens de Insecta do Parque Estadual das Dunas de Natal, oferecendo uma contribuição inicial para a caracterização da entomofauna e evidenciando a necessidade de mais estudos a respeito.

Referências

BORDIN, D; SARTOR, V. 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, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 89–104, 2016.

CAMARGO, A. J. A., et al. Coleções entomológicas: legislação brasileira, coleta, curadoria e taxonomias para as principais ordens. 2015.

CARDOSO, Pedro et al. Scientists' warning to humanity on insect extinctions. Biological conservation, v. 242, p. 108426, 2020.

GOULSON, D. The insect apocalypse, and why it matters. Current Biology: CB, v. 29, n. 19, p. R967–R971, 2019.

LIFEPLAN, a planetary inventory of life. University of Helsinki. Disponível em:<https://www2.helsinki.fi/en/projects/lifeplan/about> (acesso em agosto, 2025)

OLIVEIRA, I. B. R., et al. Diversidade da entomofauna em uma área de Caatinga no município de Bom Jesus-PI, Brasil. Científica, Dracena, SP, v. 41, n. 2, p. 150–155, 2013.

RAFAEL, J. A. et al. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 2º Edição ed. Manaus - AM: Editora INPA, 2024.

SCORIZA, R. N., PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. INFLUÊNCIA DA PRECIPITAÇÃO E TEMPERATURA DO AR NA PRODUÇÃO DE SERAPILHEIRA EM TRECHO DE FLORESTA ESTACIONAL EM SOROCABA, SP. FLORESTA, v. 44, n. 4, p. 687–696, 2014.

THOMAZINI, M. J. & Thomazini A. P. B. W. (2002) Levantamento de insetos e análise entomofaunística em floresta, capoeira e pastagem no Sudeste Acreano. Rio Branco, EMBRAPA Acre. 41p. (Circular Técnica, 35).

THOMAZINI, M. J. & Thomazini A. P. B. W. A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 21p. (Embrapa Acre. Documentos, 57).

UHLER, J., et al. A comparison of different Malaise trap types. Insect Conservation and Diversity, v.15, n.06, p.666-672, 2022.

VASCONCELLOS, J., et al. Seasonality of insects in the semi-arid Caatinga of northeastern Brazil. Revista Brasileira de Entomologia, v.54, n.03, 2010.

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

Tabela 1 - Dados de coletas mensais com número total de indivíduos por mês, número de coletas, média de indivíduos por coleta no mês e porcentagem correspondente ao valor do mês em relação ao valor total

Tabela 2 - Dados de coletas mensais com o número de indivíduos por ordem coletados no mês e o total para cada ordem

Tabela 3 - Dados de coletas mensais com o número de indivíduos de outras ordens coletados no mês e o total para cada ordem

Figura 1 - Gráfico com variação mensal do número de indivíduos por ordem

Figura 2 - Gráfico com variação do número de indivíduos coletados por mês

Figura 3 - Gráfico com variação do número de indivíduos coletados por ordem

Figura 4 - Gráfico com variação mensal do número de indivíduos de outras ordens

CÓDIGO: SB1187

AUTOR: MADSON FREIRE

COAUTOR: URSULA TATHIANA OLIVEIRA DE MEDEIROS

ORIENTADOR: ALICE DE MORAES CALVENTE

TÍTULO: COMPOSIÇÃO FLORÍSTICA E ESTRUTURA DA REGENERAÇÃO ARBÓREA NA FLONA DE NÍSIA FLORESTA, RN.

Resumo

A Mata Atlântica é um dos biomas mais biodiversos e ameaçados do mundo, com grande parte de sua cobertura reduzida a fragmentos isolados. A Floresta Nacional de Nísia Floresta (RN) está inserida nesse contexto e apresenta histórico de interferência antrópica, carecendo de estudos que avaliem sua composição e estrutura. Este trabalho tem como objetivo avaliar a estrutura e composição da vegetação arbórea na faixa sensível e identificar as espécies arbóreas presentes nas parcelas do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBIO). A amostragem concentrou-se nos indivíduos com diâmetro à altura do peito (DAP) inferior ou igual a 10 cm. Foram registrados 478 indivíduos, distribuídos em 61 espécies e 26 famílias, com maior representatividade das famílias Myrtaceae, Chrysobalanaceae e Rubiaceae. O índice de diversidade de Shannon variou de 2,66 a 2,95. Espécies como *Leptobalanus octandrus*, *Myrcia decorticans* e *Protium heptaphyllum* ocorreram em todas as parcelas. A família Chrysobalanaceae apresentou alta densidade relativa apesar do baixo número de espécies. Os resultados evidenciam padrões florísticos semelhantes aos observados em outros fragmentos da Mata Atlântica e reforçam a relevância ecológica da área.

Palavras-chave: Mata Atlântica; Composição florística; Estrutura da vegetação.

TITLE: FLORISTIC COMPOSITION AND STRUCTURE OF TREE REGENERATION IN THE NÍSIA FLORESTA NATIONAL FOREST, RN.

Abstract

The Atlantic Forest is one of the most biodiverse and threatened biomes in the world, with much of its coverage reduced to isolated fragments. The Nísia Floresta National Forest (RN) is part of this context and has a history of anthropic interference, lacking studies that assess its composition and structure. This study aims to assess the structure and composition of tree vegetation in the sensitive strip and identify the tree species present in the plots of the Biodiversity Research Program (PPBIO). Sampling focused on individuals with a diameter at breast height (DBH) less than or equal to 10 cm. A total of 478 individuals were recorded, distributed among 61 species and 26 families, with the Myrtaceae, Chrysobalanaceae, and Rubiaceae families being the most represented. The Shannon diversity index ranged from 2.66 to 2.95. Species such as *Leptobalanus octandrus*, *Myrcia decorticans*, and *Protium heptaphyllum* occurred in all plots. The Chrysobalanaceae family had a high relative

density despite the low number of species. The results show floristic patterns similar to those observed in other fragments of the Atlantic Forest and reinforce the ecological relevance of the area.

Keywords: Atlantic Forest; Floristic composition; Vegetation structure.

Introdução

A Mata Atlântica é um bioma que possui grande diversidade biológica e endemismo, com cerca de 13.000 espécies de Angiospermas, das quais aproximadamente 9.400 (73%) são estimadas como endêmicas. Porém, é a segunda floresta mais ameaçada do mundo, com apenas 12 % da cobertura vegetal permanecendo intacta, sendo reduzida a fragmentos isolados. Apenas cerca de 1,5% de sua área total corresponde a unidades de proteção integral, sendo que 8% da cobertura vegetal original deste bioma encontra-se localizada nas regiões nordeste e sudeste do país (Carvalho-Sobrinho; Queiroz, 2005, Lombardi; Gonçalves, 2000). Até meados dos anos 2000, poucos estudos haviam sido realizados sobre a composição florística da Mata Atlântica, com maior foco em formações litorâneas e abordando em sua maioria plantas arbóreas, além de algumas herbáceas, arbustivas, epífitas e lianas (Lombardi; Gonçalves, 2000).

Dentro deste bioma, está localizada a Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLONA), uma unidade de conservação situada no município de Nísia Floresta, RN (Santana, 2009), sendo uma área de extrema importância para a conservação da biodiversidade, especialmente por estar localizada dentro da Área de Proteção Ambiental Estadual – APA Bonfim/Guaraíra (Brasil, 2012; Santana, 2009). Pouco mais de 59% da área corresponde a floresta natural, devido ao histórico de interferência antrópica. Suas características atuais incluem áreas alteradas em estágio médio de regeneração e de experimentação florestal, não havendo comunidade florestal primária. Em seu interior dois fragmentos encontram-se em estágio secundário de regeneração apresentando diferenças florísticas, de densidade e porte. (Brasil, 2012; Câmara, 2021). Apesar disso, contém um dos poucos fragmentos de floresta estacional semidecidual remanescentes no estado do RN e no norte da distribuição da Mata Atlântica.

Diante do histórico de exploração humana e a relevância no contexto de remanescente florestal, torna-se uma prioridade realizar um inventário florestal detalhado, visando avaliar a estrutura e composição da vegetação arbórea presente na área de floresta natural, além de integrar informações que possam auxiliar em futuras estratégias de conservação. Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar a estrutura e composição da vegetação arbórea de indivíduos jovens e identificar as espécies arbóreas presentes em parcelas permanentes estabelecidas, fornecendo dados relevantes e essenciais para estimativas não tendenciosas da distribuição, abundância e biomassa das espécies, permitindo comparações biogeográficas entre diferentes sítios.

Metodologia

O trabalho foi conduzido na Floresta Nacional de Nísia Floresta (Flona), localizada no município de Nísia Floresta, RN, inserida nas coordenadas 06° 05' 12,4" S e 35° 11' 0,40" W. Possui uma área de 174,95 ha, relevo plano e altitude inferior a 30 m. O clima é tropical, classificado como Aw segundo Köppen-Geiger com variação de

temperatura entre 20 °C e 27 °C. A precipitação média anual é de 1455 mm, com umidade relativa média de 76%. A vegetação da Flona é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual, sob o domínio do bioma Mata Atlântica (Brasil, 2012; Câmara, 2025; Santana, 2009).

Os dados foram coletados em parcelas permanentes estabelecidas dentro do sítio de pesquisa estruturado conforme o protocolo RAPELD de amostragem de vegetação no contexto da Rede PPBIO Mata Atlântica. No sítio de amostragem de Nísia Floresta estão estabelecidas cinco parcelas permanentes de 40x250 metros, distribuídas sistematicamente a cada 500 m.

Para esse estudo, a amostragem se concentrou na faixa sensível de todas as parcelas do sítio, a qual corresponde a uma faixa contínua de 1 metro de largura ao longo do eixo central de cada parcela, totalizando 250 m² por parcela. Foram mensurados todos indivíduos arbóreos com diâmetro a altura do peito (DAP) menor que 10 cm, de forma a se somar a estudos paralelos que se concentraram em indivíduos com DAP > 10 cm ao longo de toda a área da parcela. Esses foram identificados ao nível de espécie, com auxílio de guias de campo e, quando necessário, com apoio de especialistas em identificação botânica. Em indivíduos bifurcados, medimos o DAP de todos os fustes e calculamos o diâmetro equivalente do indivíduo (representando a mesma área basal total dos fustes) e para a altura, adotamos a maior altura observada entre os fustes. O DAP foi obtido com o paquímetro, e a altura das árvores com uma vara graduada de 7 m.

Os dados coletados em campo foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variâncias, de modo a avaliar o atendimento aos pressupostos da estatística paramétrica. As análises foram conduzidas no RStudio (R Core Team, 2024), com estimativas da diversidade de espécies pelo índice de Shannon–Wiener (H') e da densidade de indivíduos arbóreos (número de indivíduos por hectare) em cada parcela.

Resultados e Discussões

Nas cinco parcelas amostradas foram registrados 478 indivíduos arbóreos, pertencentes a 26 famílias botânicas e 48 gêneros, onde 11 indivíduos não foram identificados em nível de família e 20 indivíduos foram identificados apenas ao nível de gênero, estando distribuídos entre Calliandra, Eugenia, Guapira, Myrsine, Ouratea e Tabebuia. Os restantes 447 estão distribuídos em 57 espécies. A partir da análise de taxonomistas, acredita-se que seis indivíduos de Eugenia correspondem a uma nova espécie e por essa razão foram determinados como *Eugenia sp.*. O gênero Myrsine apresentou dois indivíduos na parcela 4 que não foram identificados quanto a espécie, porém, na parcela 1 houve a identificação de um indivíduo como *Myrsine guianensis*, o que nos leva a acreditar se tratar da mesma espécie. O gênero Ouratea esteve presente nas parcelas 1, 3 e 4, com uma amostragem em cada parcela, e os gêneros Guapira, Myrsine e Tabebuia tiveram amostragens dentro de uma única parcela. Estes 4 gêneros foram considerados como únicos, por não haver outros representantes e por esta razão foram considerados como uma única espécie cada. Assim, a partir dessas observações, temos um total de 61 espécies amostradas.

As famílias com maior abundância foram Myrtaceae (29,92%), Chrysobalanaceae (13,39%) e Rubiaceae (13,18%)(Figura 1). O número de indivíduos para quase todas as parcelas foi maior para a família Myrtaceae, que apresentou mais

abundância na parcela 3 (35), seguido pelas parcelas 4 (33), 1 (29) e 2 (27). Na parcela 5, foram registrados 19 indivíduos dessa família, representando a segunda maior abundância. Nesta parcela, a família Rubiaceae foi a mais abundante, com 24 indivíduos, e na parcela 2 foi a segunda maior família, com 16 indivíduos. Já a família Chrysobalanaceae contou com 16 indivíduos na parcela 1 e 21 na parcela 3, correspondendo a segunda maior abundância nessas parcelas. Cabe destacar que na parcela 1, também foram amostrados 15 indivíduos de Melastomataceae e 15 de Apocynaceae, sendo que esta última não apresentou registros nas demais parcelas. O índice de Shannon variou entre 2,66, na parcela 3, e 2,95, na parcela 1, estando abaixo do indicado para formações secundárias de floresta atlântica bem conservadas, que devem estar acima de 3,0 nats ind.⁻¹, de acordo com Lima *et al.* (2017), podendo-se justificar essa diferença justamente pelo estudo estar focado na faixa sensível.

O número de famílias e espécies também apresentou variação entre as parcelas, sendo registrados 16 famílias e 29 espécies na parcela 1; 16 famílias e 24 espécies na parcela 2; 16 famílias e 23 espécies na parcela 3; 11 famílias e 21 espécies na parcela 4; 13 famílias e 27 espécies na parcela 5. As famílias com maior número de espécies foram Myrtaceae, com 15, seguida por Fabaceae, com 7, e Rubiaceae, com 6. Destaca-se ainda a família Chrysobalanaceae, que, embora representada por apenas 3 espécies, concentrou 60 indivíduos, o que corresponde a uma alta densidade relativa no conjunto amostral.

Esse levantamento, embora realizado com apenas uma fração dentro das parcelas, está de acordo com o encontrado em diferentes estudos realizados na Mata Atlântica, que em seus levantamentos identificaram Myrtaceae e Rubiaceae entre as famílias mais ricas e abundantes encontradas neste bioma. As espécies dessas famílias desempenham um importante papel ecológico por serem fontes-chave de reservas alimentares para a fauna, além de indicadores relevantes do estado de conservação dessas áreas (Iguatemy *et al.* 2017). Cabe destacar que a família Fabaceae têm uma importante atuação na fixação de nitrogênio assegurando a produtividade em boa parte dos ecossistemas terrestres (Lima *et al.*, 2017).

A análise das espécies dominantes em cada parcela, ou seja, com mais indivíduos amostrados, mostrou que, na parcela 1, *Leptobalanus octandrus* apresentou 16 indivíduos; na parcela 2, *Eugenia luschnathiana* teve 16 indivíduos; na parcela 3, *Psidium brownianum* totalizou 25 indivíduos; na parcela 4, *Myrcia bergiana* contou com 17 indivíduos; e, na parcela 5, *Cordia sessilis* foi registrada com 23 indivíduos. Três espécies estiveram presentes em todas as parcelas: *Leptobalanus octandrus*, *Myrcia decorticans* e *Protium heptaphyllum*. Esta última, foi descrita no trabalho de Costa (2020), realizado em outro remanescente florestal do Rio Grande do Norte, como uma das espécies de maior importância, principalmente pela frequência de ocorrências, onde se observou que ao longo das trilhas eram encontrados muitos indivíduos regenerantes de *Protium heptaphyllum*, sendo semelhante ao encontrado por Lima *et al.* (2017), visto que nos dois estudos a espécie estava presente em todas as parcelas, sendo a dispersão zoocórica a possível justificativa para essa situação. O que nos leva a destacar os representantes dos gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Psidium* da família Myrtaceae, que de acordo com Lima *et al.* (2017) apresenta várias espécies atrativas de vertebrados dispersores sendo relevantes para a continuidade do processo sucessional.

O teste de *Shapiro–Wilk*, usado para verificar os pressupostos de normalidade dos dados de cada parcela, rejeitou a hipótese de distribuição normal ($p < 0,05$) tanto

para DAP quanto para altura. Dessa forma, foi aplicado o teste de *Kruskal–Wallis*, alternativa não-paramétrica equivalente à ANOVA e adequado para comparar medianas entre grupos independentes. Para identificar quais parcelas diferem entre si, foi aplicado o *pós-hoc* teste de Dunn, com correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Em relação ao DAP, não houve diferença significativa ($p = 0.2096$) entre as parcelas analisadas (Figura 2). Porém, a altura dos indivíduos entre as parcelas, apresentou diferenças significativas, onde a parcela 2 apresenta alturas estatisticamente diferentes quando comparada às parcelas 3 e 5 ($p = 0,015$ e $p = 0,029$, respectivamente).

Conclusão

O levantamento realizado permitiu caracterizar a composição e a estrutura arbórea na faixa sensível das parcelas do PPBIO na FLONA de Nísia Floresta (RN), fornecendo informações a partir de uma nova abordagem metodológica. A ocorrência de espécies presentes em todas as parcelas, como *Protium heptaphyllum*, além da dominância de representantes da família Myrtaceae, evidencia padrões semelhantes aos observados em outros estudos na Mata Atlântica, o que indica a relevância ecológica da área amostrada, mesmo diante de seu histórico de uso antrópico.

Os resultados obtidos contribuem para ampliar o conhecimento sobre a dinâmica florestal na Mata Atlântica a partir da análise da faixa regenerativa. Ressalta-se que este trabalho representa uma etapa inicial do monitoramento, servindo de base para análises futuras relacionadas à estrutura da comunidade, incluindo parâmetros de biomassa, padrões espaciais e fatores ambientais associados, essenciais para compreender os processos ecológicos em curso e apoiar estratégias de conservação mais efetivas.

Referências

BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Plano de manejo da Floresta Nacional de Nísia Floresta**. Brasília: ICMBio, 2012.

Disponível: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-atlantica/lista-de-ucs/flona-de-nisia-floresta/arquivos/volume_i___diagnostico_02ago12.pdf. Acesso em: 22/03/2025.

BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **REFLORA – Plantas do Brasil: resgate histórico e herbário virtual para o conhecimento e conservação da flora brasileira**. 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 21/04/2025.

CÂMARA, Yasmim Borges; HOLANDA, Alan Cauê de; COSTA, Emanuelle Josephine Pereira da. **Aporte de serapilheira na borda de fragmentos florestais em diferentes estágios sucessionais na Mata Atlântica do Rio Grande do Norte, Brasil**. Madera y bosques, v. 27, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2722179>. Acesso em: 22/03/2025.

CARVALHO-SOBRINHO, Jefferson G. de; QUEIROZ, Luciano P. de. **Composição florística de um fragmento de Mata Atlântica na serra da Jibóia, Santa Terezinha, Bahia, Brasil**. Sitientibus Série Ciências Biológicas, v. 5, n. 1, p. 20-27, 2005. DOI: <https://doi.org/10.13102/scb8207>. Acesso em 12/08/2025.

COSTA, Vanessa Pulcheria Pinheiro da. **Composição, estrutura e níveis de perturbação em um remanescente florestal de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte**. 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/server/api/core/bitstreams/8dd01ec1-28a1-4b90-a804-f46e62c809c2/content>. Acesso em: 23/08/2025.

IGUATEMY, Mariana de A. *et al.* **An annotated checklist of Atlantic rainforest trees in southeastern Brazil, Tinguá Biological Reserve, Rio de Janeiro**. Journal of the Botanical Research Institute of Texas, p. 479-497, 2017. DOI: <https://doi.org/10.17348/jbrit.v11.i2.1085>. Acesso em: 23/08/2025.

LIMA, Rosival Barros de Andrade *et al.* Estrutura fitossociológica e diamétrica de um fragmento de Mata Atlântica, Pernambuco, Brasil. Revista Desafios, v. 4, n. 4, p. 143-153, 2017. DOI: <https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p143>. Acesso em: 23/08/2025.

LOMBARDI, Julio Antonio; GONÇALVES, Maisa. **Composição florística de dois remanescentes de Mata Atlântica do sudeste de Minas Gerais, Brasil**. Brazilian Journal of Botany, v. 23, p. 255-282, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042000000300003>. Acesso em: 12/08/2025.

SANTANA, José Augusto da Silva *et al.* **Acúmulo de serapilheira em plantios puros e em fragmento de Mata Atlântica na Floresta Nacional de Nísia Floresta-RN**. Revista Caatinga, v. 22, n. 3, 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/caatinga/article/view/1183>. Acesso em: 22/03/2025.

Anexos

Figura 1 – Abundância das famílias botânicas registradas. Cada barra representa uma família e seu respectivo número de indivíduos registrados no levantamento realizado em cinco parcelas da área de estudo, destacando as dez famílias mais representativas.

Figura 2 – Altura média e diâmetro à altura do peito (DAP) dos indivíduos por parcela. O gráfico (A) mostra o DAP médio (cm) para cada uma das cinco parcelas e o gráfico (B) apresenta a altura média (m) para cada uma das cinco parcelas amostradas.

CÓDIGO: SB1217

AUTOR: ALESSANDRA DE AZEVEDO SANTOS

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: DIVERSIDADE E POTENCIAL DE INFECTIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES COLONIZANDO A SERAPILHEIRA

Resumo

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota, são conhecidos por estabelecerem relações simbióticas com cerca de 72% das plantas, aumentando o crescimento vegetal e a fixação de nutrientes essenciais. Tradicionalmente, os estudos sobre FMA utilizam metodologias voltadas para a extração de esporos do solo ou para a clarificação de raízes de hospedeiros vegetais. No entanto, a ocorrência desses fungos colonizando a serapilheira vem sendo cada vez mais reportada, despertando interesse sobre os fatores que levam esses organismos a ocuparem esse substrato. Diante disso, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a colonização por FMA na serapilheira em um fragmento de Mata Atlântica e (ii) verificar o potencial de infectividade dos FMA presentes na serapilheira em colonizar hospedeiros vegetais, por meio de culturas armadilhas. Para isso, foram coletadas amostras de serapilheira e montadas culturas armadilhas com *Sorghum bicolor* (L.) Moench, utilizando uma mistura de serapilheira e solo estéril. Os resultados indicaram colonização significativa de FMA nas raízes de *S. bicolor* com média de colonização de 85,3%, apesar da considerada baixa média de porcentagem nas folhas (16,5%). Esses achados mostram que a serapilheira pode ser utilizada como inóculo para a montagem de culturas armadilhas e confirmam a ocorrência de FMA em folhas em decomposição em área de Mata Atlântica.

Palavras-chave: Cultura armadilha. Raízes. Ciclagem de nutrientes.

TITLE: Diversity and infectivity potential of Arbuscular Mycorrhizal Fungi colonizing leaf litter

Abstract

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), from the phylum Glomeromycota, are known for establishing symbiotic relationships with 72% of plants, increasing plant growth and the uptake of essential nutrients. Traditionally, studies with AMF employ methodologies focused on the extraction of spores from soil or clearing of host plant roots. However, the occurrence of AMF colonizing the leaf litter has been reported, raising interest in the factors that lead these organisms to colonize this substrate. Therefore, the objectives of this study were: (i) evaluate AMF colonization in the leaf litter of an Atlantic Forest fragment, and (ii) assess the infectivity potential of AMF present in the leaf litter in colonizing host plants through trap

cultures. For this purpose, leaf litter samples were collected and trap cultures were established with *Sorghum bicolor* (L.) Moench, using a mix of leaf litter and sterile soil. The results indicated significant AMF colonization in the roots of *S. bicolor*, with an average colonization rate of 85.3%, despite the relatively low mean percentage observed in the leaves (16.5%). These findings demonstrate that leaf litter can be used as inoculum for the establishment of trap cultures and confirm the occurrence of AMF in decomposing leaves in an Atlantic Forest area.

Keywords: Trap Culture. Roots. Nutrient cycling.

Introdução

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), do filo Glomeromycota (Schuëler et al. 2001), são amplamente conhecidos pela sua relação simbiótica com cerca de 72% das raízes de plantas terrestres (Brundrett. et al 2018), além de ocorrência documentada em ambientes aquáticos (de Queiroz et al. 2022). As plantas participantes desta simbiose são beneficiadas com o aumento do crescimento vegetal, devido à maior absorção de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio (Berruti et al. 2016). Em troca, os FMA recebem metabólitos secundários da fotossíntese como carbono e açúcares (Sadhana et al. 2014).

Grande parte dos estudos com FMA utilizam a extração de glomerosporos da rizosfera (Gerdemann & Nicolson., 1963) e/ou observação de estruturas produzidas durante a colonização por FMA em fragmentos de raízes (Vierheilig et al. 1998). Além disso, outra técnica amplamente utilizada é a montagem de culturas armadilhas para estudos que visam (i) investigar a aplicação desses fungos na agricultura; (ii) restaurar áreas degradadas e (iii) a multiplicar espécies raras ou que não esporulam no momento de coleta (Janos, 1980; Ashmelash et al. 2016; Wang et al. 2017; Kalamulla et al. 2022). Apesar das referidas técnicas serem imprescindíveis para estudos com FMA, elas limitam a exploração desses fungos à porção rizosférica, excluindo outros substratos como a serapilheira.

À medida que estudos vêm documentando a ocorrência de FMA em porções negligenciadas, como a serapilheira, este substrato tem se revelado um habitat promissor para abrigar uma rica diversidade de FMA (Aristizábal et al. 2004; Posada et al. 2012; Bunn et al. 2019; Díaz-Ariza et al. 2021; Lima et al. 2023, 2024). A ocorrência de FMA na serapilheira vêm sendo intensificada desde 1968, quando Went & Stark, observaram hifas de fungos endotróficos proliferando na serapilheira em um fragmento de floresta Amazônica. A partir dessa observação, começaram as buscas por explicações sobre o papel desses organismos simbiontes obrigatórios na colonização de um substrato rico em matéria orgânica em decomposição. Assim, Went & Stark sugeriram que os FMA estariam envolvidos na “ciclagem mineral direta”, transferindo nutrientes minerais da serapilheira para as raízes de suas plantas hospedeiras. Existem também estudos que supõem que os FMA possuem papel ativo na decomposição da serapilheira, devido a presença de um gene que codifica uma enzima com capacidade de digerir celulose e hemicelulose (Singh et al. 2022).

Existem alguns trabalhos que discutem a capacidade dos FMA de transferir nutrientes de baixo peso molecular da serapilheira (Wu et al. 2022), mas ainda carecem experimentos que comprovem o papel dos FMA na serapilheira. Além disso, a serapilheira tem se mostrado promissora na recuperação de áreas degradadas (Medeiros et al. 2021). Nesse sentido, visto que estudos sugerem que inóculos do mesmo local da planta, podem gerar um maior

crescimento vegetal (Vahter et al. 2020), espera-se que possivelmente a transposição da serapilheira para áreas próximas de restauração, também direcionam uma comunidade de FMA que já é adaptada a espécies de plantas locais. Tendo isso em vista, este trabalho objetivou (i) explorar a presença de colonização dos FMA na serapilheira em um fragmento de Mata Atlântica e (ii) verificar o potencial de infectividade dos FMA presentes na serapilheira em colonizar hospedeiros vegetais a partir de culturas armadilhas.

Metodologia

Área de estudo e coleta de amostras

A coleta foi realizada no Parque Estadual das Dunas de Natal “Jornalista Luiz Maria Alves” (5°46’S 35°12’W), Unidade de Conservação localizada no estado do Rio Grande do Norte, Natal. A área está inserida em um fragmento de Mata Atlântica que recobre cerca de 80% do parque (Freire, 1990; Oliveira, 1999). O clima da região é tropical úmido com uma variação anual de umidade relativa de 59% a 79% (IDEMA 2007). A coleta foi realizada ao final do mês de setembro, caracterizando o período chuvoso dessa área que tem início nos meses de março ou abril e término nos meses de agosto ou setembro (Freire, 1990).

A serapilheira foi coletada em dois tratamentos diferentes. Uma parte das amostras de folhas foram usadas para montagem de culturas armadilhas e a outra para clarificação, peneiramento e identificação taxonômica dos glomerosporos.

A coleta de serapilheira foi amostrada em cinco pontos distribuídos na área escolhida, abaixo de árvores adultas. Foi estabelecido em cada ponto uma parcela de 1x1m, na qual toda a serapilheira inserida na parcela foi coletada. Do material coletado, 0,5L de serapilheira foi usada na implementação do experimento de culturas armadilhas em casa de vegetação, enquanto 30g foram usadas para o peneiramento úmido, e o restante destinado para montagem de lâminas microscópicas.

Caracterização morfológica

Em laboratório, 15 folhas foram cortadas em fragmentos menores e submetidas a uma adaptação da metodologia utilizada por Bunn et al. (2019). As folhas foram submetidas ao reagente Hidróxido de Potássio (KOH) a 15% por volta de 24h e em seguida transferidas para placas de Petri, contendo Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 35%, até alcançar translucidez. Em seguida, foram tingidas em solução de lactoglicerol e azul de tripano à concentração de 0,05%. Ao final, foram montadas em lâminas com glicerol para a observação das estruturas típicas de FMA, como hifas não septadas ou com septos irregulares, esporos globosos, subglobosos, elipsóides ou irregulares, contendo ao menos uma camada do esporo e vesículas (Bunn et al. 2019).

A caracterização morfológica das raízes de *Sorghum bicolor* extraídas das culturas armadilhas ocorreu com a lavagem em água corrente e em seguida, cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm para a clarificação adaptada de Vierheilig et al (1998). Os fragmentos de raízes foram imersos em KOH (15%), por aproximadamente 5 dias. Posteriormente, os fragmentos foram tingidos com azul de tripan (5%) e montados em lâminas contendo PVLG.

Para avaliar a colonização micorrízica nas folhas, a taxa de colonização foi calculada seguindo uma adaptação ao método da linha de grade descrito por Tennant (1975). Cada fragmento de folha foi dividido em oito quadrantes. Cada quadrante contendo estruturas de FMA recebeu o valor de 12,5%, de modo que juntos os oito totalizaram 100%. Para obtenção da taxa total de colonização das parcelas, foi somada a porcentagem individual de cada fragmento e dividido pelo número total de lâminas colonizadas. Enquanto para a colonização micorrízica nas raízes, as mesmas foram avaliadas seguindo o método proposto por Dalpé & Séguin (2013), quantificadas pelo método de interseção dos quadrantes (Giovanetti; Mosse, 1980). Foram considerados como colonização a presença de estruturas como hifas com septos irregulares ou ausentes, esporos globosos, sub-globosos, elipsóides ou irregulares que fosse possível observar ao menos uma camada do esporo.

A contagem dos glomerosporos foi realizada a partir da serapilheira coletada em campo, das culturas armadilhas implementadas em casa de vegetação, e dos fragmentos foliares montados em lâminas. Os glomerosporos foram extraídos do solo seguindo os métodos de Gerdemann & Nicolson, (1963) e Jenkins (1964 - modificado) utilizando peneiras com malhas de 45<150<70 diferentemente do trabalho original, quantificados em placa canaletada com auxílio de estereomicroscópio. Para a identificação das espécies de FMA, os glomerosporos foram separados por morfotipo e montados em lâminas contendo PVLG e PVLG + reagente de Melzer (1:1 v/v), seguindo a classificação proposta por Hyde et al. (2024) e da Silva et al. (2024).

Culturas armadilhas

Em vasos com capacidade de 1,5L, 0,5L de serapilheira coletada juntamente ao substrato de 1000mL de areia lavada esterilizada foram utilizados para montagem das culturas. Foram montadas 10 culturas com *Sorghum bicolor* (L.) Moench, como hospedeiro, sendo uma por parcela diferenciadas em grupos A e B. Os hospedeiros foram mantidos em casa de vegetação por um prazo de 120 dias, visando constatar se a serapilheira incrementou glomerosporos ao solo e raízes. Após 120 dias, as culturas foram submetidas a 2 semanas de estresse hídrico, visando a esporulação no solo.

Análise estatística

A normalidade dos dados referentes às folhas e raízes foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk (Zuur et al. 2010). Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis a fim de verificar se a porcentagem de colonização por FMA nas amostras foi significativa. Após isso, foi feito o dunnTest pelo método de bonferroni para comparar a significância entre as parcelas. As análises foram feitas no software R studio versão 4.3.3.

Resultados e Discussões

As amostras de serapilheira apresentaram diferentes porcentagens de colonização por FMA (Tabela 1). As parcelas com maior porcentagem de colonização foram a 4 e 5 com 26,3% e 25%, respectivamente. Para as raízes, também foi observada variação da colonização por FMA entre os vasos, sendo 1A e 2A com os maiores percentuais, ambas com 100% de colonização (Tabela 2).

Foram contabilizados uma média de 50 esporos nas folhas de serapilheira (Figura 2). Ambas as análises para dados não paramétricos (Kruskal-Wallis e Dunn-Bonferroni) indicaram

ausência de diferença significativa entre as parcelas, embora a comparação entre as parcelas 3 e 4 tenha mostrado tendência à significância ($p = 0,058$). Para as estruturas observadas nas raízes - hifa, arbúsculo, esporo e vesícula (Figura 1) e Dark septate (DS) - as análises foram todas significativas (Tabela 3). Para o dado das culturas armadilhas, não houveram esporos recuperados.

A ocorrência de FMA na serapilheira vem sendo discutida desde 1968 com o estudo de Went & Stark em uma porção da Amazônia brasileira e peruana. Entretanto, os trabalhos que envolvem a colonização de FMA na serapilheira no país, se restringiram a explorar apenas áreas de Mata Atlântica (Kemmelmeyer et al. 2022; Lima et al. 2024; Lima et al. 2025, in press). Além disso, esses trabalhos focaram em documentar a ocorrência dos FMA na serapilheira, buscando identificar os fatores ambientais do solo e serapilheira relacionados. Para isso, foi utilizado a metodologia de litter bags, na qual é possível acompanhar o tempo de decomposição e se é um fator que interfere na colonização por FMA. Dessa forma, diverge quanto a este trabalho onde foram coletadas folhas aleatórias da serapilheira. Mesmo ainda não tendo sido observado se existe um padrão dos fatores que possivelmente impactam na colonização de FMA na serapilheira como tempo de decomposição, qualidade das folhas e hospedeiro específico (Lima et al. 2025) a serapilheira dessa área apresentou porcentagens de colonização variáveis, tendo média de colonização geral de 16,5%. Além disso, até o momento, nenhum buscou testar o potencial dos FMA na serapilheira.

Went & Stark (1968) teorizaram que hifas hipógeas parecidas com as de FMA estariam ciclizando os nutrientes da serapilheira para as raízes de seus hospedeiros no solo, visto que o solo em algumas partes da Amazônia é pobre em nutrientes, além de possuir o pH alto (de Jesus et al. 2009; Pinheiro et al. 2017; Quesada et al. 2020). Isso dificulta a existência de espécies de FMA que não são adaptadas a essas condições como representantes das ordens Glomerales e Acaulosporales (Semchenko et al. 2021). Em condições como essas, a serapilheira pode assumir um papel importante para o crescimento e bem estar da planta, de forma que seja um local de grande aporte nutricional. Nesse caso, a montagem de culturas utilizando a serapilheira colonizada por FMA pode se tornar uma ótima fonte de nutrientes, além de glomerosporos presentes em sua superfície que tem potencial para beneficiar o crescimento de seus hospedeiros.

Grande parte dos vasos de cultura armadilha tiveram em suas raízes porcentagens de colonização significativa para FMA, entretanto, as parcelas diferiram quanto ao tipo de estrutura fúngica e abundância. Apenas as hifas estavam presentes em quase todas as raízes de plantas (Figura 3). Esse resultado pode indicar duas diferentes formas de atuação do fungo: a primeira está de acordo com o trabalho de Went & Stark, (1968), com a hipótese da ciclagem direta de nutrientes da serapilheira para a planta através das hifas, como visto também no trabalho de Wu et al. (2022) onde os FMA são capazes de transferir nutrientes de baixo peso molecular. A segunda está relacionada ao aporte de nutrientes que a serapilheira oferece ao solo. Dessa forma, a serapilheira teria o papel de nutrir o solo estéril, possibilitando o transporte direto de nutrientes do solo para a planta hospedeira através das estruturas dos FMA.

A colonização nas raízes de *S. bicolor* foi diversificada, com arbúsculos (Figura 4) tipo coils, típicos da ordem Gigasporales, e tipos arum e paris, associados geralmente às ordens Acaulosporales e Glomerales (Klironomos et al. 2002). Isso mostra a presença de diversificados grupos de FMA na serapilheira utilizada na montagem das culturas. A presença de diferentes tipos de arbúsculos pode ser explicada porque existe a possibilidade de

mais de uma espécie de FMA colonizar as raízes simultaneamente. Isso pode ser uma grande vantagem para o crescimento vegetal, visto que essas espécies podem ser complementares ajudando na fixação de diferentes nutrientes a partir de seus respectivos tipos de arbúsculos (Jansa et al. 2007).

A colonização por Dark Septate (DS), um grupo de fungos diversos do filo Ascomycota, simbiontes com até 80% das raízes de florestas (Grünig et al. 2008) foi observada especialmente nos dois vasos da parcela 5. As análises estatísticas sugerem uma interação entre DS e FMA, na qual as parcelas com predominância de DS diferiram significativamente das demais em todas as estruturas de FMA. Dessa forma, pode ocorrer uma relação antagônica, de forma que a presença de dark septate pareceu influenciar na ausência dos FMA. Estudos mostram que a presença de FMA juntamente com os DS podem ser benéficas para a planta de forma a aumentar o crescimento aéreo da planta e fortalecer as raízes. Entretanto, a presença média ou alta de DS tem um impacto competitivo na comunidade de FMA (Xie et al. 2021) o que pode explicar a ausência desse grupo nos vasos da parcela 5. Apesar disso, não é possível afirmar que existe uma preferência dos hospedeiros pelo DS, devido a fatores climáticos, do solo e até mesmo morfológico das raízes (Grünig et al. 2008).

A ausência de esporulação nas culturas pode ser explicada porque alguns grupos de FMA, quando submetidos ao ambiente de culturas armadilhas, esporulam apenas após 20 meses (Sýkorová et al. 2007), havendo a necessidade de vários ciclos de multiplicação. Gêneros como *Glomus* investem mais na produção de esporos e hifas no momento da colonização (Klironomos et al. 2002), isso pode justificar a ausência de estruturas parecidas com esporos do gênero *Gigaspora*, apesar do aparecimento de outras estruturas do grupo. A colonização por vesículas foi presente praticamente em todas as parcelas, indicando um padrão de colonização de gêneros considerados R estrategistas como *Acaulospora* e *Glomus*, devido a facilidade de colonizar as raízes nos primeiros meses de contato com a cultura armadilha (Sýkorová et al. 2007.).

Conclusão

Com base nos dados obtidos conclui-se que as folhas da serapilheira de Mata Atlântica são colonizadas por FMA, mostrando que esse substrato tem potencial para uso como inóculo de FMA para crescimento de plantas de interesse econômico ou ainda para recuperação de áreas impactadas.

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.
- BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BIANCIOTTO, V. AMF components from a microbial inoculum fail to colonize roots and lack soil persistence in an arable maize field. *Symbiosis*, v. 72, n. 1, p. 73-80, 2017.
- BRUNDRETT, M. C.; TEDERSOO, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, v. 220, p. 1108-1115, 2018.

BUNN, R. A. et al. Revisiting the ‘direct mineral cycling’ hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why? *The ISME Journal*, v. 13, p. 1891-1898, 2019.

CHENG, L. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi increase organic carbon decomposition under elevated CO₂. *Science*, v. 337, n. 6098, p. 1084-1087, 2012.

DA C JESUS, E.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; DE S MOREIRA, F. M. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.

DALPÉ, Y.; SÉGUIN, S. M. Microwave-assisted technology for the clearing and staining of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Mycorrhiza*, v. 23, n. 4, p. 333-340, 2013.

DE QUEIROZ, M. B. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota) species inhabiting sediments of lentic and lotic Brazilian ecosystems: addition of new global records for aquatic condition. 2022.

DÍAZ-ARIZA, L. A.; RIVERA, E. L.; SÁNCHEZ, N. 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*, v. 45, e0200110, 2021.

FREIRE, M. S. B. Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas do Natal. *Acta Botanica Brasilica*, v. 4, p. 41-59, 1990.

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.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, p. 489-500, 1980.

GOMES, S. R. B. S. et al. Richness of arbuscular mycorrhizal fungi in a Brazilian tropical shallow lake: assessing an unexpected assembly in the aquatic-terrestrial gradient. *Diversity*, v. 14, n. 12, p. 1046, 2022.

GRÜNIG, C. R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T. N.; HOLDENRIEDER, O. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l.–*Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany*, v. 86, n. 12, p. 1355-1369, 2008.

HODGE, A.; CAMPBELL, C. D.; FITTER, A. H. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, v. 413, n. 6853, p. 297-299, 2001.

HYDE, K. D. et al. The 2024 Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, v. 15, p. 5146-6239, 2024.

JANOS, D. P. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, p. 56-64, 1980.

JANSA, J.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*, v. 177, n. 3, p. 779-789, 2008.

JENKINS, W. R. A. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, v. 48, p. 692, 1964.

KALAMULLA, R. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable agriculture. *Sustainability*, v. 14, n. 19, p. 12250, 2022.

KEMMELMEIER, K. et al. Composition and seasonal variation of the arbuscular mycorrhizal fungi spore community in litter, root mat, and soil from a subtropical rain forest. *Mycorrhiza*, v. 32, n. 5, p. 409-423, 2022.

LIMA, J. L. R. de; MAGURNO, F.; NOBRE, C. P.; USZOK, S.; MARINHO, P.; FIUZA, P. O.; GOTO, B. T. Climbing to the top: how arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter. In press, 2025.

LIMA, J. L. R. et al. Recovering arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from decomposing litter: an unusual approach. *New Zealand Journal of Botany*, p. 1-17, 2023.

MEDEIROS, A. S.; GOTO, B. T.; GANADE, G. Ecological restoration methods influence the structure of arbuscular mycorrhizal fungal communities in degraded drylands. *Pedobiologia*, v. 84, p. 150690, 2021.

OLIVEIRA, F. F. G. Utilização do Sistema de Posicionamento Global – GPS no mapeamento e georreferenciamento ambiental das zonas de proteção ambiental de Natal-RN. Departamento de Geografia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Monografia, 121 p., 1999.

PINHEIRO, É. F. et al. Prediction of soil physical and chemical properties by visible and near-infrared diffuse reflectance spectroscopy in the central Amazon. *Remote Sensing*, v. 9, n. 4, p. 293, 2017.

POSADA, R. H.; MADRIÑÁN, S.; RIVERA, E. L. Relationships between the litter colonization by saprotrophic and arbuscular mycorrhizal fungi with depth in a tropical forest. *Fungal Biology*, v. 116, n. 7, p. 747-755, 2012.

QUESADA, C. A. et al. Variations in soil chemical and physical properties explain basin-wide Amazon forest soil carbon concentrations. *Soil*, v. 6, n. 1, p. 53-88, 2020.

SADHANA, B. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a biofertilizer – a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 3, n. 4, p. 384-400, 2014.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SEMCHENKO, M. Temperature and pH define the realised niche space of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist (Online)*, 2021.

SINGH, P. P. et al. Rhizophagus proliferus genome sequence reiterates conservation of genetic traits in AM fungi, but predicts higher saprotrophic activity. *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 1, p. 105, 2022.

SMITH, S. E.; READ, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, 2010.

SÝKOROVÁ, Z.; INEICHEN, K.; WIEMKEN, A.; REDECKER, D. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza*, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2007.

TENNAKOON, D. S. et al. Life in leaf litter: fungal community succession during decomposition, 2021.

TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *The Journal of Ecology*, p. 995-1001, 1975.

VAHTER, T. et al. Co-introduction of native mycorrhizal fungi and plant seeds accelerates restoration of post-mining landscapes. *Journal of Applied Ecology*, v. 57, n. 9, p. 1741-1751, 2020.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A. P.; WYSS, U. R. S.; PICHÉ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 5004-5007, 1998.

WU, C. et al. The biotic and abiotic factors of regulation of arbuscular mycorrhizal fungi activity in litter decomposition. *Eurasian Soil Science*, v. 55, n. 10, p. 1446-1459, 2022.

XIE, L. et al. Combined inoculation with dark septate endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi: synergistic or competitive growth effects on maize? *BMC Plant Biology*, v. 21, n. 1, p. 498, 2021.

Anexos

Tabela 1: Porcentagem de colonização por Fungos Micorrízicos Arbusculares na serapilheira de um fragmento de Mata Atlântica.

Tabela 2: Porcentagem de colonização por Fungos Micorrízicos Arbusculares em raízes de *Sorghum bicolor* extraídas de cultura armadilha.

Tabela 3: Valores de P por estrutura encontrada nas raízes e significância associada a cada uma.

Figura 1: Colonização de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) em raízes de *Sorghum bicolor* extraídas de cultura armadilha em escala de 10µm. A - Esporo colonizando um fragmento de raiz extraída de cultura armadilha; B - Hifas, esporos e vesículas coloni

Figura 2: Diferentes esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares colonizando o tecido de folhas em decomposição em escala de 10 μ m (A, B, C e D).

Figura 3: Gráfico boxplot representando a distribuição de hifas de Fungos Micorrízicos Arbusculares por parcela.

Figura 4: Gráfico boxplot representando a distribuição de arbúsculos por parcela.

Figura 5: Gráfico boxplot representando a distribuição de Dark Septate (DS) por parcela.

Figura 6: Gráfico boxplot representando a distribuição de esporo por parcela.

Figura 7: Gráfico boxplot representando a distribuição de vesícula por parcela.

CÓDIGO: SB1220

AUTOR: MARINA FERREIRA AGUIAR

ORIENTADOR: ANDREA LEME DA SILVA

TÍTULO: Mulheres rurais e bioeconomia de produtos da agrobiodiversidade associados à restauração florestal da Caatinga

Resumo

Este trabalho analisa a atuação de mulheres camponesas do assentamento Prof. Maurício de Oliveira (Açu/RN), destacando seu protagonismo na produção agroecológica e na construção de alternativas sustentáveis no semiárido. A pesquisa buscou elaborar um diagnóstico socioeconômico e identificar produtos da biodiversidade com potencial de geração de renda, a partir de entrevistas, caminhadas transversais e observação direta. As participantes apresentam perfil marcado por baixa renda, escolaridade limitada e inserção majoritária na economia informal. A sobrecarga de trabalho — entre as tarefas domésticas, os cuidados com a família e o cultivo da terra — é constante e invisibilizada. Apesar disso, predominam práticas agroecológicas baseadas em saberes ancestrais, como o uso de sementes crioulas e adubos naturais. A ausência de assistência técnica contínua, as dificuldades de comercialização e o acesso fragmentado às políticas públicas são entraves recorrentes. Ainda assim, as mulheres demonstram forte organização social, vontade de permanecer no campo e engajamento em redes de cooperação. Os resultados indicam que a bioeconomia de base agroecológica, aliada ao fortalecimento das cadeias produtivas e à valorização dos saberes locais, representa um caminho promissor para a autonomia das mulheres e a regeneração dos territórios da Caatinga.

Palavras-chave: bioeconomia; agroecologia; feminismo rural; soberania alimentar.

TITLE: Rural women and the bioeconomy of agrobiodiversity-based products associated with Caatinga forest restoration.

Abstract

This research analyzes the role of peasant women from the Prof. Maurício de Oliveira agrarian settlement (Açu, RN), highlighting their leadership in agroecological production and the development of sustainable alternatives in Brazil's semiarid region. The study aimed to build a socioeconomic diagnosis and identify biodiversity-based products with income-generating potential, through interviews, transect walks, and direct observation. The participants present a profile marked by low income, limited schooling, and predominant involvement in informal economic activities. They face a constant and often invisible overload of work, balancing domestic responsibilities, caregiving, and agricultural labor. Despite these challenges, agroecological practices rooted in ancestral knowledge prevail,

such as the use of creole seeds and natural fertilizers. Gaps in continuous technical assistance, difficulties in commercialization, and fragmented access to public policies remain significant barriers. Nevertheless, the women show strong social organization, a desire to remain in rural areas, and active engagement in cooperative networks. The results indicate that an agroecology-based bioeconomy, combined with the strengthening of productive chains and the valorization of local knowledge, offers a promising path to women's autonomy and territorial regeneration in the Caatinga biome.

Keywords: bioeconomy; agroecology; rural feminism; food sovereignty.

Introdução

Este relatório analisa os resultados de um diagnóstico socioeconômico e produtivo junto a mulheres do assentamento Prof. Maurício de Oliveira (Açu/RN), com foco na organização das práticas de cultivo, nas desigualdades de gênero no acesso a recursos e participação política, e nas estratégias de subsistência baseadas em saberes locais e ancestrais. No contexto do semiárido, a valorização das práticas agroecológicas na Caatinga tem se mostrado fundamental frente à degradação ambiental e às desigualdades que impactam comunidades rurais. Nesse cenário, destaca-se o protagonismo das mulheres na conservação de sementes, no manejo dos quintais produtivos e na articulação de coletivos de luta.

É importante ressaltar que as atividades aqui relatadas referem-se ao ciclo iniciado em abril de 2025, após a substituição da bolsa de iniciação científica, com ênfase na realização do diagnóstico socioeconômico e na identificação de produtos da biodiversidade com viabilidade econômica vinculados à restauração ecológica.

A luta pelo direito à terra no Brasil tem origens coloniais e segue sendo disputada por movimentos sociais, povos indígenas e comunidades quilombolas. O avanço do agronegócio, marcado pela concentração fundiária, exportação, monocultura e degradação ambiental, reforça a lógica de reprodução das desigualdades no campo (Prado, 2000; Sauer, 2017; IBGE, 2023). Esse modelo também aprofunda desigualdades de gênero: apesar da intensa participação feminina nas lutas por terra, muitas mulheres foram invisibilizadas, com seus papéis creditados aos maridos, dentro da lógica do familismo (Siliprandi, 2015). Apenas em 1985 as mulheres conquistaram o direito à sindicalização. Um marco dessa trajetória é a Marcha das Margaridas, que homenageia a sindicalista rural Margarida Alves.

A presença feminina em movimentos como a Marcha das Margaridas, Via Campesina e Marcha das Mulheres Indígenas mostra que a agroecologia é também um projeto político de transformação. O manejo de sementes crioulas, os quintais e os saberes tradicionais são expressões de resistência. A criação da ANA (2002) e da ABA (2004) contou com a atuação das mulheres que ampliaram o escopo da agroecologia para temas como justiça social, gênero e soberania alimentar. A palavra de ordem “sem feminismo, não há agroecologia” resume esse posicionamento político. O diálogo entre feminismo e agroecologia abre caminhos para a autonomia das mulheres em diversas esferas, ainda que as desigualdades e invisibilizações persistam.

Nesse contexto, a bioeconomia se apresenta como estratégia para associar conservação ambiental e geração de renda, especialmente na Caatinga, um bioma ameaçado pela desertificação (Antongiovanni, 2018; Costa, 2022). Segundo a Cúpula Global de

Bioeconomia, trata-se da produção baseada em recursos e processos biológicos sustentáveis (Birner, 2018). Em um cenário em que a maior parte do crédito rural se destina ao agronegócio (BRASIL, 2025), as mulheres assentadas vêm protagonizando experiências agroecológicas de resistência, como hortas, apicultura, produção de mudas e recuperação de agroecossistemas (Mota, 2021).

Para Altieri (2004), a agroecologia se apoia na diversidade produtiva e no uso sustentável dos recursos, favorecendo a harmonia com os ecossistemas e a reprodução social. Esses princípios estão presentes nas práticas das mulheres da Caatinga, que conciliam tradição e inovação social. Carlos Nobre (2020) reforça que a bioeconomia da sociobiodiversidade é estratégica frente à crise climática e deve incluir as populações locais. Adaptada ao semiárido, essa abordagem reconhece o protagonismo feminino na construção de uma bioeconomia sustentável, centrada na justiça social, em cadeias curtas e na valorização do território.

Metodologia

O estudo foi desenvolvido junto ao Projeto de Assentamento (PA) Professor Maurício de Oliveira, localizado a cerca de 15km do centro de Açu (RN), do dia 13/05/2025 até o dia 16/05/2025, onde foram entrevistadas 15 mulheres moradoras do assentamento. Além das entrevistas, foram realizadas caminhadas transversais pelo assentamento e espaços de cultivo, juntamente com a observação direta, a fim de observar os espaços produtivos manejados (roças e quintais) e não-manejados (Caatinga). Os dados foram registrados por meio do uso de gravador telefônico, registros fotográficos e anotações de campo.

As entrevistas, semi-estruturadas, foram norteadas pelo questionário - disponível no Anexo 1 - que abordou o perfil socioeconômico e a história de vida das mulheres, com foco em escolaridade, renda, dados socioeconômicos, história agrária, divisão do trabalho e acesso a políticas públicas das mulheres rurais. Além disso, as entrevistas buscaram incrementar o potencial de informações sobre o conhecimento e uso de recursos naturais (espécies vegetais) ligados à restauração da Caatinga com potencial para o desenvolvimento de arranjos produtivos locais. A seleção das mulheres do assentamento a serem entrevistadas foi baseada no método Bola de Neve (AMOROZO et al. 2002; ALBUQUERQUE et al. 2014).

Concomitantemente às entrevistas, foi inventariada a totalidade das plantas cultivadas de cada unidade doméstica estudada. O inventário foi realizado por meio da técnica do percurso comentado na propriedade: observação in loco das plantas com a agricultora e levantamento do nome das espécies e variedades, a fim de se obter uma listagem completa das plantas cultivadas por cada agricultora.

Na etapa de análise de dados, utilizou-se o método da análise de conteúdo, de acordo com referenciais de Bardin (2007), seguindo-se as três etapas propostas por esta autora. Na etapa de pré-análise, foi realizada a preparação do material, utilizando a ferramenta de inteligência artificial Clipto.Ai para transcrever as entrevistas. A segunda etapa, denominada exploração do material, consistiu na busca de palavras e ideias repetidas pelos entrevistados, e posteriormente, na terceira etapa, a identificação de unidades de registro, que, segundo Bardin (2007, p.98), são as unidades de significação que correspondem ao “segmento de conteúdo a considerar como unidade base, visando a categorização e análise frequencial”. Ambas as etapas foram realizadas com auxílio do software de análise qualitativa Atlas.ti,

versão web, que proporcionou um suporte técnico-metodológico a fim de tornar mais eficiente o processo de sistematização.

Resultados e Discussões

Histórico do assentamento e a luta pela terra

A luta pela terra começou no ano de 2004, em um acampamento à beira BR-304, e, após três anos de resistência, em 2006, houve a migração das pessoas para a terra que futuramente seria o assentamento, que pertencia à antiga Frunorte, uma empresa produtora de melões que estava desativada há muito tempo. Este assentamento tem 315 hectares e foi titulado pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) em 2011, como resultado da luta histórica pelo acesso à terra, apoiado fundamentalmente pela Comissão Pastoral da Terra (CPT), que contribuiu com doações de cestas básicas e apoio político.

Nesse processo, um grupo de mulheres se formou, chamado "Sementes da Terra", e, com o apoio da Comissão Pastoral da Terra (CPT), O grupo, composto por 30 mulheres, conta atualmente com o apoio do Centro Feminista 8 de março (CF8) e da CPT, participando de mobilizações como a Marcha Mundial das Mulheres e a Marcha das Margaridas. Um dos principais objetivos do grupo é a geração de renda para as mulheres organizadas.

No mesmo ano da desapropriação da terra, iniciou-se a construção das casas, abrigando inicialmente 70 famílias — número que, atualmente, já se aproxima de 90 famílias. Como a maior parte das mulheres não tinha renda, elas começaram a se auto-organizar em busca de alternativas econômicas. Surgiram, então, os quintais produtivos, mas, devido ao espaço limitado, o grupo reivindicou uma área no assentamento para expandir as atividades agrícolas. Assim, foi criada uma horta comunitária (Figura 1), financiada pelas próprias mulheres, que hoje gera algum retorno financeiro para elas, todavia, passa por dificuldades de cunho material e de também carece de assistência técnica próxima.

A horta começou de forma modesta, com um pequeno viveiro de mudas instalado na casa de Ana Maria, uma das assentadas, que possuía cisterna. Com o tempo, ficou evidente a necessidade de um espaço coletivo para fortalecer os projetos das mulheres. Atualmente, as mulheres produzem principalmente hortaliças em pequena escala e comercializam para um restaurante da cidade de Açu e no próprio assentamento. O grupo de mulheres já recebeu a iniciativa do algodão agroecológico, implantado através do Projeto Algodão Agroecológico Potiguar (PAAP) com ajuda da Coopervida (Umarizal) e da CPT, que já teve duas colheitas — plantadas apenas no período chuvoso, no entanto, apenas 6 mulheres trabalharam no plantio e relataram que o projeto não foi tão bem sucedido quanto esperado, pois a área era pequena e não houve chuvas o suficiente para promover uma boa colheita.

A gestão dos projetos é feita de forma coletiva, aproveitando as habilidades de cada mulher, mas a dificuldade em delegar tarefas, devido ao analfabetismo, é um obstáculo. Uma das grandes metas do grupo é construir uma sede própria. Enquanto isso, cultivam algumas culturas como tomate cereja, couve, coentro, alface, cebolinha e beterraba, utilizando cinza de fogão e palha de carnaúba como adubação. Samara Rejane, atual liderança do grupo Sementes da Terra, ressalta a necessidade de assistência técnica mensal para fortalecer a produção.

Apesar de muitas mulheres participarem do grupo, cerca de $\frac{1}{3}$ comparece regularmente à horta. Mesmo assim, a participação feminina nas atividades coletivas é maior que a dos homens. Alguns projetos são exclusivos para mulheres, e, em certos casos, os homens chegam a sugerir o uso de agrotóxicos — prática que o grupo rejeita, mantendo a produção agroecológica. Cada mulher tem seu quintal produtivo em casa, mas a falta de engajamento de alguns líderes do assentamento — como o ex-presidente e a atual presidente — em relação às atividades do grupo feminino é um desafio adicional. Apesar das dificuldades, as mulheres do "Sementes da Terra" seguem firmes na luta, cultivando alimentos sem veneno e também buscando construir sua autonomia enquanto coletivo organizado de mulheres.

História de vida e perfil socioeconômico

A análise dos dados socioeconômicos de 15 mulheres do assentamento Professor Maurício de Oliveira, no município de Açu/RN, revela um conjunto de características que dialoga fortemente com os desafios enfrentados por mulheres rurais no contexto do semiárido brasileiro. As participantes possuem, em média, 56 anos de idade, com faixa etária variando de 38 a 75 anos. Essa predominância de mulheres adultas e idosas se mostrou uma questão importante a ser analisada sob a perspectiva da atividade laboral, pois foi possível observar vulnerabilidades relacionadas ao envelhecimento, como limitações físicas, que apontam para a necessidade de iniciativas que acolham tais dificuldades. Todavia, a maior parte das mulheres se orgulha e gosta de trabalhar com a terra, a exemplo da guardiã e coletora de sementes Ana Maria que ressalta “Eu me acho na caatinga, eu me acho no meu roçado, no meu quintal” apontando especialmente para a profunda conexão com a terra, que, apesar dos fatores limitantes, como o baixo retorno financeiro, não deixa de ser parte importante da identidade das camponesas.

A maioria das mulheres se declara casada, embora o grupo também incluía mulheres separadas, viúvas e solteiras. A composição familiar se divide em: sete mulheres dividem a responsabilidade do domicílio com seus companheiros, cinco são as únicas responsáveis pela família e em cinco casos os dados não foram especificados. Essa distribuição evidencia a centralidade das mulheres na sustentação doméstica, especialmente em contextos onde o apoio do Estado ou do parceiro é limitado. Em 2022, as mulheres no Brasil dedicaram quase o dobro de tempo que os homens aos cuidados de pessoas e aos afazeres domésticos — 21,3 horas semanais contra 11,7 horas. Essa sobrecarga é ainda mais acentuada entre aquelas em situação de vulnerabilidade social, que muitas vezes assumem sozinhas o papel de principais provedoras do grupo familiar, sendo responsáveis não apenas pela manutenção da casa e das atividades agrícolas, mas também pelo sustento econômico e pela administração da renda (IBGE, 2014; IBGE, 2022). Quanto às fontes de renda, observa-se uma forte dependência de benefícios sociais, como aposentadoria rural e Bolsa Família, além de práticas pontuais de comercialização de excedentes da produção agroecológica. Três mulheres não possuem fonte de renda fixa, sendo economicamente auxiliadas por familiares ou mantendo uma relação esparsa com o mercado. Outras combinam múltiplas estratégias, como venda de plantas ornamentais, coleta de sementes, meliponicultura e trabalhos educativos em programas públicos. Esse cenário revela uma fragilidade no vínculo empregatício dessas mulheres, que acabam por realizar várias atividades de maneira informal e sem renda fixa.

Este cenário evidencia a divisão sexual do trabalho, onde a mulher passa pela invisibilidade de seu trabalho, tanto no âmbito do espaço doméstico quanto no campo. As atividades produtivas e reprodutivas são fundamentais para a manutenção do status quo do sistema capitalista e do patriarcado, sendo frequentemente desvalorizadas e tratadas como meros

complementos ao trabalho masculino. Essa desvalorização reflete-se também na baixa remuneração e na dificuldade de acesso a direitos e políticas públicas, perpetuando desigualdades de gênero e limitando o reconhecimento do protagonismo feminino no meio rural.

A escolaridade do grupo é predominantemente baixa. Das entrevistadas, cinco não possuem alfabetização formal, sete concluíram até o ensino fundamental, duas possuem ensino médio e apenas uma declarou ter ensino superior (pedagogia). Um outro fato importante é a questão da sucessão geracional no campo, que se refere ao processo de continuidade das atividades agrícolas entre diferentes gerações, favorecendo a permanência das famílias no campo e a reprodução social da agricultura familiar. No assentamento, a maioria das mulheres relata que os seus filhos já não moram mais no assentamento, que foram trabalhar na cidade, estudar ou que não possuem interesse nas atividades agrícolas, como relata a agricultora Joana Maria “Hoje eu ensino para os meus filhos, mas eles não querem negócio de agricultura, não”. Trata-se, portanto, de um fenômeno recorrente no campo brasileiro: o êxodo da juventude. Isso se explica em parte pela falta de acesso a políticas públicas e a desvalorização do trabalho rural, fatores que dificultam a renovação geracional e ameaçam a continuidade da vida no campo. A Tabela 1 apresenta o perfil geral das entrevistadas.

Nesse sentido, os dados analisados mostram a sobreposição entre os papéis produtivo, ou seja, atividades ligadas à geração de renda e produção de alimentos, e reprodutivo, que corresponde ao cuidado com a família, a casa e a manutenção da vida cotidiana. As mulheres acumulam funções como cuidadoras da casa, gestoras dos alimentos, educadoras das crianças, trabalhadoras da terra e articuladoras políticas em seus territórios. Tal sobrecarga é frequentemente naturalizada pelas estruturas familiares e pelas próprias políticas públicas que, em sua maioria, ao ignorarem a divisão sexual do trabalho, contribuem para sua perpetuação. A agroecologia e a bioeconomia, nesse contexto, aparecem não apenas como uma alternativa de produção, mas como espaço de construção de autonomia e transformação das relações de gênero — ainda que essa transição seja lenta e conflituosa.

Atividades agrícolas: da produção à comercialização

As entrevistas realizadas com as agricultoras mostram trajetórias marcadas por uma inserção precoce no trabalho rural, geralmente iniciada ainda na infância, entre os 7 e 10 anos de idade. Esse processo se dava quase sempre em companhia dos pais e familiares, formando um aprendizado prático o qual utilizam até hoje, entretanto, muitas mulheres relatam que a maneira de plantar os alimentos mudou bastante da geração dos pais para as delas, ressaltando principalmente a diminuição da utilização de veneno e a aparente diminuição da fartura na colheita. A falta de acesso à terra própria levou muitas mulheres a trabalharem como meeiras ou diaristas em propriedades de terceiros, o que reforça a condição de exploração da força de trabalho camponesa, como aponta Siliprandi (2015) ao discutir a permanência de relações de dependência no campo.

O cotidiano das entrevistadas revela a sobreposição entre o trabalho produtivo e o trabalho reprodutivo. O espaço destinado à produção agrícola pode ser dividido em: quintais produtivos, um espaço ao redor da casa utilizado para o cultivo de alimentos, plantas medicinais e criação de animais, e os roçados, espaço destinado à plantação de culturas alimentares de subsistência, que neste caso, fica localizado em lotes distantes da residência. Nota-se que há uma maior diversidade de espécies nos quintais produtivos em detrimento dos roçados (Gráfico 1). As mulheres atuam simultaneamente no cultivo de feijão, milho, hortaliças e frutas, no cuidado com hortas, quintais e roçados, na criação de animais, além de

acumularem tarefas domésticas como preparo das refeições, limpeza do terreiro e busca de água. No que se refere às práticas agrícolas, observa-se forte valorização da agroecologia como alternativa produtiva e como princípio de cuidado. A maioria das mulheres rejeita o uso de agrotóxicos, recorrendo a práticas tradicionais de adubação orgânica (esterco de gado e galinha, cinzas, folhas secas, palha de carnaúba) e de defensivos naturais preparados a partir de plantas como o nim, combinados com cinza, leite, rapadura e outros insumos locais.

Em relação às sementes crioulas, algumas agricultoras mantêm práticas de seleção e armazenamento de sementes de milho, feijão, sorgo e fava, utilizando técnicas como o silamento em tambores ou o uso de alho para evitar pragas. Entretanto, muitas relatam dificuldades em manter estoques próprios, dependendo da distribuição por órgãos como a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) ou enfrentando escassez diante de safras ruins. Nesse ponto, evidencia-se a necessidade de um fortalecimento na concepção ideológica e prática que as sementes crioulas representam para que políticas estruturantes sejam implementadas, a exemplo o programa Convivência com o Semiárido, lançado em 2015 pela Articulação Semiárido Brasileiro (ASA) que reforça a cultura do estoque no Semiárido, através do manejo da agrobiodiversidade, com foco no resgate e conservação de sementes crioulas.

A divisão sexual do trabalho apresenta nuances: em alguns casos há relatos de parcerias equitativas entre casais, em que homens e mulheres dividem igualmente o plantio, a colheita e até a comercialização. Contudo, em boa parte das falas, observa-se a reprodução de papéis tradicionais: as mulheres concentram-se em tarefas de manejo contínuo (hortas, quintais, animais, colheitas leves), enquanto os homens ficam responsáveis pelas atividades consideradas pesadas, como arar o solo, operar máquinas, lidar com cargas e cuidar do roçado, que fica distante da residência. Em situações de ausência ou limitação física dos homens, muitas mulheres assumem integralmente a produção, evidenciando tanto a sobrecarga quanto a autonomia conquistada nesse processo.

Em relação à diversidade de culturas, cultivadas tanto nos quintais produtivos quanto nos roçados, foi observado o total de 52 plantas. Os cultivos mais comuns são feijão, milho, hortaliças e frutas regionais (conforme o Gráfico 2), sendo o feijão destacado como a principal fonte de consumo e renda. A comercialização, contudo, é limitada e realizada em pequena escala: algumas agricultoras participam de feiras comunitárias e agroecológicas, como a Feira da Lua e a Rede Xique Xique; outras vendem para restaurantes locais, postos florestais ou vizinhos; há ainda a troca dentro do assentamento, com vizinhos que já conhecem a produção das mulheres.

Já em relação à criação de animais domésticos, foram observados 12 espécies, sendo as galinhas e ovelhas as mais comuns. Em geral, a lógica da produção é voltada para a subsistência, e somente os excedentes são destinados à comercialização. Casos específicos de diversificação produtiva também aparecem, como o algodão agroecológico, as mudas ornamentais e medicinais e a criação de galinhas caipiras e ovinos, indicando alternativas para geração de renda, ainda que não proporcionem ganhos financeiros expressivos.

Políticas públicas e programas sociais

As mulheres assentadas do PA Prof. Maurício de Oliveira possuem participação em políticas públicas e projetos do setor privado que visam fortalecer a agricultura familiar e garantir a inclusão das mulheres nos espaços produtivos. Entre as iniciativas do governo federal, destacam-se o Projeto Fomento Mulher, voltado à inclusão produtiva de mulheres

agricultoras (com quatro beneficiárias); a participação no Pacto Nacional pela Alfabetização; e o acesso ao Programa Agroamigo, linha de microcrédito rural do Banco do Nordeste destinada a agricultores enquadrados no Pronaf. Do lado do governo estadual, algumas mulheres integram o Projeto Algodão Agroecológico Potiguar (PAAP), que incentiva práticas sustentáveis de produção. Também há três beneficiárias da Compra Direta da EMATER, uma política pública de comercialização institucional.

No que se refere ao setor privado, as mulheres estão inseridas em iniciativas como o projeto “Mulheres do Nosso Bairro”, da Engie (empresa multinacional de origem francesa que atua nos setores de energia elétrica); o Projeto Cocoricó, também da Engie; o projeto “Quintais Produtivos”, promovido pelo CF8 e voltado à criação de aves (com dez beneficiárias); o projeto “Abelhas”, desenvolvido pela Vale Sustentável; e ações de alfabetização promovidas pela SCATEC (empresa de geração de energia solar).

É inegável que houve um crescimento de ações que foram efetivadas nos últimos anos no Brasil, na forma de programas e ações governamentais voltadas para a promoção de uma maior equidade de gênero. Isso se deveu à existência de setores governamentais sensíveis a essas questões (Siliprandi, 2015), todavia, tais ações ainda se mostram aquém do necessário para garantir a emancipação e a autonomia das mulheres camponesas.

Conclusão

Os dados apresentados ao longo deste relatório mostram a complexidade e a potência da atuação das mulheres do PA Prof. Maurício de Oliveira, que lutam e resistem construindo modos sustentáveis, baseados na agroecologia, no semiárido potiguar. Com perfil socioeconômico marcado por baixa renda, escolaridade limitada e forte presença na economia informal, essas mulheres exercem funções centrais na produção agrícola e no cuidado com as famílias e o território, embora ainda enfrentem invisibilidade e baixa representação nos espaços de decisão.

A sobrecarga de trabalho — tanto nas atividades reprodutivas quanto nas produtivas — é uma realidade constante, agravada pela precariedade das infraestruturas básicas, como o acesso à água, e pela fragilidade das políticas públicas voltadas ao campo. Apesar disso, destaca-se a predominância de práticas agroecológicas baseadas em saberes tradicionais, como o uso de sementes crioulas, adubação orgânica e manejo sem agrotóxicos, demonstrando a contribuição efetiva das mulheres para a conservação da biodiversidade e a promoção da soberania alimentar.

Entretanto, a ausência de assistência técnica contínua e o acesso fragmentado a políticas públicas — como crédito, cisternas e programas de comercialização — limitam o pleno desenvolvimento dessas iniciativas. Torna-se urgente, portanto, o fortalecimento das cadeias produtivas locais e a ampliação das oportunidades de acesso a mercados justos e solidários.

Por fim, o presente estudo reforça a importância de reconhecer o protagonismo das mulheres na construção de uma bioeconomia enraizada na realidade do semiárido. A valorização de seus saberes, práticas e trajetórias é essencial para a promoção da justiça social, da equidade de gênero e da sustentabilidade nos territórios rurais. O apoio à permanência no campo e à sucessão geracional passa, necessariamente, pelo fortalecimento de políticas públicas que

considerem as especificidades e potências das mulheres camponesas como agentes centrais da transformação ecológica e social.

Referências

ALBUQUERQUE, U. P.; CUNHA, L.V.F. C.; LUCENA, R.F.P.; ALVES, R.R.N. Methods and techniques in ethnobiology and ethnoecology, New York: Springer Media, 2014.

ALTIERI, Miguel A. Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 4. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2004.

AMOROZO, M. C. M., MING, L. C.; SILVA, S. P. (ed.). Métodos de coleta e análise de dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas correlatas. Rio Claro: UNESP/CNPQ, 2002.

ANTONGIOVANNI, M., VENTICINQUE, E. M., & FONSECA, C. R. (2018). Fragmentation patterns of the Caatinga drylands. *Landscape Ecology*, 33(8), 1353–1367. doi: 10.1007/s10980-018-0672-6

BARRIENTOS, S., BIANCHI, L., BERMAN, C. (2019) Gender and governance of global value chains: Promoting the rights of women workers. *International Labour Review* 158: 729–752.

BARDIN, Laurence. Análise de conteúdo. Lisboa: Edições 70, 2007.

BIRNER, R. (2018). Bioeconomy Concepts. *Bioeconomy*. Cham: Springer. Doi:10.1007/978-3-319-68152-8_3

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Governo Federal lança Plano Safra 2025/2026 com R\$ 516,2 bilhões para impulsionar o agro brasileiro. Brasília: MAPA, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/governo-federal-lanca-plano-safra-2025-2026-com-r-516-2-bilhoes-para-impulsionar-o-agro-brasileiro>. Acesso em: 24 ago. 2025.

COSTA, Francisco de Assis; NOBRE, Carlos; GENIN, Carolina; FRASSON, Caroline Medeiros Rocha; FERNANDES, Danilo Araújo; SILVA, Harley; VICENTE, Iara; SANTOS, Inaiê Takaes; FELTRAN-BARBIERI, Rafael; VENTURA NETO, Raul; FOLHES, Ricardo. Uma bioeconomia inovadora para a Amazônia: conceitos, limites e tendências para uma definição apropriada ao bioma floresta tropical. Texto para discussão. São Paulo: WRI Brasil, jun. 2022. Disponível em: <https://wribrasil.org.br/pt/publicacoes>. Acesso em: 12 ago. 2025.

MOTA, Dalva Maria da; SILIPRANDI, Emma; PACHECO, Maria Emília Lisboa (ed. técnicas). Soberania alimentar: biodiversidade, cultura e relações de gênero. Coleção Transição Agroecológica, vol. 5. Brasília, DF: Embrapa, 2021. 391 p. ISBN 978-65-87380-09-4 sinprod.org.br

SILIPRANDI, Emma (org.). Mulheres e agroecologia: transformando o campo, as florestas e as pessoas. 2. ed. Rio de Janeiro: Expressão Popular; Articulação Nacional de Agroecologia, 2015.

PRADO JÚNIOR, Caio. Formação do Brasil Contemporâneo: Colônia. 23. ed. São Paulo: Brasiliense, 2000. Publicado originalmente em 1942.

SAUER, Sérgio; CASTROÂ , Luís Felipe Perdigão de. LUTAS PELA TERRA NO BRASIL: sujeitos, conquistas e direitos territoriais. *Abya-yala: Revista sobre Acesso à Justiça e Direitos nas Américas*, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 245–272, 2017. DOI: 10.26512/abyayala.v1i2.7031. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/abya/article/view/7031>. Acesso em: 19 abr. 2025.

THEEUWEN, A., DUPLAT, V., WICKERT, C., TJEMKES, B. (2021). How Do Women Overcome Gender Inequality by Forming Small-Scale Cooperatives? The Case of the Agricultural Sector in Uganda. *Sustainability* 13: 1797-1801.

Anexos

Figura 1: Mulheres assentadas do grupo “Sementes da Terra” fazendo o manejo da horta comunitária. Fonte: Dados da Pesquisa, 2025.

Tabela 1: Perfil geral das entrevistadas. Fonte: Dados da pesquisa de campo no PA Prof. Maurício de Oliveira, 2025.

Gráfico 1: Diversidade de espécies e número de citações de plantas cultivadas nos quintais e roçados.

Gráfico 2: Espécies mais citadas nos quintais e roçados (> 5 citações).

Figura 2: Criação de animais domésticos. (a) Ganso; (b). Gato; (c) Pavão; (d) Cabra; (e) Boi; (f) Galinha.

CÓDIGO: SB1236

AUTOR: LIVIAN MARIA SILVA DOS SANTOS

ORIENTADOR: MANUELA SALES LIMA NASCIMENTO

TÍTULO: Avaliação do Sistema Imunológico de crianças com Sífilis Congênita

Resumo

A bactéria *Treponema pallidum*, causadora da sífilis, pode atravessar a barreira placentária e infectar o feto, resultando em natimortalidade e malformações. Este estudo busca investigar o impacto da infecção congênita por *T. pallidum* no sistema imunológico de recém-nascidos, e relacionar, ainda, com comorbidades maternas. Os pacientes foram recrutados na Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC/UFRN), mediante assinatura de TCLE. Dados clínicos materno-fetais e amostras de sangue dos bebês foram coletados e classificados em diferentes grupos, divididos em infectados ou não, e ainda: CT (grupo controle vacinado), CTNV (controle não vacinado), SC (sífilis congênita vacinados), SCNV (sífilis congênita não vacinados), SE (sífilis exposta) e SENV (sífilis exposta não vacinado). Foram realizados hemogramas e esfregaços sanguíneos para análise morfológica e contagem diferencial dos leucócitos. O soro seria utilizado no imunodiagnóstico da sífilis por VDRL e na quantificação de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α) e quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) pelo método Cytometric Bead Array (CBA) em citômetro BD Accuri. Prontuários maternos e dos recém-nascidos forneceram dados sobre comorbidades, idade, trimestre da infecção, exames bioquímicos e hemogramas. Assim, foi possível caracterizar as células sanguíneas de crianças infectadas de forma quantitativa analisando hemogramas, e compreender a influência das comorbidades maternas.

Palavras-chave: sífilis; congênita; infecção congênita; perfil imunológico;

TITLE: Evaluation of the Immune System of Children with Congenital Syphilis

Abstract

The bacterium *Treponema pallidum*, which causes syphilis, can cross the placental barrier and infect the fetus, resulting in stillbirth and malformations. This study seeks to investigate the impact of congenital *T. pallidum* infection on the immune system of newborns and to relate it to maternal comorbidities. Patients were recruited at the Januário Cicco Teaching Maternity Hospital (MEJC/UFRN) after signing an informed consent form. Maternal-fetal clinical data and blood samples from the babies were collected and classified into different groups, divided into infected or uninfected, and also: CT (vaccinated control group), CTNV (unvaccinated control), SC (vaccinated congenital syphilis), SCNV (unvaccinated congenital syphilis), SE (exposed syphilis), and SENV (unvaccinated exposed syphilis). Blood counts and blood smears were performed for morphological analysis and differential leukocyte count. The serum would be used in the immunodiagnosis of syphilis by VDRL and in the quantification of cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α) and chemokines (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) by the Cytometric Bead Array (CBA) method in a BD Accuri cytometer. Maternal and newborn medical records provided data on comorbidities, age, trimester of infection, biochemical tests, and blood counts. Thus, it was

possible to characterize the blood cells of infected children quantitatively by analyzing blood counts and to understand the influence of maternal comorbidities.

Keywords: syphilis; congenital; congenital infection; immune profile; cytokines.

Introdução

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria espiroqueta *Treponema pallidum*, que pode ser transmitida verticalmente da mãe para o feto por via placentária, caracterizando a sífilis congênita (1). As consequências da infecção durante a gestação podem ser severas, incluindo parto prematuro, aborto espontâneo, natimorto, malformações congênitas, restrição de crescimento intrauterino e deficiências graves (2). Após o nascimento, os recém-nascidos infectados podem apresentar anemia severa, esplenomegalia, hepatomegalia, problemas neurológicos, cegueira, surdez, meningite, icterícia, alterações ósseas e erupções cutâneas (3), sintomas que também podem se manifestar na sífilis congênita tardia.

Embora tratável e com capacidade de prevenção, a sífilis permanece como uma epidemia silenciosa. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta a sífilis congênita como a segunda principal causa de natimortos no mundo. No Brasil, a incidência aumentou de 1,9/1.000 nascidos vivos em 2007 para 9/1.000 em 2018 (4). Em 2020, no Brasil, registrou-se taxa de 7,7/1.000 casos em nascidos vivos, com mortalidade de 6,5/1.000 (5), revelando um desafio crescente para a saúde pública.

Apesar da gravidade, pouco se conhece sobre como a infecção congênita por *T. pallidum* afeta o equilíbrio do sistema imunológico neonatal e, consequentemente, a saúde a longo prazo dessas crianças. Evidências mostram que crianças infectadas congenitamente por vírus como Epstein-Barr e citomegalovírus apresentam perfil imune Th2 persistente, que sobrepõe a resposta Th1, essencial contra bactérias e vírus, até pelo menos dois anos de idade, aumentando risco de alergias e susceptibilidade a infecções (6). Nosso grupo já demonstrou que pacientes com Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZ) exibem aumento de eosinófilos, neutrófilos hipersegmentados e linfócitos atípicos, além de níveis elevados de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IFNs tipo I, ausentes em crianças saudáveis. Esses pacientes também apresentam memória imune deficiente e alta prevalência de alergias associadas a níveis elevados de IgE (7,8). Outro estudo apontou que a obesidade materna pode impactar negativamente a imunidade antiviral de bebês expostos ao Zika, mostrando que comorbidades maternas também afetam a imunidade neonatal (9).

Diante disso, esse projeto buscou investigar as consequências imunológicas da sífilis congênita, buscando compreender desbalanços em células imunes, anticorpos, produção de citocinas, além da memória imunológica e suas implicações futuras. Junto com a comparação entre crianças infectadas e saudáveis, a análise de possíveis correlações das comorbidades maternas com o desenvolvimento da criança também foi alvo da pesquisa.

Metodologia

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, pelo protocolo N° 12821, começamos o recrutamento das mães na Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC). Os critérios envolvendo o grupo controle englobam mães que não registraram nenhum tipo de infecção

durante a gestação, mas podem apresentar comorbidades, e recém-nascido de no mínimo 32 semanas pesando mais de 1,5kg. O grupo de infectados segue os mesmos critérios, mas tendo o histórico da infecção por sífilis.

O recrutamento além de separar as gestantes em grupo controle e infectado por sífilis, também separou por vacinados e não vacinados, pois foi-se determinado ao longo do projeto a necessidade de ter esses dois comparativos, porém, a prioridade é de bebês não vacinados, para que se tenha o mínimo de alteração nas amostragens. Além disso, crianças expostas à sífilis durante a gestação também é um grupo separado da sífilis congênita, tendo os critérios a serem seguidos para essa separação dados pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs), disponibilizado pelo Ministério da Saúde (10).

Dessa forma, até o momento recrutamos recém-nascidos do grupo controle vacinado, controle não vacinado, expostos a sífilis vacinados, expostos a sífilis não vacinados, e sífilis congênita. Foram recrutados 10 controles vacinados (CT), 20 controles não vacinados (CNV), 02 expostos à sífilis vacinados (SE), 05 expostos à sífilis não vacinados (SENV) e 02 sífilis congênita (SC), faltando ainda representantes para o grupo de sífilis congênita não vacinados (SCNV). Todos os RN seguem o mesmo padrão de coleta, um tubo de heparina, um de EDTA e um tubo com gel sem anticoagulante. A partir do tubo de heparina de cada amostra, assim que foi coletado, foram retirados 200 uL e colocados em tubo criogênico RNase free, contendo 350uL de RLT + 3,5 uL de B-mercaptoetanol para conservação do material, no caso, para as amostras que continham mais de 200uL no tubo de heparina, preencheram-se vários tubos criogênicos, colocando 200uL de sangue total em cada um deles. Posteriormente os tubos criogênicos foram e armazenados em freezer -80°C do Laboratório Multiusuário de Pesquisa Translacional da MEJC gerenciado pela Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP), e serão utilizados posteriormente para outros testes dentro do projeto geral.

Os tubos de EDTA de cada amostra foram utilizados para realizar esfregaço sanguíneo, com o sangue recém coletado, foram feitas 5 lâminas de esfregaço para cada amostra de recém-nascido, utilizando 5uL para cada lâmina, e foram coradas posteriormente com o Kit Corante Rápido (Panótico). A amostra excedente do eppendorf foi aliquotada nos tubos criogênicos com 350uL de RLT + 3,5 uL de B-mercaptoetanol, visando não desperdiçar a amostra do recém-nascido, e também armazenada no freezer de -80°C.

Os tubos com gel e sem anticoagulante, assim que coletados, foram levados para centrífuga, com intuito de separar o soro, posteriormente, foi aliquotado 4 vezes 60 uL do soro de cada amostra em eppendorfs, e posteriormente armazenado no freezer de -80°C, para ser utilizado em experimentos de CBA (Cytometric Bead Array), buscando analisar as citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TNF- α , e as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, com o citômetro BD Accuri C6.

Além da coleta de amostras, os prontuários das mães e dos recém-nascidos foram coletados e salvos para posterior análise, contendo anamnese e exames realizados durante a internação. Até o momento, analisamos os tipos de comorbidades que afetam as mães recrutadas, dividindo entre os grupos, e também analisamos de forma quantitativa as células sanguíneas presentes nos hemogramas dos recém-nascidos, e na parte bioquímica a presença da proteína C reativa (PCR). Todas as análises foram feitas utilizando o GraphPad Prism, com os testes Shapiro-Wilk, t-student e Mann-Whitney.

Resultados e Discussões

O resultado do Comitê de Ética atrasou o andamento do plano de trabalho, demorando quase 1 ano para ser aprovado, dessa forma, não tivemos tempo para realizar alguns dos experimentos programados, como a pesquisa de citocinas pelo método Cytometric Bead Array (CBA). Apesar desse empecilho, análises feitas pelo GraphPad Prism utilizando prontuários dos recém-nascidos e das mães nos deram alguns resultados sugestivos.

Obtivemos a separação das comorbidades que afetam as mães, no qual para o grupo controle vacinado (CT), a Hipertensão Arterial Gestacional (HAG) e a Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) empataram, com 43%. Para o grupo de controle não vacinados (CNV), a maior comorbidade foi a HAG, com 35%; para o grupo de sífilis exposta em não vacinados (SENV) foi a Diabetes Mellitus Gestacional, com 25%; e, dentro do grupo de sífilis congênita, a drogadição com 50%, porém, a ausência de comorbidades é predominante nos grupos CNV, SE, SENV e SC, tendo, respectivamente, os valores: 40%, 100%, 75% e 50% (Figura 1).

Para análise dos hemogramas e parte bioquímica, com o resultado do teste de normalidade por Shapiro-Wilk, e posteriores testes t-Student, Mann-Whitney, Tukey test ou Dunn test (dependendo da normalidade), obtivemos alguns níveis de significância em determinadas comparações.

Dentro das análises de hemograma, comparando o grupo controle vacinado (CT) com o sífilis exposta vacinado (SE) e com o sífilis congênita vacinado (SC), obtivemos diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de linfócitos totais entre CT e SE, tendo um maior valor para os recém-nascidos expostos à sífilis (média = 5363.5 linfócitos/mm³), enquanto as outras células sanguíneas não apresentaram diferença significativa (Figura 2 e 3).

Outra análise de hemograma com diferença significativa ($p < 0,05$) utilizando o teste t-student para comparação, foi entre o grupo controle não vacinado (CNV) e o grupo sífilis exposta não vacinado (SENV), observando um $p < 0,05$ no quantitativo da porcentagem de monócitos no hemograma dos recém-nascidos, tendo o grupo controle um número maior dessas células sanguíneas (média = 10%), e dentro da comparação das outras células não se obteve diferença significativa (Figura 4 e 5).

Para análise de bioquímica, foi-se feito comparação com relação aos níveis da proteína C reativa dos recém-nascidos, tendo os grupos CT + SC, CT + SE, e CNV + SENV (Figura 6), obtendo diferença significativa ($p < 0,05$) em teste de t-student na análise do controle vacinado com sífilis exposta vacinado.

Todos esses resultados trazem sugestões do que poderemos encontrar futuramente com um maior número amostral para comparações, no qual, por exemplo, o valor de linfócitos totais ser elevado em recém-nascidos que foram expostos à sífilis durante a gravidez comparando com o grupo controle, podendo ser correlacionado com a presença do patógeno *T. pallidum*. Da mesma forma, a presença de maior quantidade da proteína C reativa, presente em infecções, nos recém-nascidos expostos à sífilis. Porém, como o número amostral ainda não se encontra adequado para confirmações, e mais testes serem necessários para tal concretização, podemos, por enquanto, apenas confirmar sugestões acerca do impacto da presença da infecção pela sífilis durante a gravidez.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho, embora preliminares, apontam para alterações imunológicas relevantes em recém-nascidos expostos ao *Treponema pallidum* durante a gestação. As diferenças significativas observadas no hemograma e nos níveis de proteína C reativa entre os grupos de controle e os grupos expostos ou com sífilis congênita sugerem que a infecção materna exerce impacto direto sobre parâmetros hematológicos e inflamatórios neonatais. Esses achados reforçam a hipótese de que a sífilis congênita pode gerar desbalanços importantes na imunidade neonatal, ainda que o número reduzido de amostras limite a robustez das conclusões.

O número amostral pequeno torna as análises muito sugestivas, necessitando ainda de um maior recrutamento para definir as estatísticas de forma mais concreta respondendo às hipóteses, necessitando de maior tempo para o desenvolvimento da pesquisa. Apesar disso, também podemos concluir que a pesquisa está tomando um rumo consistente, e com o desenvolver das análises será possível determinar o fim desse percurso.

Portanto, este estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre a relação entre sífilis congênita e imunidade neonatal, oferecendo pistas que deverão ser exploradas em pesquisas futuras com maior número amostral e técnicas adicionais, como a análise de citocinas e memória imunológica. Os achados até aqui obtidos reforçam a urgência de medidas mais efetivas de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento adequado da sífilis durante a gestação, de modo a reduzir os riscos para a saúde neonatal e minimizar os impactos a longo prazo na qualidade de vida dessas crianças. Com isso, a pesquisa será continuada no próximo plano de trabalho, buscando expandir o número amostral, para ampliar a acurácia das análises, e com maior tempo para desenvolver os testes que não foram possíveis de serem feitos, como, no caso, a quantificação de citocinas por CBA.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Sífilis 2024. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2024.
2. WEIWEI, L. et al., (2023) Research progress on the mechanism of *Treponema pallidum* breaking through placental barrier, *Microbial Pathogenesis*, Vol. 185.
3. Adhikari EH, Fidel PL Jr, Pedrosa MA, Congenital Syphilis: A Contemporary Review. *Pathogens*. 2020 Jul 15;9(7):577. doi: 10.3390/pathogens9070577. PMID: 32679727; PMCID: PMC7400582.
4. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Boletim Epidemiológico de HIV-AIDS-IST. Programa Estadual de IST/Aids de São Paulo 36, 1. https://www.saude.sp.gov.br/resources/crt/vig.epidemiologica/boletim-epidemiologico-crt/boletim_2019.pdf. (2019).
5. Ministério da Saúde (2021) Boletim Epidemiológico de sífilis. Disponível em <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2021> acessado em 03/07/2022.

- 6.SAGHAFIAN-HEDENGREN S et. al., (2009) Herpesvirus seropositivity in childhood associates with decreased monocyte-induced NK cell IFN-gamma production. J Immunol., Vol. 182, pp. 2511–2517.
- 7.SALMERON ACA et. al., (2022) Immunological imbalance in microcephalic children with congenital Zika virus syndrome. Med Micro and Immun.
- 8.BEZERRA WP et al., (2023) Innate immune response in patients with acute Chikungunya disease. Med Micro and Immun
- 9.BRANCO, ACCC. Efeito da obesidade na imunidade antiviral da interface materno-fetal na infecção por Zika vírus. 2023. 97p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.
- 10.BRASIL. Ministério da Saúde (2022) Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs). Disponível em https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/pcdts/2022/ist/pcdt-ist-2022_isbn-1.pdf/view. Acesso em: 25 de agosto de 2025.

Anexos

Figura 2 - Comparativo Hemograma grupos CT x SE x SC; a) hemácias totais; b) leucócitos totais; c) neutrófilos totais; d) neutrófilos parciais; e) linfócitos totais; f) linfócitos parciais. Obtivemos diferença significativa apenas para linfócitos totais d

Figura 3 - Comparativo Hemograma grupos CT x SE x SC; a) monócitos totais; b) monócitos parciais; c) eosinófilos totais; d) eosinófilos parciais; e) basófilos totais; f) basófilos parciais. Não obtivemos diferença significativa em nenhum desses resultados

Figura 4 - Comparativo Hemograma grupos CT x SE x SC; a) hemácias totais; b) leucócitos totais; c) neutrófilos totais; d) neutrófilos parciais; e) linfócitos totais; f) linfócitos parciais. Não obtivemos diferença significativa em nenhum desses resultados

Figura 5 - Comparativo Hemograma grupos CT x SE x SC; a) monócitos totais; b) monócitos parciais; c) eosinófilos totais; d) eosinófilos parciais; e) basófilos totais; f) basófilos parciais. Obtivemos diferença significativa apenas para monócitos parciais

Figura 1 - Grupos: CT - controle vacinado; CNV - controle não vacinado; SE - sífilis exposto vacinado; SENV - sífilis exposto não vacinado; SC - sífilis congênita vacinado; SENV - sífilis exposto não vacinado; SNV - sífilis congênita não vacinado. Comorb

Figura 6 - Comparativo PCR (proteína C reativa) grupos CT x SE x SC; grupos CNV x SENV. Obtivemos diferença significativa (p

CÓDIGO: SB1237

AUTOR: MARTHA DE MEDEIROS GALVAO

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Avaliação morfológica e morfométrica dos caracteres sexuais secundários dos camarões rosa que ocorrem na costa brasileira

Resumo

Este estudo avaliou a variabilidade morfológica entre as espécies de camarão rosa do gênero *Penaeus* encontrados na costa brasileira, utilizando morfometria geométrica, na busca de novos caracteres para diferenciação dessas espécies. Para tanto, foram utilizados 30 indivíduos por espécie, comprados em diferentes pontos de pesca e, em seguida, foram identificados, sexados e etiquetados. Na sequência, as estruturas sexuais secundárias foram fotografadas: téllico para indivíduos fêmeas e petasma para indivíduos machos, por meio de uma lupa digital. Posteriormente, foi utilizado o programa TpsUtil para criação do arquivo de entrada do TpsDig 2, para adição dos pontos anatômicos e da escala em cada foto. Feito isso, o MorphoJ foi utilizado com uma etapa prévia de: sobreposição de procrustes, análises de erro e busca de outliers, então, foram realizadas as análises de regressão forma-tamanho seguidos de uma PCA, CVA e DFA. Os resultados demonstram que, baseado no téllico, *P. brasiliensis* apresentou maior dissimilaridade entre as espécies avaliadas, enquanto *P. paulensis* e *P. subtilis* são muito similares, e *P. isabellae* ocupa uma posição intermediária. Por haver limitado número de petasmas em bom estado para a análise, não foi realizada a sua morfometria, porém revelou-se de alto valor taxonômico. Aqui ressaltamos a dificuldade de identificação entre as espécies-alvo e reforçamos a necessidade de novas abordagens, que possibilitem uma diferenciação mais eficaz dessas espécies.

Palavras-chave: Camarões comerciais; Morfometria geométrica; *Penaeus*.

TITLE: Morphological and morphometric evaluation of secondary sexual characteristics of pink shrimp occurring on the Brazilian coast

Abstract

This study evaluated the morphological variability among shrimp species of the genus *Penaeus* found along the Brazilian coast, using geometric morphometrics to identify new traits to differentiate these species. Thirty individuals per species were purchased from different fishing locations and subsequently identified, sexed, and labeled. Subsequently, the secondary sexual structures were photographed: the telicium for females and the petasmata for males, using a digital magnifying glass. Subsequently, the TpsUtil program was used to create the TpsDig 2 input file, adding landmarks and scale to each photo. Afterward, MorphoJ was used with a preliminary step of Procrustes overlay, error analysis, and outlier search. Then, shape-size regression analyses were performed, followed by PCA, CVA, and DFA. The results demonstrate that, based on the telicium, *P. brasiliensis* presented the greatest dissimilarity among the evaluated species, while *P. paulensis* and *P. subtilis* are very similar, and *P. isabellae* occupies an intermediate position. Because there were a limited number of

well-preserved petasmata for analysis, their morphometry was not performed, but they proved to be of high taxonomic value. Here, we highlight the difficulty in identifying the target species and reinforce the need for new approaches that enable more effective differentiation between these species.

Keywords: Commercial shrimp; Geometric morphometrics; *Penaeus*.

Introdução

Os camarões-rosa do gênero *Penaeus* Fabricius, 1798, como *P. brasiliensis* Latreille, 1817, *P. paulensis* Pérez Farfante, 1967, *P. subtilis* Pérez Farfante, 1967 e *P. isabelae* Tavares & Gusmão, 2016, distribuem-se amplamente pela costa atlântica da América do Sul, incluindo o Brasil, onde possuem grande importância econômica por serem um dos recursos pesqueiros mais explorados e valorizados no mundo (Dias-Neto e Dias, 2015). Seu elevado valor comercial, voltado tanto ao mercado interno quanto às exportações, os torna estratégicos para a economia pesqueira nacional (Dias-Neto et al., 2021). As capturas são realizadas principalmente pela pesca de arrasto, tanto industrial quanto artesanal, reforçando a necessidade de manejo sustentável para conservação dos estoques naturais (Costa et al., 2003; Silva et al., 2022).

A identificação correta das espécies é essencial para o manejo, o monitoramento ecológico e a conservação da biodiversidade (Wäldchen, 2022), além de aprimorar o entendimento da dinâmica ecológica e evolutiva (Fairbairn, 2016). Contudo, sua identificação ainda é desafiadora devido à alta similaridade morfológica. Tradicionalmente, os caracteres sexuais secundários — télico e petasma — têm sido empregados, mas sua utilidade é limitada, já que essas estruturas estão ausentes ou subdesenvolvidas em juvenis, tornando a identificação subjetiva e, por vezes, inconsistente (Timm, 2019). A correta delimitação taxonômica é fundamental para a biologia, a ecologia e o manejo (Teodoro et al., 2016), mas a semelhança morfológica entre espécies simpátricas, como as do grupo dos camarões-rosa, dificulta estatísticas pesqueiras e a fiscalização ambiental (Tavares & Gusmão, 2016; França et al., 2019; França et al., 2020; França et al., 2021).

As características morfológicas externas usadas tradicionalmente na identificação incluem sulco adrostral, carapaça, espinhos e, sobretudo, os caracteres sexuais secundários (télico e petasma). Essas estruturas distinguem bem indivíduos adultos, mas apresentam limitações em juvenis e subadultos, cujos caracteres sexuais ainda não estão plenamente desenvolvidos (Pérez-Farfante, 1969; Fransozo et al., 2012). Nesses casos, a sobreposição morfológica exige o uso de técnicas complementares.

Entre as abordagens modernas, destaca-se a morfometria geométrica, que analisa variação e covariação da forma biológica por meio de landmarks (LM). Essa técnica permite detectar diferenças sutis não perceptíveis em análises tradicionais, sendo eficaz na distinção de espécies crípticas ou com sobreposição de caracteres (Rohlf & Marcus, 1993; Klingenberg, 2011). Aplicações recentes em *Penaeus* mostraram sua utilidade na diferenciação entre espécies, no dimorfismo sexual e em variações ontogenéticas (Teodoro et al., 2016; Almeida et al., 2023).

A integração entre morfometria geométrica e genética molecular (DNA barcoding) também tem se mostrado promissora, especialmente em estágios ontogenéticos precoces. Essa combinação fortalece a taxonomia integrativa e aumenta a confiabilidade de estudos populacionais e ecológicos (Costa et al., 2020). Assim, compreender as variações

morfológicas e morfométricas dos caracteres sexuais secundários dos camarões-rosa contribui para sistemas de identificação mais precisos e para o manejo sustentável dos recursos pesqueiros brasileiros.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a variação morfológica entre as espécies de camarões-rosa na costa brasileira, com ênfase nos caracteres sexuais secundários (télico e petasma). Busca-se ampliar o conhecimento morfológico dessas espécies e reconhecer possíveis variações ao longo de sua distribuição, fornecendo subsídios para identificações mais precisas e para um manejo mais adequado.

Metodologia

2.1 Amostragem e coleta de dados

Indivíduos das espécies *Penaeus brasiliensis*, *P. isabellae*, *P. paulensis* e *P. subtilis* foram coletados por meio de compra em portos pesqueiros, em diferentes estados ao longo da costa brasileira (da região Norte a Sudeste do país), com o auxílio de uma rede de colaboradores. As amostragens foram realizadas usando barcos de pesca artesanal de camarão, os espécimes armazenados em caixas térmicas com gelo e enviados para o Laboratório de Ecologia e Evolução de Crustáceos (LABEEC), do Departamento de Botânica e Zoologia do Centro de Biociências (DBZ/CB), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

A identificação das espécies foi feita com base na literatura especializada (Tavares & Gusmão, 2016; Teodoro et al., 2016; França et al., 2019, 2021). Após isso, foram sexados com base na presença de petasma (masculino) ou télico (fêmea) e todas as amostras foram preservadas em etanol a 70%.

2.2 Morfometria Geométrica

Foram selecionados entre 25 e 30 indivíduos adultos de cada sexo e espécie do gênero *Penaeus* para fotografar num microscópio trinocular Kaisi K37050 equipado com uma câmera Kaisi HD4K conectada ao computador, usando posição e distância da estrutura padronizada. As estruturas foram tingidas com solução de azul de metileno para facilitar a visualização da delimitação da forma. No primeiro momento, foram feitas fotos por espécie, sendo uma de cada espécime. No segundo momento, foram feitas 8 fotos por espécie com o objetivo de identificar erros ou diferenças entre as fotos. O télico foi digitalizado em imagens bidimensionais padronizadas, e pontos anatômicos (LM) homólogos foram marcados em regiões diagnósticas da estrutura. As coordenadas foram submetidas à superposição de Procrustes Generalizada (GPA), que remove efeitos de posição, escala e rotação, restando apenas informações de forma. Dada a natureza bilateral do télico, foram extraídos os componentes simétricos da forma para análise, descartando variação assimétrica. A variação total da forma foi explorada por Análise de Componentes Principais (PCA) para identificar os principais eixos de variação morfológica. A discriminação entre espécies foi avaliada por Análise de Variáveis Canônicas (CVA), utilizando a espécie como critério de classificação. Os camarões machos não atingiram um número suficiente de indivíduos, além de apresentarem deformações no petasma e, por isso, não foram feitas fotos para a realização da morfometria geométrica.

O programa tpsDig 2.32 (Rohlf, 2018) foi utilizado para digitalizar dois pontos anatômicos e vinte pontos de curva (semi-landmarks) em cada lado do télico, de acordo com o critério de

homologia morfométrica (ver Bookstein, 1982), a partir do arquivo de entrada gerado no programa tpsUtil 1.83 (Rohlf, 2015). As imagens foram transformadas em arquivo tps, totalizando 115 fotos do primeiro momento, adicionando mais 32 (8 fotos de cada espécie) do segundo momento. Logo mais, criou-se duas cópias das 32 fotos do primeiro e segundo momento, totalizando 64 fotos, a fim de espelhar no arquivo tpsDig 2.32. Logo após, os pontos de curva foram transformados em pontos anatômicos, totalizando 42 LM em cada estrutura. Para realizar as análises no MorphoJ, houve substituição de vírgula por pontos no bloco de notas.

A CVA foi realizada utilizando os critérios de agrupamento de classificadores 'indivíduo', 'espécie', 'bateria' e 'tratamento' para investigar os graus de semelhança entre as formas do corpo dos indivíduos (espécimes) dentro do espaço multidimensional. Em seguida, a DFA foi aplicada para avaliar quais variações na forma poderiam ser usadas para distinguir, com segurança, as espécies. Em ambas as análises, os valores de probabilidade foram calculados usando testes com 1.000 permutações, compondo os resultados observados na matriz de validação cruzada de ambas as análises. Todas as análises foram realizadas no programa MorphoJ 1.08D® (Klingenberg, 2011).

Resultados e Discussões

A estrutura sexual secundária do camarão macho, o petasma, não pôde ser fotografada devido ao reduzido número de exemplares em bom estado de conservação. Os indivíduos estavam preservados em álcool por um longo período, o que ocasionou deformações nessa estrutura, resultando em um número amostral insuficiente para a aplicação da morfometria geométrica. Ainda assim, foi possível definir a posição mais adequada para a obtenção da imagem, sendo a vista dorso-lateral a que melhor evidencia as diferenças entre as espécies, conforme ilustrado na Figura 3, comparando o petasma de *P. subtilis* e *P. brasiliensis*, respectivamente (França, 2018).

A conformação do petasma varia não apenas entre espécies, mas igualmente entre indivíduos de uma mesma população, o que a torna uma ferramenta valiosa para estudos de morfometria geométrica (Teodoro, 2016), além de ter uma grande relevância taxonômica para a distinção entre as espécies do gênero *Penaeus*. A análise detalhada dessa estrutura pode contemplar diferentes características: o grau de curvatura das projeções distomediais, o comprimento relativo dos lobos, a simetria das margens laterais e a conformação geral da junção medial. Em algumas espécies, como *P. subtilis* e *P. brasiliensis*, a forma do petasma mostra-se eficaz na identificação de machos adultos (França, 2018).

A PCA do télico revelou que o eixo PC1 explica 88,53% da variação, evidenciando um gradiente morfológico dominante. Os eixos PC2 (3,79%) e PC3 (3,25%) somam pequena contribuição adicional. Foi observado que PB (*P. brasiliensis*) se destaca fortemente e as demais espécies apresentam maior sobreposição, embora PI (*P. isabellae*) e PS (*P. subtilis*) revelem diferenças entre si.

A CVA destacou-se na discriminação entre espécies: o CV1 representa 90,70% da separação e CV1+CV2 totalizam 97,62%. PB possui a estrutura nitidamente distinta em relação às demais, com clara separação visual do télico, enquanto o télico de PS e PP (*P. paulensis*) mostraram maior sobreposição de forma, e PI apresentou posição intermediária. A dispersão dos indivíduos confirma segregação morfológica: PB isolado, PI em posição intermediária, e proximidade entre PP e PS. Assim, tanto PCA quanto CVA apontam o télico como caráter

diagnóstico robusto. O predomínio de um único eixo de variação ($PC1 \approx 88,5\%$), que coincide com o principal eixo de separação entre espécies ($CV1 \approx 91\%$), sugere que um conjunto restrito de modificações morfológicas é suficiente para discriminar os quatro télicos. A distinção marcante de PB pode refletir pressões seletivas específicas ou trajetória evolutiva própria. Já a proximidade entre PP e PS pode ser explicada por ancestralidade recente, convergência funcional ou restrições estruturais que limitam a diversificação do télico (Gusmão, 2005). O Procrustes foi significativo ($p < 0,0001$), sendo PB com estrutura mais distinta (Procrustes $\approx 0,17-0,20$), enquanto PP e PS apresentaram maior proximidade (Procrustes = 0,0224).

Conclui-se que a morfologia do télico e do petasma apresenta elevado valor taxonômico no gênero *Penaeus*, oferecendo não apenas suporte para identificação específica, mas também subsídios para hipóteses evolutivas sobre seleção sexual, compatibilidade funcional e padrões de diversificação entre as espécies.

Conclusão

Em geral, o estudo apresentou diferenças na forma dos télicos entre as espécies do gênero *Penaeus*, descritas anteriormente em estudos prévios, além de evidenciar novas características que permitem agregar na diferenciação das quatro espécies de camarão-rosa utilizadas. Dessa forma, aprimorando cada vez mais a identificação das espécies que ocorrem na costa brasileira, principalmente entre as espécies que apresentem alta similaridade morfológica e ocorrem em simpatria em vários pontos da costa. Esse estudo tende a contribuir para estudos futuros de sistemática, ecologia e elaboração de possíveis medidas mais eficientes de manejo pesqueiro das espécies.

Referências

- Almeida, T. S. et al. (2023). Morphometric analysis of *Farfantepenaeus* species in the South Atlantic. *Journal of Crustacean Research*.
- Bookstein, F. L. (1982). Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 451–470.
- Costa, F. O. et al. (2020). DNA barcoding of penaeid shrimps: integrative approaches. *Molecular Ecology Resources*.
- Costa, R. C.; Fransozo, A.; Melo, G. A. S.; Schmidt Melo, A. G. & Freire, F. A. M. (2003). An illustrated key for dendrobranchiata shrimps from the northern coast of São Paulo state, Brazil. *Biota Neotropica*, 3, 1–12.
- Dias-Neto, J. & Dias, J. F. O. (2015). Uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca. Brasília: IBAMA, 288 p.
- Dias-Neto, J. et al. (2021). Avaliação da produção pesqueira de camarões marinhos no Brasil. *Boletim Técnico Científico do CEPENE*.
- Fairbairn, D.J. (2016) Sexual Dimorphism. In: Kliman, R.M. (ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. 4, 105–113. Oxford: Academic Press.

França, N. F. C. (2018). Relações morfológicas e morfométricas dos camarões rosa *Farfantepenaeus Burukovsky*, 1997 (Decapoda, Penaeidae) em simpatria no Nordeste do Brasil.

França, N. F. C.; Moraes, A. B.; Carvalho-Batista, A.; Melo, M. C. R. B.; López-Greco, L.; Mantelatto, F. L. & Freire, F. A. M. (2019). *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) and *F. brasiliensis* (Latreille, 1817) (Decapoda, Penaeidae): Ontogenetic comparison using the combined analysis of secondary sexual characters and molecular markers. *Fisheries Research*, 216, 89–95.

França, N. F. C.; Alencar, C. E.; Mantelatto, F. L. & Freire, F. A. M. (2020). Filling biogeographic gaps about the shrimp *Farfantepenaeus isabelae* Tavares & Gusmão, 2016 (Decapoda: Penaeidae) in South America. *Zootaxa*, 4718(4), 497–508.

França, N. F. C.; Moraes, A. B.; Carvalho-Batista, A.; Melo, M. C.; Zara, F. J.; Mantelatto, F. L. & Freire, F. A. M. (2021). An integrative approach using DNA barcode and scanning electron microscopy for the effective identification of sympatric species of the genus *Farfantepenaeus Burukovsky*, 1997. *Regional Studies in Marine Science*, 43, 101670.

Fransozo, A. et al. (2012). Comparative morphology of reproductive structures in Penaeidae. *Zoologia*.

Gusmão, J.; Lazoski, C.; Solé-Cava, A. M. (2005). Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 1, p. 165–171.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100029>

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353–357.

Pérez-Farfante, I. (1969). Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *Fishery Bulletin*, 67, 461–591.

Rohlf, F. J. (2018). TpsDig Version 2.31, Ecology & Evolution. SUNY at Stone Brook, USA

Rohlf, F.J. (2015). The tps series of software. *Hystrix It. J. Mamm.*, 26(1), 9-12.
<https://doi.org/10.4404/hystrix-26.1-11264>

Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129–132.

Silva, J. C. B. et al. (2022). Fishing pressure and conservation of penaeid shrimps in Northeastern Brazil. *Marine Policy*.

Tavares, C. & Gusmão, J. (2016). Description of a new Penaeidae (Decapoda: Dendrobranchiata) species, *Farfantepenaeus isabelae* sp. nov. *Zootaxa*, 4171(3), 505–516.

Teodoro, S. S. A.; Terossi, M.; Mantelatto, F. L. & Costa, R. C. (2016). Discordance in the identification of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis* and *F. paulensis*: family Penaeidae): an integrative approach using morphology, morphometry and barcoding. *Fisheries Research*, 183, 244–253.

Timm, L. et al. (2019). A tree money grows on: the first inclusive molecular phylogeny of the economically important pink shrimp (Decapoda: Farfantepenaeus) reveals cryptic diversity. *Invertebrate Systematics*, 33(2), 488–500. <https://doi.org/10.1071/IS18044>

Wäldchen, J.; Wittich, H. C.; Rzanny, M.; Fritz, A. & Mäder, P. (2022). Towards more effective identification keys: A study of people identifying plant species characters. *People and Nature*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/pan3.1040>

Anexos

Gráfico 2 – DFA (Análise de Função Discriminante). Wireframes de comparação da forma do tégico das espécies de *Penaeus* e frequências das pontuações das funções discriminantes.

Gráfico 1 – CVA (Análise de Variáveis Canônicas). Análise de variáveis canônicas dos fatores “indivíduos” x “espécies” como fatores de agrupamento e wireframes dos extremos das formas para cada componente investigado, considerando o tégico de *Penaeus*.

Figura 3. Comparação entre petasmas de *P. subtilis* (direita) e *P. brasiliensis* (esquerda), vista dorso-lateral.

Figura 2. Diferença do tégico de *P. brasiliensis* comparado às demais espécies.

Figura 1. Distribuição de landmarks e semi-landmarks do tégico de *P. subtilis*, também utilizado para as outras espécies.

CÓDIGO: SB1241

AUTOR: NATALIA GEYSE LOPES SANTOS

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: ANÁLISE ASSOCIATIVA ENTRE O ÍNDICE DE MASSA CORPORAL(IMC) E SINTOMAS DEPRESSIVOS

Resumo

O transtorno depressivo maior (TDM) e a obesidade são condições de alta prevalência e impacto em saúde pública, com evidências crescentes de associação bidirecional. Este estudo analisou a relação entre índice de massa corporal (IMC) e sintomas depressivos em universitários brasileiros. Trata-se de investigação transversal com dados da survey UNILIFE-M, envolvendo 3724 estudantes de 10 universidades federais e estaduais, com idades entre 18 e 35 anos. Entre eles, 72,1% (n=2686) apresentaram sintomas depressivos segundo a Escala Transversal de Sintomas do DSM-5 e responderam ao PHQ-9. Destes, 25,8% tinham sintomas leves, 22,3% moderados e 17% severos. Observou-se associação entre maior IMC e maior gravidade: sobrepeso/obesidade ocorreu em 24,7% dos casos leves, 27% dos moderados e 33% dos graves. Contudo, indivíduos com peso normal também exibiram alta frequência de sintomas depressivos, sugerindo que a relação não é linear e envolve múltiplos determinantes fisiológicos e psicossociais. No total, 65,1% dos universitários apresentaram algum grau de sintomatologia, percentual superior ao da população geral da mesma faixa etária. Os achados reforçam a complexidade da interação entre obesidade e depressão, relacionada a processos inflamatórios, alterações neuroendócrinas, fatores ambientais e comportamentais, e apontam a necessidade de políticas públicas que integrem saúde física e mental, especialmente no contexto acadêmico.

Palavras-chave: Saúde mentalÍndice de Massa CorporalEstudante universitário

TITLE: Associative Analysis Between Body Mass Index (BMI) and Depressive
Symptoms: A Cross-Sectional Investigation

Abstract

Major depressive disorder (MDD) and obesity are prevalent conditions with substantial public health impact, and growing evidence indicates a bidirectional association. This cross-sectional study investigated the relationship between body mass index (BMI) and depressive symptoms among 3,724 Brazilian university students aged 18–35, using data from the UNILIFE-M survey. Depressive symptoms, assessed through the DSM-5 Cross-Cutting Symptom Measure and PHQ-9, were present in 72.1% of participants: 25.8% mild, 22.3% moderate, and 17% severe. A positive association was observed between higher BMI and greater symptom severity, with overweight/obesity in 24.7% of mild cases, 27% of moderate cases, and 33% of severe cases. However, students with normal weight also reported high depressive symptom prevalence, suggesting a non-linear relationship influenced by physiological, neuroendocrine, inflammatory, environmental, and psychosocial factors. Overall, 65.1% of students showed some depressive symptoms, exceeding rates reported in

the general population of the same age. These findings highlight the complex interplay between obesity and depression and emphasize the need for integrated public health strategies addressing both physical and mental health, particularly in academic contexts.

Keywords: Mental health Body Mass Index (BMI) University student

Introdução

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma das desordens psiquiátricas de maior impacto em saúde pública, com elevada prevalência global, contribuindo significativamente para a carga de doenças e incapacidade funcional. Estima-se que mais de 300 milhões de indivíduos sejam acometidos (OMS, 2024), com prevalência de 7% entre mulheres e 4% entre homens (Steel et al., 2014), evidenciando sua relevância clínica e científica. Apesar de documentada, sua etiologia é complexa, resultante de interações entre fatores genéticos, ambientais, neurobiológicos e psicossociais (Almeida et al., 2021). Clinicamente, caracteriza-se por humor persistentemente deprimido ou anedonia, associado a sintomas cognitivos, afetivos, comportamentais e somáticos, como culpa excessiva, fadiga, distúrbios do sono, alterações de apetite, prejuízos na concentração e ideação suicida (American Psychiatric Association, 2014). O DSM-5 define episódio depressivo maior como presença de ao menos cinco desses sintomas, incluindo humor deprimido ou perda de interesse, por mínimo de duas semanas, com repercussão funcional significativa (American Psychiatric Association, 2014). O TDM deve ser compreendido como condição multifacetada, com alterações neuropsicológicas e fisiológicas, reforçando a necessidade de aprofundar seu estudo e aprimorar diagnósticos e tratamentos. A relação entre obesidade e depressão é complexa e bidirecional: sintomas depressivos podem alterar hábitos alimentares, aumentando consumo de alimentos calóricos para ativar circuitos de recompensa cerebral (Beurel, Toups, Nemeroff, 2020); a obesidade, principalmente abdominal, eleva risco de transtornos mentais (Zhao et al., 2011). A gordura visceral, por sua natureza inflamatória, impacta mais na depressão que a subcutânea. Alterações ponderais influenciam autoestima e insatisfação corporal, favorecendo sintomas depressivos (Calcaterra et al., 2024). Pesquisas com gêmeos mostram que depressão e IMC compartilham fatores genéticos (Kendler et al., 1996). O perfil inflamatório sistêmico é relevante: em depressão grave, níveis elevados de citocinas interagem com neurotransmissores, função neuroendócrina e plasticidade cerebral (Jeon, Kim, 2016). Adipocitocinas como leptina, adiponectina e TNF- α evidenciam o papel do tecido adiposo na depressão (González et al., 2022; Arita et al., 1999). O excesso de gordura branca aumenta inflamação e altera função cerebral, glutamato e células gliais, típicos da depressão maior (Miller, Maletic, Raison, 2009). Assim, inflamação sistêmica contribui para sintomas depressivos e influencia prognóstico (Gomes, Da Rosa, 2023; Felger, 2018). Essa interação gera hiperinflamação que intensifica sintomas depressivos (Qiu et al., 2021). Apesar das semelhanças fisiológicas, estudos em jovens adultos brasileiros são escassos. O presente estudo visa investigar a frequência e severidade dos sintomas depressivos em universitários, avaliando a ocorrência de sobrepeso e a relação entre excesso de peso e sintomas depressivos, comparando com indivíduos sem sinais de transtornos mentais.

Metodologia

A amostra deste estudo foi composta por adultos jovens com idade entre 18 e 35 anos, regularmente matriculados nos cursos de graduação das universidades participantes: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal de

Santa Maria (UFSM), Universidade de Brasília (UNB), Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Universidade Federal do Ceará (UFC), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os participantes integraram o estudo geral da survey UNILIFE-M, incluindo tanto voluntários saudáveis quanto aqueles que apresentaram sintomas depressivos na fase 2. Foram incluídos no estudo estudantes que ingressaram no primeiro ou segundo semestre de 2023 em cursos de graduação ou pós-graduação, que leram e concordaram com o termo de consentimento online e que possuíam capacidade cognitiva e intelectual para preencher os questionários. Foram excluídos aqueles que não atenderam aos critérios de inclusão ou que preencheram de forma incompleta os questionários DSM-5 ou PHQ-9. Na fase 1, foram coletadas informações sociodemográficas e acadêmicas, incluindo sexo, idade, identidade de gênero, cor, índice de massa corporal, renda, naturalidade, urbanicidade, histórico familiar de transtornos mentais, diagnóstico prévio de transtornos mentais, histórico de atividade física, curso, data de ingresso na universidade, semestre concluído e residência na casa do estudante. Também foi aplicada a Escala Transversal de Sintomas de Nível 1 do DSM-5 (ETS-1), por meio de link online. Esta escala auto-reportada avaliou treze domínios psiquiátricos, incluindo depressão, raiva, mania, ansiedade, sintomas somáticos, ideação suicida, psicose, distúrbio do sono, memória, pensamentos e comportamentos repetitivos, dissociação, funcionamento da personalidade e uso de substâncias. Cada item foi classificado em uma escala de zero a quatro, sendo que pontuações mais altas indicaram maior gravidade. Os participantes que apresentaram sintomas de depressão leve ou mais grave ($ETS-1 > 1$) foram direcionados para a fase 2 do estudo, na qual responderam ao Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) online. O PHQ-9, traduzido para o português brasileiro, consistiu em nove perguntas auto-reportadas sobre sintomas depressivos nas duas semanas anteriores, e pontuações iguais ou superiores a dez foram classificadas como indicativas de caso de depressão. O índice de massa corporal (IMC) dos participantes foi calculado pela divisão da massa corporal em quilogramas pelo quadrado da estatura em metros e utilizado como indicador do estado nutricional. Os participantes foram classificados como baixo peso ($IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$), normopeso ($IMC \geq 18,5$ até $24,9 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($IMC \geq 25$ até $29,9 \text{ kg/m}^2$) ou obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$). A amostra foi subdividida em grupos conforme a pontuação na ETS-1 e no PHQ-9. Participantes sem sintomas depressivos ($ETS-1 = 0$) compuseram o grupo controle saudável, enquanto aqueles com $ETS-1 > 1$ formaram o grupo caso. A gravidade dos sintomas depressivos no grupo caso foi classificada de acordo com o PHQ-9 em leve (10–14 pontos), moderada (15–19 pontos) e severa (≥ 20 pontos). As variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foram comparados os grupos em relação ao índice de massa corporal por meio de ANOVA one-way, e diferenças pontuais foram identificadas pelo post-hoc de Tukey. Além disso, realizou-se correlação de Pearson considerando apenas os indivíduos classificados como casos. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

A idade dos participantes variou de 18 a 35 anos ($19 + 6,19$), sendo que 87,5% da amostra representativa era composta por estudantes entre 18 e 26 anos, e aproximadamente 62,3% dos participantes eram do sexo feminino. Do total de inscritos através da plataforma REDCAP, 3724 responderam ao questionário da fase 1 sobre a saúde mental. Desse total de voluntários, 27,9% ($n=1038$) não apresentaram sintomas de doença mental ($ETS-1=0$) e foram incluídos como grupo controle. Entretanto, 72,1% dos participantes ($n=2686$) atingiram o ponto de corte para os sintomas depressivos ($ETS-1 > 1$) e preencheram a escala de sintomas

depressivos de nível 2, a “PHQ-9”. No que se refere a localização em que os participantes estão matriculados, 16,2% eram da UNIMONTES, 2,5% da UFSC; 16,2% da UFSM; 0,6% da UFPI; 3,4% da UNB; 6,5% da UFSC; 10,8% da UFRN; 12,8% da UFC; 2,6% da UFPA e 28,3 da UFRJ. No grupo caso, 19,7% (n=734) apresentou o IMC caracterizado como baixo peso; 50,6% (n=1885) como normopeso; 16,05% (n=598) como sobrepeso e 10,2% (n=382) sendo obesos. De forma geral, observou-se uma alta proporção de sintomas depressivos moderados a graves nas diferentes regiões do país, representadas pelas universidades supracitadas, corroborando a literatura que destaca os universitários como um grupo vulnerável ao sofrimento psíquico. Em geral, cerca de 40% (n=1.056) da parcela de estudantes que responderam à PHQ-9, apresentaram sintomas de moderados a graves. Dessa parcela, apenas 34,9% pontuaram abaixo do corte para possuírem, pelo menos, sintomas leves, isto é, 65% apresentaram algum nível de sintoma depressivo. No que concerne à gravidade dos sintomas depressivos do grupo caso, 25,8% apresentam sintomas leves; 22,3% sintomas moderados e 17% sintomas severos, segundo a classificação da PHQ-9. A análise dos dados obtidos demonstrou uma associação consistente entre obesidade e maior gravidade dos sintomas depressivos mensurados pelo PHQ-9. Na amostra avaliada, 10,2% dos indivíduos apresentaram obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$). Quando estratificados de acordo com a intensidade dos sintomas depressivos, verificou-se que, entre os participantes com sintomas leves, 24,7% encontravam-se acima do peso ou obesos. Esse percentual aumentou significativamente nos grupos de maior gravidade, atingindo 27% entre os que apresentaram sintomas moderados e 33% no grupo de sintomas severos (gráfico 1). Esse gradiente sugere uma relação entre o aumento do IMC e a intensificação dos sintomas depressivos. Observa-se que a obesidade é menos prevalente entre aqueles com sintomas depressivos leves, mas torna-se progressivamente mais frequente à medida que a severidade do quadro se agrava. Tal achado reforça a hipótese de que a obesidade pode atuar como fator de risco ou de manutenção para quadros depressivos mais graves, seja por mecanismos fisiológicos, como alterações neuroendócrinas e processos inflamatórios, seja por fatores psicossociais, incluindo estigmatização, isolamento social e piora da autoestima. Importa destacar que essa relação tende a ser bidirecional: enquanto a obesidade pode favorecer o desenvolvimento e a intensificação de sintomas depressivos, a própria depressão — sobretudo em sua forma mais grave — pode contribuir para o aumento do peso corporal, seja pela redução da motivação para práticas saudáveis, pelo maior sedentarismo ou ainda por alterações metabólicas e do apetite associadas ao transtorno (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020). Embora os dados indiquem a presença de participantes com sobrepeso e obesidade entre aqueles com sintomas depressivos, observa-se que uma parcela significativa também apresentava peso dentro da faixa de normalidade. Nos sintomas leves, a maioria dos participantes (51,9%; n=359) estava em normopeso, porém, à medida que a gravidade dos sintomas aumentou, essa proporção diminuiu: entre os casos graves, apenas 39,2% (n=179) eram eutróficos (gráfico 2). Esse padrão evidencia que, embora indivíduos com maior IMC também apresentem sintomas depressivos, a distribuição não ocorre de forma linear. Assim, a relação entre IMC e sintomas depressivos é complexa e multifatorial, não podendo ser explicada apenas pelo peso corporal. Essa característica representa uma limitação do estudo, já que impede concluir uma correlação direta entre maiores escores no PHQ-9 e IMC elevado. Ainda assim, a diversidade observada reforça a importância de considerar tanto indivíduos com sobrepeso/obesidade quanto aqueles em peso normal no contexto da saúde mental, ampliando a compreensão do fenômeno. Estudos prévios indicam que tanto a obesidade quanto a depressão compartilham mecanismos fisiopatológicos relacionados a processos inflamatórios e alterações metabólicas, além de fatores ambientais, como estresse e hábitos alimentares inadequados (ZHAO et al., 2011). Entretanto, o fato de indivíduos eutróficos também apresentarem elevada prevalência

de sintomas depressivos reforça a necessidade de considerar outros elementos, como a vulnerabilidade psicossocial do contexto universitário, o impacto das pressões acadêmicas, o sedentarismo e a influência dos padrões sociais de beleza sobre a autoimagem. Na presente investigação, verificou-se que aproximadamente 65,1% dos voluntários relataram a presença de sintomas depressivos, sendo a maioria classificada entre os níveis leve e moderado (48,1%). Tal proporção excede de maneira expressiva as estimativas da população geral, que apontam prevalência de 11% entre jovens de 18 a 24 anos (BRASIL, 2024) (gráfico 3). Nesse sentido, o panorama da saúde mental no contexto universitário revela-se potencialmente mais alarmante quando comparado às estatísticas gerais da população. Todavia, deve-se considerar que a elevada prevalência observada nesta amostra pode estar parcialmente associada à maior predisposição e interesse de estudantes que apresentam sintomatologia psíquica em participar do estudo, em detrimento daqueles que se encontram em condições satisfatórias de saúde mental.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a prevalência de sintomas depressivos em estudantes universitários é elevada, afetando aproximadamente 65,1% da amostra, com predomínio de sintomas leves a moderados, representando 48,1% dos casos. Tal proporção revela que o contexto universitário constitui um ambiente de vulnerabilidade psicológica significativa. A análise do IMC demonstrou que a obesidade e o sobrepeso tornaram-se progressivamente mais frequentes à medida que a gravidade dos sintomas aumentou, atingindo 33% entre os casos graves. Esse gradiente sugere que o excesso de peso pode estar associado à intensificação da sintomatologia depressiva, atuando como fator de risco ou de manutenção do quadro clínico, em função de mecanismos fisiológicos, como alterações neuroendócrinas e processos inflamatórios, bem como fatores psicossociais, incluindo estigmatização, isolamento social e redução da autoestima. A relação observada entre obesidade e depressão reforça a hipótese de que as duas condições podem influenciar-se mutuamente: enquanto o excesso de peso favorece o agravamento dos sintomas depressivos, a própria depressão, especialmente em sua forma mais grave, pode contribuir para o aumento do IMC por meio de alterações metabólicas, maior sedentarismo e redução da motivação para práticas saudáveis. A distribuição geográfica dos participantes, abrangendo diferentes universidades brasileiras, indica que a vulnerabilidade à depressão é um fenômeno nacional, presente em diversas regiões do país, e não restrito a contextos específicos. Os achados apontam para a necessidade de políticas de promoção da saúde mental que contemplem ações integradas, envolvendo suporte psicossocial, incentivo à prática de atividade física e estímulo a hábitos de vida saudáveis. Tais estratégias devem ser direcionadas de forma ampla, considerando a complexidade e a natureza multifatorial da relação entre obesidade e sintomas depressivos. Apesar de os dados evidenciarem associação entre excesso de peso e gravidade da depressão, a relação permanece complexa e sujeita a múltiplos determinantes, destacando a importância de estudos longitudinais que possam avaliar a causalidade e os mecanismos subjacentes. Esses esforços são essenciais para a formulação de intervenções preventivas eficazes e para o aprimoramento do cuidado em saúde mental no contexto universitário.

Referências

DEPRESSÃO - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>. Acesso em: 10 de jan. 2024. ALMEIDA, Davi

Benevides et al. A relação entre marcadores inflamatórios e depressão: uma revisão da literatura. *Scire Salutis*, v. 11, n. 1, p. 84-97, 2021. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Artmed Editora, 2014. LASSALE, Camille et al. Healthy dietary indices and risk of depressive outcomes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Molecular psychiatry*, v. 24, n. 7, p. 965-986, 2019. BEUREL, Eléonore; TOUPS, Marisa; NEMEROFF, Charles B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble. *Neuron*, v. 107, n. 2, p. 234-256, 2020. GONZÁLEZ, Cristina Elizabeth Fuente et al. Relationship between emotional eating, consumption of hyperpalatable energy-dense foods, and indicators of nutritional status: a systematic review. *Journal of Obesity*, v. 2022, 2022. LEDUC D, Rouge PE, Rousset H, Maitre A, Champay-Hirsch AS, Massot C. Étude clinique de 105 cas d'amaigrissements isolés en médecine interne. *Rev Med Interne*. 1988; 9(5):480-6. CALCATERRA, Valeria et al. Dietary habits, depression and obesity: an intricate relationship to explore in pediatric preventive strategies. *Frontiers in Pediatrics*, v. 12, p. 1368283, 2024. KENDLER, Kenneth S. et al. The identification and validation of distinct depressive syndromes in a population-based sample of female twins. *Archives of general psychiatry*, v. 53, n. 5, p. 391-399, 1996. JEON, Sang Won; KIM, Yong Ku. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: cause or consequence in that illness?. *World journal of psychiatry*, v. 6, n. 3, p. 283, 2016. ALMEIDA, D.B.; Mota, S.C.B.; Mesquita, D.S.; Honório Júnior, J.E.R. The Relation between Inflammatory Markers and Depression: A Literature Review. 2020. ARITA, Yukio et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 257, n. 1, p. 79-83, 1999. LIU, Rui; NIKOLAJCZYK, Barbara S. Tissue immune cells fuel obesity-associated inflammation in adipose tissue and beyond. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 469118, 2019. KHANNA, Deepesh et al. Obesity: a chronic low-grade inflammation and its markers. *Cureus*, v. 14, n. 2, 2022. MILLER, Andrew H.; MALETIC, Vladimir; RAISON, Charles L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry*, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009. GOMES, Celina Cavalcante Muniz; DA ROSA, Michelle Melgarejo. Biomarcadores inflamatórios na Depressão Maior: uma revisão sistemática. *Revista Neurociências*, v. 31, p. 1-20, 2023. FELGER, Jennifer C. Imaging the role of inflammation in mood and anxiety-related disorders. *Current neuropharmacology*, v. 16, n. 5, p. 533-558, 2018. QIU, Wenxin et al. Update on the relationship between depression and neuroendocrine metabolism. *Frontiers in neuroscience*, v. 15, p. 728810, 2021. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Arlington ed. [s.l.: s.n.]. v. 5. SANTOS, I. S. et al. Sensibilidade e especificidade do Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) entre adultos da população geral. *Cadernos de Saude Publica*, v. 29, n. 8, p. 1533–1543, 2013. ANJOS, Luiz A. Índice de massa corporal (massa corporal. estatura-2) como indicador do estado nutricional de adultos: revisão da literatura. *Revista de Saúde pública*, v. 26, p. 431-436, 1992. DE CUIDADO, Guia do Episódio. Linha de Cuidado Saúde Mental-Depressão Unipolar na Atenção Primária. MORADI, Maedeh et al. Association between overweight/obesity with depression, anxiety, low self-esteem, and body dissatisfaction in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 62, n. 2, p. 555-570, 2021. ZHAO, Guixiang et al. Waist circumference, abdominal obesity, and depression among overweight and obese US adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *BMC psychiatry*, v. 11, p. 1-9, 2011. MILANESCHI, Yuri et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. *Molecular psychiatry*, v. 24, n. 1, p. 18-33, 2019. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. v. 35, n.

2, p. 15-30. KIELING, Christian et al. Worldwide Prevalence and Disability From Mental Disorders Across Childhood and Adolescence: Evidence From the Global Burden of Disease Study. JAMA psychiatry, 2024. MREJEN, Matias. Depressão entre jovens de 18 a 24 aumentou para 11,1% em 2019, segundo pesquisador do IEPS. Disponível em: <https://ieps.org.br/depressao-entre-jovens-de-18-e-24-aumentou-para-111-em-2019-segundo-pesquisador-do-ieps>. Acesso em: 04 maio 2024. PRANDO, Caio Badiani et al. Desenvolvimento de Ansiedade e Depressão a partir do sobrepeso e da Obesidade. Brazilian Journal of Health Review, v. 6, n. 2, p. 5656-5665, 2023. Fauzi MF, Anuar TS, Teh LK, Lim WF, James RJ, Ahmad R, et al. Stress, anxiety and depression among a cohort of health sciences undergraduate students: the prevalence and risk factors. Int J Environ Res Pub Health. 2021;18(6):3269. <https://doi.org/10.3390/ijerph18063269> Belem, I. C., Camargo, D. A. D., et al. (2019). Diferentes comportamentos do estilo de vida de universitários do curso de educação física. Pensar em Movimento 17(2), San José. Epub. SILVA, Paulo Vitor Bernardes Sidney et al. A íntima relação entre obesidade e má qualidade de vida de estudantes universitários. Research, Society and Development, v. 11, n. 9, p. e45311931819-e45311931819, 2022. BARROS, Gerleison Ribeiro et al. Sobrepeso e obesidade em universitários: prevalências e fatores associados. Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde, v. 26, p. 1-9, 2021. PIAO, Jingjing et al. Antidepressant-like Effects of Representative Types of Food and Their Possible Mechanisms. Molecules, v. 28, n. 19, p. 6992, 2023. FRANCHI, Kristiane Mesquita Barros; MONTENEGRO, Renan Magalhães. Atividade física: uma necessidade para a boa saúde na terceira idade. Revista Brasileira em Promoção da Saúde, v. 18, n. 3, p. 152-156, 2005. GOMES, Carlos Fabiano Munir et al. Transtornos mentais comuns em estudantes universitários: abordagem epidemiológica sobre vulnerabilidades. SMAD, Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool E Drogas (Edição Em Português), v. 16, n. 1, p. 1-8, 2020.

Anexos

Gráfico 4: Distribuição detalhada do IMC em cada nível de gravidade dos sintomas depressivos (PHQ- 9).

Gráfico 2: Distribuição do IMC em relação à gravidade dos sintomas depressivos (PHQ-9).

Gráfico 1. Percentual de pessoas acima do peso e obesas em relação à intensidade dos sintomas de depressão

Gráfico 3: Comparação de prevalência de sintomas depressivos

CÓDIGO: SB1242

AUTOR: ALTAMIRA SAMARA DA PAZ MEDEIROS

ORIENTADOR: RENATA SWANY SOARES DO NASCIMENTO

TÍTULO: Perfil temporal e espacial da ocorrência de distúrbios congênitos em neonatos no RN.

Resumo

Sendo responsáveis por uma grande parcela da mortalidade neonatal, os distúrbios congênitos podem ser ocasionados por fatores genéticos e ambientais, ou ambos. Com base nisso, o objetivo deste artigo é analisar e caracterizar o perfil epidemiológico de distúrbios congênitos em neonatos no Estado do Rio Grande do Norte, com buscas no banco de dados do DATASUS, no período de 2013-2023.

Palavras-chave: Distúrbios congênitos, epidemiologia, DATASUS, Rio Grande do Norte (RN)

TITLE: Perfil temporal e espacial da ocorrência de distúrbios congênitos em neonatos no RN.

Abstract

Congenital disorders are responsible for a large portion of neonatal mortality and can be caused by genetic and environmental factors, or both. Based on this, the objective of this article is to analyze and characterize the epidemiological profile of congenital disorders in neonates in the state of Rio Grande do Norte, with searches in the DATASUS database, in the period 2013-2023.

Keywords: Congenital disorders, epidemiology, DATASUS, Rio Grande do Norte (RN)

Introdução

“É considerada uma malformação congênita uma alteração anômala presente no momento do nascimento. A malformação é consequência de uma falha de um ou mais constituintes do corpo durante o desenvolvimento embrionário” (Garcia, 2020, p.256). Contando, uma malformação pode ter diversas causas originárias, sendo elas agentes infecciosos e parasitários, malformações causadas por radiação, agentes químicos como teratógenos, antibióticos, anticoagulantes e hormônios. Como também pode ter causas genéticas, como aneuploidias, trissomias, monossomias, poliploidia, deleção, translocação (Garcia, 2020). Sabendo que, em 50% a 60% dos defeitos congênitos, a causa é desconhecida, podendo ser ocasionada por um único ou vários fatores (Moore...). O período mais crítico do desenvolvimento é quando a divisão celular, a diferenciação celular e a morfogênese estão no seu auge (Moore...) ou seja, quando está acontecendo a formação dos tecidos e órgãos do embrião ou feto. Essas anomalias contribuem significativamente para a mortalidade infantil

(Urichuk, Zrinyi, Keijzer, Lum Min, 2024). Com isso, esse artigo tem como objetivo conhecer o perfil temporal e espacial da ocorrência de distúrbios congênitos em neonatos no estado do Rio Grande do Norte.

Metodologia

Será feita uma coleta de dados a partir de dados de recém-nascidos cadastrados em plataformas públicas (DATASUS, OMS) diagnosticados com alguns tipos de distúrbios congênitos considerando os anos de 2013-2023. Sendo registrado tipos de malformações; Evolução Neonatal (alta ou óbito); Identificação do recém-nascido (sexo, raça, idade em meses); Perfil socioeconômico materno (raça, idade, escolaridade, renda mensal média); Presença ou ausência de fatores de risco maternos (consumo de drogas, número de gestações, histórico de mal-formações congênitas em gestações anteriores, tentativa de aborto, realização do pré-natal). A prevalência de Distúrbios Congênitos será calculada a partir da proporção entre o número de recém-nascidos normais e o número de recém-nascidos com MC, sejam eles nativos ou natimortos, com idade gestacional a partir de 22 semanas e/ou peso fetal maior ou igual que 500 g. Para a análise de dados os resultados obtidos serão submetidos à análise estatística descritiva. De acordo com os resultados encontrados serão realizados testes estatísticos a fim de verificar se há relação com o aparecimento de determinada má formação e as variáveis fetais e maternas investigadas.

Resultados e Discussões

4.1. Distribuição Temporal Com base na coleta de dados no DATASUS, foi possível observar na tabela 1 que, entre os anos de 2013 - 2023, o estado do RN registrou um total de 494,172 nascimentos. Desses, 4,008 recém-nascidos apresentaram alguma anomalia congênita, o que indica a prevalência aproximada de 8,1 (0.81%) casos para cada 1.000 nascidos vivos durante o período do estudo. Entre as principais anomalias identificadas, foram destacadas malformações e deformações congênitas no aparelho osteomuscular, com 976 casos, com maior frequência. Em seguida, deformidades congênitas dos pés, com 601 casos e outras malformações congênitas não especificadas, com 566 casos. As malformações congênitas do sistema nervoso tiveram 471 casos registrados e foram registrados 335 relacionados a malformações do sistema geniturinário, 384 casos de fenda labial e palatina e 217 casos de anomalias cromossômicas. Figura 1: Percentual de nascimentos no RN. Figura 1a mostra a relação entre total de nascidos (494.172) e nascidos com distúrbios congênitos (4.008). 1b mostra quais DC foram registrados e seu percentual. Ao analisarmos os dados extraídos, foi observado que o ano em que teve maior nascimentos com distúrbios congênitos foi em 2015 (Figura 2) Figura 2: Incidência de DC entre os anos de 2013-2023 A Figura 3 ilustra a distribuição anual dos principais tipos de distúrbios congênitos documentados no estado do Rio Grande do Norte no período de 2013 a 2023. Nota-se que a categoria com mais casos durante todo o período foi "outras malformações e deformidades do aparelho osteomuscular". Isso pode ser explicado pela facilidade de identificação clínica ao nascer de anomalias visuais, como pé torto congênito, encurtamento de membros e deformidades na coluna. Um aspecto notável é o pico observado em 2015 na categoria "outras malformações congênitas do sistema nervoso", que coincide com o surto do vírus Zika no país. Ao longo dos anos, as demais anomalias, como malformações do sistema circulatório, fenda palatina, espinha bífida e deformidades geniturinárias, permaneceram relativamente estáveis, apresentando apenas pequenas variações anuais. Por outro lado, as anomalias cromossômicas e

hemangiomas/linfangiomas mostraram os menores números absolutos. Figura 3: Principais casos de DC entre os anos de 2013-2023

4.2 Distribuição Espacial Por outro lado, quando analisado a incidência da DC em relação com a quantidade de nascimentos em cada município, observa-se um cenário um pouco diferente. municípios com maiores percentuais de ocorrência são: Bodó (1,95%), Passagem (1,95%), Lagoas de Pedra (1,69%), São Tomé (1,60%) e o município de Tangará (1,51%) Tabela 1. Municípios com maiores incidências.

4.3. Fatores Materno-fetais Em relação à idade gestacional, os dados revelam que a maioria dos casos de anomalia congênita ocorreu entre os nascidos a termo (37 a 41 semanas), totalizando 2.770 casos. No entanto, quando observamos a proporção em relação ao total de nascidos em cada grupo, os maiores percentuais foram registrados entre os nascidos com idade gestacional de 22 a 27 semanas (2,96%) e 28 a 31 semanas (2,87%). Isso sugere uma relação entre a prematuridade extrema e o aumento do risco de anomalias congênitas Tabela 2.

Duração da Gestação A análise do peso ao nascer mostra uma forte associação entre baixo peso e maior ocorrência de anomalias congênitas. As faixas de 1000 a 1499g e 500 a 999g apresentaram os maiores índices proporcionais, com 4,44% e 3,82% respectivamente. Isso demonstra a importância do peso ao nascer como um indicativo de risco para malformações. Tabela 3.

Peso ao nascer Observou-se uma predominância de anomalias congênitas entre os nascimentos por parto cesáreo, que representaram 2.743 casos. A proporção de anomalias em partos cesáreos foi de 0,89%, contra 0,67% em partos vaginais. Essa diferença pode refletir uma maior indicação de cesarianas em gestações com riscos previamente identificados. Tabela 4.

Tipo de parto A maior parte das anomalias foi registrada entre mães pardas (2.806 casos). Entretanto, a proporção relativa mais elevada foi entre mães pretas (0,92%), seguida pelas brancas (0,70%). Tabela 5.

Raça da mãe As gestações múltiplas apresentaram maior proporção de anomalias. Gravidezes duplas tiveram 1,01% de anomalias, superior às gravidezes únicas (0,81%). Tabela 6.

Tipo de Gravidez A faixa etária com maior número absoluto de casos foi de 25 a 29 anos (862 casos). Contudo, proporcionalmente, destaca-se a faixa 40 a 44 anos, com 1,67% dos nascidos apresentando anomalias congênitas, apontando a idade materna avançada como fator de risco relevante. Tabela 7.

Idade Materna As gestantes que não realizaram pré-natal apresentaram a maior proporção de anomalias congênitas (1,52%). Também houve índice elevado nos grupos "não classificados" (1,16%) e "intermediário" (0,98%). O menor percentual foi entre aquelas com pré-natal "mais que adequado" (0,74%), sugerindo que maior acompanhamento contribui para melhores desfechos. Tabela 8.

Quantidades de Pré-natal A pesquisa sobre a incidência de malformações congênitas nos nascimentos registrados no Rio Grande do Norte, entre 2013 e 2023, revelou uma taxa aproximada de 8,1 casos a cada mil nascidos vivos e sua incidência 0,81% . Esse percentual é inferior à média global estimada pela Organização Mundial da Saúde, que varia de 2% a 3%, sugerindo uma possível subnotificação nos sistemas de monitoramento, especialmente em áreas com acesso limitado ao diagnóstico pré-natal ou dificuldades na coleta de dados. Ao examinar os tipos de malformações identificadas, nota-se uma predominância de deformidades e anomalias do sistema osteomuscular, seguidas por deformidades nos pés e malformações no sistema nervoso. Isso pode indicar a frequência dessas condições, bem como a facilidade de identificação clínica ao nascimento. Ao analisarmos a distribuição temporal sobressaiu-se com o maior número de registros de complicações no sistema nervoso, totalizando 115 casos, coincidente com a epidemia do vírus Zika no Brasil, o que reafirma a ligação entre infecções congênitas e malformações neurológicas graves, como a microcefalia. Esse aumento coincide com a epidemia do vírus Zika no Brasil, onde diversos estudos identificaram uma relação entre a infecção pelo vírus durante a gestação e o surgimento de microcefalia e outras malformações neurológicas em neonatos. Segundo o Ministério da Saúde (2017), em 2015, o Brasil enfrentou uma epidemia

causada pelo vírus Zika que tem como vetor o *Aedes aegypti*. Podendo explicar em parte o pico observado na figura 2 e 3. “A prematuridade é definida como o nascimento abaixo de 37 semanas de gestação, segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS (1961). Ela se divide em prematuridade moderada (32 semanas a 36 semanas de idade gestacional), prematuridade acentuada (28 semanas a 31 semanas de idade gestacional) e prematuridade extrema (abaixo de 28 semanas de idade gestacional)” (Lorena et al., 2009). Em relação ao tempo de gestação, observou-se que a maior incidência de anomalias ocorreu entre os partos extremamente prematuros (22 a 31 semanas), especialmente no grupo de 22 a 27 semanas, que apresentou uma taxa de 29,6%. A importância do estudo sobre a prematuridade se deve à elevada taxa de morbidade e mortalidade neonatal, além dos altos custos hospitalares e das diversas sequelas associadas. Essa relação entre prematuridade e malformações é bem documentada em estudos e pode refletir tanto causas comuns, como síndromes genéticas, infecções intra uterinas ou problemas placentários, quanto a maior vulnerabilidade dos fetos prematuros ao desenvolvimento de anomalias estruturais. Igualmente, os recém-nascidos com baixo peso, especialmente aqueles com menos de 1.500g, apresentaram as taxas proporcionais mais altas de anomalias, ressaltando que o peso é um importante indicador indireto do desenvolvimento fetal. Esses achados sugerem que as malformações têm potencial para impactar o crescimento intrauterino e, simultaneamente, que condições clínicas de risco materno, como hipertensão, diabetes ou infecções, podem influenciar tanto o crescimento quanto a morfogênese fetal. A análise do tipo de parto evidenciou uma maior proporção de anomalias em cesarianas (9,0%) em comparação com partos vaginais (6,7%). Embora o modo de nascimento não seja causador de malformações, essa informação pode refletir a prática clínica de optar pela cirurgia em gestantes diagnosticadas com anomalias pré-natais, buscando minimizar riscos perinatais ou viabilizar intervenções imediatas. A idade materna se destacou como um fator relevante, com mulheres entre 45 e 49 anos apresentando a maior taxa de casos (16,7%). Essa correlação é bem reconhecida nos estudos, especialmente em virtude do aumento das anormalidades cromossômicas, como as trissomias, e da maior incidência de comorbidades nessa faixa etária. Pesquisas recentes indicam que a idade materna avançada está ligada a uma variedade de resultados negativos, incluindo pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, parto cesariano e anomalias cromossômicas fetais, além de um aumento no risco de parto prematuro e necessidade de internação em UTI neonatal. (GLICK; KADISH; ROTTENSTREICH, 2021) Essa diferença é também clara quando observamos a raça/cor, com mães que se identificam como negras apresentando a maior porcentagem de casos (9,2%). Esses números retratam as desigualdades sociais e raciais no acesso aos cuidados de saúde durante a gravidez. A análise da qualidade do pré-natal enfatiza a importância desse acompanhamento: gestantes que não realizaram consultas de pré-natal tiveram a maior taxa de anomalias (15,2%). Isso evidencia que o cuidado durante a gravidez é essencial não apenas para a detecção antecipada, mas também para a prevenção de malformações que poderiam ser evitadas, como as resultantes de carências nutricionais, infecções e uso de substâncias nocivas, sendo que assistência pré-natal é essencial ao bem-estar materno-infantil desde o período pré-gravídico até os primeiros anos de vida (WHO, 2016). A pesquisa espacial indicou que os municípios do RN com maiores índices de DCs foram Bodó (19,5%), Passagem (17,9%), Lagoa de Pedra (16,9%), São Tomé (16,0%), Tangará (15,1%), Passa e Fica (14,9%), Serrinha (14,2%), Jundiá (14,0%), Coronel Ezequiel (13,7%), Lucrécia (13,6%) e Natal está em 50ª posição com 9,2%. “A incidência dos DCs na população está diretamente ligada às condições sociais, demonstrando uma nítida associação entre baixa condição social e DC, principalmente quando se pensa em causas de origem ambiental ou multifatorial. Os DCs representam, portanto, um problema de saúde é um problema social de grande magnitude que deve ser abordado buscando, no futuro, diminuir os índices de morbi-

mortalidade infantil por essas causas” (CABRAL-OLIVEIRA et al., 2006-2007) . De maneira geral, os dados examinados ressaltam a urgência de políticas públicas que promovam o acesso ao pré-natal, ampliem a vigilância epidemiológica e reforcem as ações de diagnóstico e monitoramento de anomalias congênitas, especialmente em pequenas cidades e entre populações mais vulneráveis. Compreender a distribuição e os fatores associados às malformações congênitas é crucial para a formulação de estratégias de prevenção, intervenções precoces e promoção de equidade na saúde materno-infantil.

Conclusão

A análise dos dados indica que as malformações congênitas continuam sendo um significativo desafio de saúde pública no Rio Grande do Norte, particularmente quando relacionadas a fatores como prematuridade, baixo peso ao nascer, idade materna avançada, falta de pré-natal adequado e desigualdades sociais e raciais. A diferença entre a taxa estadual e a média global indica a subnotificação, o que sugere que há limitações nos sistemas de vigilância e diagnóstico, especialmente em municípios com infraestrutura precária. A conexão entre a epidemia do vírus Zika e o crescimento de anomalias neurológicas enfatiza a relevância da monitorização epidemiológica constante, além da pronta resposta a surtos infecciosos que possam impactar gestantes. Nesse contexto, torna-se ainda mais urgente a implementação de políticas públicas eficazes que garantam o acesso a um pré-natal de qualidade, promovam a equidade no cuidado materno-infantil, fortaleçam os sistemas de registro e diagnóstico e atuem de forma preventiva sobre os determinantes sociais da saúde. Apenas com uma estratégia unificada e justa será viável diminuir a ocorrência e os efeitos das malformações congênitas na infância e durante toda a vida.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico: Anomalias Congênitas no Brasil, 2010 a 2022. Volume 55, nº 6, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-06/@@@download/file>. Acesso em: 25 jun. 2025. GARCIA, C. F. Genética médica aplicada. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2020. MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. Embriologia clínica. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020. SADLER, T. W. Langman embriologia médica. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Congenital anomalies. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>. Acesso em: 25 jun. 2025. LORENA, S. H. T.; BRITO, J. M. S.. Estudo retrospectivo de crianças pré-termo no Ambulatório de Especialidades Jardim Peri-Peri. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v. 72, n. 3, p. 360–364, maio 2009. World Health Organization (WHO). WHO Recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. Geneva: WHO; 2016. CABRAL-OLIVEIRA, Fernando C. et al. Defeitos congênitos – tópicos relevantes. Gazeta Médica da Bahia, Salvador, v. 76, n. supl. 1, p. 34–43, 2006-2007. Disponível em: <https://gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/281/272>. Acesso em: 30 jun. 2025. Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS. Brasília: MS; 2017. SOUSA, L. M. DE . et al.. Idade materna avançada e ocorrência de óbito infantil: estudo ecológico brasileiro. Revista Gaúcha de Enfermagem , ver 46, p. e20240154, 2025. GLICK, I.; KADISH, E.; ROTTENSTREICH, M.

Management of pregnancy in women of advanced maternal age: improving outcomes for mother and baby. International Journal of Women's Health, v. 13, p. 751–759, 2021. DOI: 10.2147/IJWH.S283216. Disponível em: <https://www.dovepress.com/management-of-pregnancy-in-women-of-advanced-maternal-age-improving-ou-peer-reviewed-fulltext-article-IJWH>. Acesso em: xx abr. 2025. BRASIL. Ministério da Saúde. Anomalias congênitas: situação epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/anomalias-congenitas/situacao-epidemiologica>.

Anexos

Tabela - Municípios com maior incidência

Tabela - Peso ao nascer

Tabela - Raça da mãe

Tabela - Tipo de Parto

Tabela - Quantidade adequada de pré-natal

Tabela - Idade Materna

Tabela - Tipo de Gravidez

Tabela - Duração da Gestação

Figura - Nascidos no período 2013 - 2023

Figura - Principais casos de DC

Figura - DC por ano

CÓDIGO: SB1262

AUTOR: HANNA CARVALHO FARIAS DE MELO LIMA

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: Diversidade e colonização radicular por fungos micorrízicos arbuscular (Glomeromycota) em hospedeiro não-micotrófico

Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associam-se com cerca de 72% das plantas, auxiliando na absorção de nutrientes de difícil acesso no solo. Famílias como *Cyperaceae* são consideradas não-micotróficas, incluindo o gênero *Cyperus*. Espécies como *Cyperus maritimus* Poir., restritas a dunas litorâneas, quando associadas aos FMA, podem contribuir para a manutenção do hospedeiro em condição estressante e na integridade dessas áreas. Inventários que buscam compreender a dinâmica de esporulação em dunas costeiras em espécies não-micotróficas são incipientes, visto que sob estresse essas plantas podem desenvolver a associação. Com isso, esse trabalho objetivou avaliar a riqueza de FMA em *C. maritimus* e acompanhar sua taxa de colonização. Para isso, foram coletadas amostras de solo e raízes de *C. maritimus* durante seis meses. As amostras de solo foram submetidas a metodologia de extração de glomerosporos e identificação taxonômica. Além disso, as raízes foram diafanizadas em KOH (15%) e coradas com azul de Trypan (0,05%) para visualização das estruturas fúngicas intrarradiculares. Foram recuperados apenas 223 glomerosporos, distribuídos em sete famílias, sete gêneros e 14 espécies, com *Acaulospora* e *Glomus* como os mais representativos. A taxa de colonização por FMA nas raízes de *C. maritimus* foi baixa, porém diferiu significativamente entre os períodos de coleta. Assim, esse estudo revelou a susceptibilidade da colonização por FMA em espécimes de *C. maritimus*.

Palavras-chave: Cyperaceae. Raízes. Simbiose.

TITLE: Diversity and Root Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota) in a Non-Mycotrophic Host

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associate with approximately 72% of plants, aiding in the absorption of nutrients that are difficult to access from the soil. Families such as *Cyperaceae*, including the genus *Cyperus*, are considered non-mycotrophic. Species such as *Cyperus maritimus* Poir., restricted to coastal dunes, when associated with AMF, can contribute to the maintenance of the host under stressful conditions and the integrity of these areas. Inventories seeking to understand the dynamics of sporulation in coastal dunes in non-mycotrophic species are incipient, as these plants can develop this association under stress. Therefore, this study aimed to evaluate the AMF richness in *C. maritimus* and monitor its colonization rate. To this end, soil and root samples of *C. maritimus* were collected for six months. The soil samples were subjected to glomerospore extraction and taxonomic identification. Furthermore, the roots were cleared in KOH (15%) and stained with Trypan

blue (0.05%) to visualize intraradical fungal structures. Only 223 glomerospores were recovered, distributed among seven families, seven genera, and 14 species, with *Acaulospora* and *Glomus* being the most representative. The AMF colonization rate in *C. maritimus* roots was low, but differed significantly between collection periods, and structures from other fungal groups were also observed. Thus, this study revealed the susceptibility of AMF colonization in *C. maritimus* specimens.

Keywords: Cyperaceae. Root. Symbiosis.

Introdução

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) são microorganismos simbioses obrigatórios, pertencentes ao filo Glomeromycota (Schuëler et al. 2001, Wijayawardene et al. 2020) e realizam associação com mais de 72% das plantas, ocorrendo em grande parte dos ecossistemas (Brundrett. et al 2018, de Queiroz et al., 2022). Esses fungos são capazes de proporcionar melhor absorção de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, essenciais para o crescimento vegetal, em troca recebem metabólitos secundários provenientes da fotossíntese (Smith & Read, 2008, Berruti et al. 2017, Fiorilli et al., 2018). Essa interação promove maior tolerância a estresses ambientais, como salinidade, patógenos do solo e estresse hídrico (Beena et al., 2000). Além disso, possuem importante papel na recuperação de áreas degradadas e na formação de agregados no solo, melhorando a estabilidade e resistência ao processo de erosão (Rillig & Mummey 2006).

Algumas famílias vegetais são reconhecidas como “não-micotróficas”, ou seja, não dependem da associação micorrízica (Trappe 1987) como, por exemplo a família *Cyperaceae* (Miller et al. 1999; Wang e Qiu 2006; Brundrett 2009). Esse grupo vegetal representa a terceira maior família de monocotiledôneas, com aproximadamente 5600 espécies com incidência nos trópicos, sendo o gênero *Cyperus* L. o mais diverso, com aproximadamente 960 espécies (Larridon et al. 2021). No entanto, representantes dessa família podem formar interações com FMA em certas condições ecológicas (Hirrel et al. 1978, Muthukumar et al. 2004, Choudhury et al. 2010, Marins & Carrenho 2017), mas ainda não se conhece quais espécies podem apresentar colonização por FMA e nem quais condições são favoráveis para promover esse fenômeno.

O gênero *Cyperus* é um dos principais componentes herbáceos das restingas brasileiras, presentes no bioma da Mata Atlântica, desenvolvendo-se principalmente em áreas próximas ao litoral (Hefler & Longhi-Wagner 2012, Costa 2013). Essas plantas recebem forte influência do spray marinho, com espécies que apresentam adaptações para suportar as condições ambientais extremas, como seca, salinidade, insolação, fortes ventos, instabilidade do substrato e baixa fertilidade do solo (Cordeiro 2005, Yamato et al. 2008), características típicas de áreas de dunas costeiras.

Plantas do gênero *Cyperus*, como a espécie *Cyperus maritimus*, têm a sua distribuição restrita às dunas litorâneas (Luceño et al. 1997). Essa vegetação associada a presença dos FMA é de extrema importância para manter a integridade dessas áreas e evitar o processo de erosão (Rodríguez-Echeverría et al. 2008). Com isso, tendo em vista o papel da associação dos FMA com essas plantas na estabilidade das dunas, esse trabalho objetivou (i) avaliar a diversidade de FMA ao longo de seis meses e (ii) acompanhar o status de micorrização nas raízes desses indivíduos ao longo de seis meses.

Metodologia

Área do estudo

A coleta foi realizada no Parque Estadual das Dunas de Natal “Jornalista Luiz Maria Alves” (5°46'S 35°12'W), Unidade de Conservação localizada no estado do Rio Grande do Norte, Natal. Possuindo cerca de 80% de cobertura vegetal composta pelo bioma Mata Atlântica, o parque é uma das maiores áreas de preservação urbana com vegetação de dunas em todo o Brasil, além de conter rica biodiversidade (FREIRE, 1990; OLIVEIRA, 1999). A área apresenta clima tropical úmido, com umidade relativa do ar variando com média anual entre 59% e 79% (IDEMA, 2007). O período chuvoso se inicia nos meses de março e abril, podendo ir até agosto ou setembro com pluviosidade máxima no mês de julho (IDEC, 1983; FREIRE, 1990), e precipitações médias anuais de 1191 mm com temperatura de 25,5 °C (Goto et al., 2012). Assim, devido às variações climáticas e formações geomorfológicas, esse bioma possui diversas fitofisionomias, entre elas a de restinga (Muylaert et al. 2018), sendo composta principalmente por espécies pertencentes às famílias *Anacardiaceae*, *Bignoniaceae*, *Fabaceae*, *Myrtaceae* e *Rubiaceae* (Goto et al., 2012).

Coleta de dados

As coletas de solos e raízes foram realizadas mensalmente, de setembro de 2024 a fevereiro de 2025, totalizando seis coletas, cada uma contendo dez amostras. As amostras foram coletadas em quadrantes de 5 m² com agrupamentos de até dez espécimes (*C. maritimus*), com quadrantes equidistantes em cerca de 10 metros. Foi utilizado a metodologia tradicional de coleta de solo entre 0 a 20 cm de profundidade e armazenadas em sacos plásticos do tipo ziploc. Posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia de Micorrizas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Análises dos glomerosporos

Os glomerosporos foram extraídos do solo utilizando a metodologia do peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963 adaptado), que consiste em retirar 50g de cada amostra de solo coletado, lavar três ou mais vezes e despejar em peneiras de malhas 45 < 150 < 710, em seguida transferidos para tubos falcon. Após isso, foi feito a centrifugação em água (3:3000 rpm) e sacarose 70% (1:1000 rpm) (Jenkins 1964, modificado). A amostra foi transferida para uma placa de petri, em seguida os glomerosporos foram separados em diferentes morfotipos (coloração, forma e tamanho) com auxílio de agulhas e estereomicroscópio (40x). Em seguida, foram montadas lâminas para microscopia com PVLG (álcool polivinílico e lactoglicerol) e PVLG + reagente de Melzer (1:1) (Morton et al., 1993), secadas em estufa durante 24 horas.

As espécies foram identificadas com o auxílio de microscópio óptico, seguindo a classificação proposta por Hyde et al. (2024), Wijayawardene et al. (2024) e da Silva et al. (2024). além de descrições disponíveis em coleções internacionais e websites <<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/>>, <<http://invam.wvu.edu/>> e <<http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas>>.

Análises das raízes

As raízes coletadas foram lavadas em água corrente, em seguida, cortadas em fragmentos de 1 cm e clarificadas com hidróxido de potássio (KOH) a 15%. Os fragmentos permaneceram, em média, duas semanas no reagente, com trocas recorrentes, ou até que as estruturas apresentassem translucidez. Posteriormente, foi utilizado o corante azul de Trypan (0,05%) para evidenciar as estruturas de fungos (Phillips & Hayman, 1970), e, em seguida, os fragmentos já corados foram armazenados em lactoglicerol para melhor fixação e preservação das condições do tecido vegetal (Vierheilig et al., 1998). Para cada ponto, foram montadas 10 lâminas contendo 10 fragmentos de raízes por lâmina, totalizando 100 lâminas por coleta e 600 lâminas no total. Por fim as lâminas foram analisadas em microscópio com aumento de 40× (e 100× para visualização de arbúsculos).

Fragmentos radiculares com quaisquer estruturas de FMA (arbúsculos, vesículas, hifas e esporos intraradiculares), além de estruturas de outros grupos de fungos (dark septate) foram considerados colonizados. A porcentagem de colonização radicular (PCol.rad) foi calculada pelo número de fragmentos colonizados/ número de fragmentos totais * 100, sendo determinada pela fórmula:

$$\text{PCol.rad (\%)} = \text{N}^\circ \text{ segmentos colonizados por FMAN}^\circ \text{ segmentos totais} * 100$$

Análise de dados

A representatividade dos táxons por famílias, gêneros e espécies foram obtidas assim como o número de glomerosporos (NE) que foi estimado em triplicatas de 50g de solo seco/amostra. O número relativo de esporos (NR) foi calculado de acordo com a equação: $\text{NR}_i = n_i / n$; onde, NR_i = número relativo de esporos da espécie i , n_i = número total de esporos da espécie i , em 150 g de solo, n = soma do número dos esporos de todas as espécies em 150 g de solo.

Com relação às raízes foram realizados testes para as diferenças na colonização por FMA e Dark Septate (DS) entre os meses de coleta. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade, utilizando o teste de Shapiro Wilk (Zuur et al. 2010). Em razão da não normalidade dos dados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis pelo método de Bonferroni seguido do teste de Dunn para comparação múltipla. Por fim, os resultados foram analisados graficamente por meio de boxplots. As análises foram feitas utilizando o software R versão 4.5.0 (R core Team 2025).

Resultados e Discussões

Foram recuperados 223 glomerosporos distribuídos em 14 espécies classificados em sete famílias (*Ambisporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*, *Glomeraceae*, *Dominikiaceae*, *Sclerocystaceae* e *Paraglomeraceae*) (Figura 1), sete gêneros (*Acaulospora*, *Rhizoglossum*, *Ambispora*, *Dominikia*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Paraglomus*), além de um táxon identificado apenas a nível de filo (Tabela 1). O número de esporos recuperados foi baixo quando comparado com outros trabalhos realizados em áreas de dunas do Rio Grande do Norte (Jobim et al. 2016). Apesar disso, estudos anteriores revelam que a esporulação depende de vários fatores, inclusive tipo de hospedeiro (Moreira et al. 2007). Com isso, investigar um hospedeiro não-micotrófico pode ter sido um fator limitante para a riqueza de espécies encontrada na rizosfera.

Os gêneros mais abundantes foram *Acaulospora* (150 esporos) e *Glomus* (44 esporos), sendo *Acaulospora* o de maior riqueza (7 spp.) com quatro potenciais espécies novas. As espécies

mais abundantes foram: *Acaulospora* sp. 1 (62), *Acaulospora ignota* (48) e *Glomus trufemii* (44) (Figura 2). Apesar do baixo número de esporos recuperados, os gêneros mais abundantes são frequentemente reportados em áreas costeiras (Maun et al. 2009; Oehl et al. 2017). Vale destacar que *Acaulospora ignota* e *Glomus trufemii* foram originalmente descritas para o Parque das Dunas (Blaszkowski et al. 2015, Goto et al. 2012), reforçando a importância da área como reservatório de diversidade de FMA. Além disso, este constitui o primeiro registro de *A. ignota* em amostras de campo. Com isso, a presença desses fungos pode estar relacionada às condições ambientais da área de coleta e do ambiente estressante de dunas, que sofrem diariamente com a ação dos ventos e altas temperaturas.

Os fragmentos de raízes analisadas apresentaram estruturas como esporos, hifas, vesículas e arbúsculos, além de estruturas de outros grupos de fungos como Dark Septate (DS) (Figura 3). As raízes apresentaram taxa de colonização baixa, mas diferiu significativamente (p -value = 1,467) entre os períodos de coleta, sendo os meses de setembro (14,5%) e fevereiro (29,3%) com maior colonização (Figura 4). Mesmo com a baixa colonização por FMA as plantas são susceptíveis à colonização e funcionam como reservatório para os FMA nas zonas costeiras mais expostas a condições de estresse. Além disso, os dados de colonização DS também diferiram significativamente entre os meses de coleta (p -value = 2.864e-05), sendo as maiores taxas de colonização nos meses de Setembro (12,4%), Dezembro (17%) e Fevereiro (25,3%) (Figura 5).

Em concordância com trabalhos anteriores que avaliaram a colonização em espécies de *Cyperaceae* (Marins & Carrenho 2017), os dados obtidos sugerem que DS desempenham um papel em *C. maritimus* em dunas costeiras. Além disso, de acordo com Silveira (1998) fatores que estimulam a esporulação e colonização estão interligados, já que o baixo nível de esporulação pode ter sido um fator que influenciou diretamente na colonização.

A colonização também foi significativa para os Dark Septate (Ascomycota) e que realizam associações com até 80% das raízes de florestas (Grünig et al. 2008). As taxas de colonização observadas, tanto para DS quanto FMA, sugerem uma possível competição entre os organismos (Postma et al. 2007, Marins & Carrenho 2017). Entretanto, trabalhos recentes mostram que múltiplas associações com esses dois grupos de fungos podem ser benéficas para a planta, auxiliando no fortalecimento das raízes (Xie et al. 2021).

Desse modo, variações ambientais extremas beneficiam as plantas ao favorecer a colonização por fungos simbióticos, aumentando a absorção de nutrientes e a resistência ao estresse (Muthukumar et al. 2006; Menoyo et al. 2007; Postma et al. 2007). Ambos grupos de fungos foram registrados com maior frequência em períodos semelhantes. Assim, em ambientes de dunas, caracterizados por solos nutricionalmente pobres, elevadas temperaturas, lixiviação, estresse hídrico, salinidade e processos de erosão, essa interação entre FMA e DSF pode representar uma estratégia adaptativa relevante para a sobrevivência e manutenção de *C. maritimus*, ainda que esses mecanismos ainda precisem ser melhor esclarecidos.

Conclusão

Os resultados mostram que *C. maritimus* é susceptível à colonização por FMA e DS em dunas costeiras e que a rizosfera da planta abriga abrangente diversidade de FMA mesmo em condições de estresse ambiental.

Referências

- Beena, K. R., Raviraja, N. S., Arun, A. B., & Sridhar, K. R. (2000). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of west coast of India. *Current Science*, 79(10), 1459–1466.
- Berruti, A., Lumini, E., & Bianciotto, V. (2017). AMF components from a microbial inoculum fail to colonize roots and lack soil persistence in an arable maize field. *Symbiosis*, 72(1), 73–80.
- Brundrett, M. C. (2009). Associações micorrízicas e outros meios de nutrição de plantas vasculares: compreendendo a diversidade global de plantas hospedeiras por meio da resolução de informações conflitantes e do desenvolvimento de meios confiáveis de diagnóstico. *Plant and Soil*, 320, 37–77.
- Choudhury, B., Kalita, M. C., & Azad, P. (2010). Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in marshy and shoreline vegetation of Deepar Beel Ramsar Site of Assam, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1965–1971. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0377-8>
- Cordeiro, S. Z. (2005). Composição e distribuição da vegetação herbácea em três áreas com fisionomias distintas na Praia do Peró, Cabo Frio, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19, 679–693.
- da Silva, G. A., de Assis, D. M. A., Sieverding, E., & Oehl, F. (2024). Four new families of arbuscular mycorrhizal fungi within the order Glomerales. *Taxonomy*, 4(4), 761–779. <https://doi.org/10.3390/taxonomy4040041>
- De Queiroz, M. B., et al. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota) species inhabiting sediments of lentic and lotic Brazilian ecosystems: Addition of new global records for aquatic condition.
- Fiorilli, V., Vannini, C., Ortolani, F., Garcia-Seco, D., Chiapello, M., Novero, M., ... & Moulin, L. (2018). Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat. *Scientific Reports*, 8(1), 1–18.
- Freire, M. S. B. (1990). Levantamento florístico do parque estadual das dunas do Natal. *Acta Botanica Brasilica*, 4, 41–59.
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving & decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Goto, B. T., Jardim, J. G., Silva, G. A. D., Furrázola, E., Torres-Arias, Y., & Oehl, F. (2012). *Glomus truffemii* (Glomeromycetes), a new sporocarpic species from Brazilian sand dunes. *Mycotaxon*, 120(1), 1–9.
- Hefler, S. M., & Longhi-Wagner, H. M. (2012). *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) na Região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 10(3), 327–327.

- Hirrel, M. C., Mehravar, H., & Gerdemann, J. W. (1978). Vesicular–arbuscular mycorrhizae in the Chenopodiaceae and Cruciferae: do they occur? *Canadian Journal of Botany*, 56(22), 2813–2817. <https://doi.org/10.1139/b78-336>
- Hyde, K. D., Noorabadi, M. T., Thiyagaraja, V., Mq, H., Johnston, P. R., Wijesinghe, S. N., ... et al. (2024). The 2024 Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, 15(1), 5146–6239. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/15/1/25>
- IDEC. Fundação Instituto de Desenvolvimento Econômico do Rio Grande do Norte. (1983). Plano de Manejo: Parque das Dunas do Natal, Natal.
- Jenkins, W. R. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48(9), 692.
- Júnior, A. S., Santos, L. T., Costa, G. A., Barbosa, E. A., Leite, G. L. D., Machado, V. D., & Cruz, L. R. (2013). Manejo de tiririca e trapoeraba com glyphosate em ambientes sombreados *Commelina benghalensis* and *Cyperus rotundus* treated with glyphosate in shaded environments. *Planta Daninha*, 31(1), 213–221.
- Larridon, I., Zuntini, A. R., Lévillé-Bourret, É., Barrett, R. L., Starr, J. R., Muasya, A. M., ... & Baker, W. J. (2021). A new classification of Cyperaceae (Poales) supported by phylogenomic data. *Journal of Systematics and Evolution*, 59(4), 852–895.
- Luceño, M., Alves, M., & Mendes, A. P. (1997). Catálogo florístico y claves de identificación de las ciperáceas de los Estados de Paraíba y Pernambuco (Nordeste de Brasil). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 55, 67–100.
- Maun, M. A. (2009). The biology of coastal sand dunes. Oxford University Press.
- Marins, J. F. D., & Carrenho, R. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in plants associated with aquatic environments. *Acta Botanica Brasilica*, 31, 295–308. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0296>
- Miller, R. M., Smith, C. I., Jastrow, J. D., & Bever, J. D. (1999). Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 86, 547–553. <https://doi.org/10.2307/2656816>
- Muthukumar, T., Udaiyan, K., & Shanmughavel, P. (2004). Mycorrhiza in sedges—an overview. *Mycorrhiza*, 14, 65–77. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0296-3>
- Muylaert, R. L., Vancine, M. H., Bernardo, R., Oshima, J. E. F., Sobral-Souza, T., Tonetti, V. R., ... & Ribeiro, M. C. (2018). Uma nota sobre os limites territoriais da Mata Atlântica. *Oecologia Australis*, 22(3), 302–311.
- Oliveira, F. F. G. (1999). Utilização do Sistema de Posicionamento Global – GPS no Mapeamento e Georreferenciamento Ambiental das Zonas de Proteção Ambiental de Natal-RN (Monografia). Departamento de Geografia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161.

Postma, J. W., Olsson, P. A., & Falkengren-Grerup, U. (2007). Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 400–408.

Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171

Anexos

Figura 1: Distribuição por família dos glomerosporos de espécies mais abundantes de FMA na rizosfera de *C. maritimus* em áreas de Dunas costeiras.

Figura 2. Espécies de FMA encontradas em *C. maritimus*. A – *Acaulospora* sp. 1, B – *Acaulospora* ignota e C – *Glomus trufemii*. Escala: A-C = 50 μ m.

A – Esporos e hifas, B – Arbúsculo, C – Vesícula e D – Dark septate (D). Escala: A-D = 50 μ m.

Figura 5. Colonização por Fungos Micorrízicos Arbusculares (Glomeromycota) na rizosfera de *C. maritimus* por período de coleta.

Figura 5. Colonização por dark septate (Ascomycota) na rizosfera de *C. maritimus* por período de coleta.

Tabela 1. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota) encontrados na rizosfera de *C. maritimus* no Parque das Dunas de Natal.

CÓDIGO: SB1264

AUTOR: RAYARA LOUISE SILVA ALVES

ORIENTADOR: DANIEL MARQUES DE ALMEIDA PESSOA

TÍTULO: Avaliação da densidade populacional de *Leptuca leptodactyla* em dois ambientes de manguezal na bacia do rio Ceará-Mirim no Rio Grande do Norte.

Resumo

Os caranguejos chama-maré apresentam alto potencial de abundância, comportamento dominante, adaptativo e resiliência a diferentes condições ambientais, além de interações sociais intra e interespecíficas evidentes. Algumas espécies constroem ornamentos de areia na entrada da toca, os quais podem desempenhar funções tanto na atração de fêmeas quanto como estratégia antipredatória. Neste estudo, foram investigadas duas populações de *Leptuca leptodactyla*: Uma no Centro de Tecnologia e Aquicultura da UFRN (CTA), convivendo em simpatria com a espécie predadora *Minuca rapax*, e outra em um banco de areia próximo à praia de Barra do Rio (BDR), onde *M. rapax* é menos abundante. O objetivo foi avaliar diferenças na densidade populacional entre essas áreas. Durante a maré baixa, utilizando uma arena feita de placas de acrílico, foram registradas fotos de sete quadrantes (75 x 75 cm), com câmera digital, montada em um tripé. A partir das imagens capturadas, quantificamos o número de machos, fêmeas e tocas, além de classificar os machos como construtores (presença de capuz) ou não. A área de BDR apresentou maior densidade populacional comparada ao CTA. É provável que a coexistência de *L. leptodactyla* com a espécie predadora *M. rapax* no CTA esteja afetando a densidade nessa área. A proporção de machos construtores não apresentou diferença, levantando a hipótese de que o capuz pode estar mais associado à atração de fêmeas do que a uma função antipredatória.

Palavras-chave: Caranguejos chama-maré. Populações. Predação.

TITLE: Evaluation of *Leptuca leptodactyla* population density in two mangrove environments in the Ceará-Mirim River basin in Rio Grande do Norte.

Abstract

Fiddler crabs exhibit high abundance potential, dominant and adaptive behavior, and resilience to diverse environmental conditions, in addition to evident intra- and interspecific social interactions. Some species construct sand ornaments at their burrow entrances, which may serve both female attraction and anti-predator strategies. This study investigated two populations of *Leptuca leptodactyla*: one at the UFRN Aquaculture and Technology Center (CTA), coexisting in sympatry with the predatory species *Minuca rapax*, and the other on a sandbar near Barra do Rio

beach (BDR), where *M. rapax* is less abundant. The objective was to assess differences in population density between these areas. During low tide, using an arena made of acrylic sheets, photographs of seven quadrants (75 x 75 cm) were taken with a digital camera mounted on a tripod. Using the captured images, we quantified the number of males, females, and burrows, and classified males as builders (presence of a hood) or not. The BDR area had a higher population density compared to the CTA. It is likely that the coexistence of *L. leptodactyla* with the predatory species *M. rapax* in the CTA is affecting the density in this area. The proportion of builder males did not differ, raising the hypothesis that the hood may be more associated with attracting females than with an anti-predator function.

Keywords: Fiddler crabs. Populations. Predation.

Introdução

Os caranguejos chama-maré, (também conhecidos como caranguejos-violinistas), são crustáceos semi-terrestres, que habitam áreas de manguezais e estuários. Eles realizam atividades de alimentação e socialização durante a maré baixa, quando saem de suas tocas. Apresentam marcante dimorfismo sexual, caracterizado pelo quelípodo hipertrofiado dos machos, utilizado na atração de fêmeas, no reconhecimento interespecífico e em disputas com outros machos (Clark e Backwell, 2017; Crane, 1975; Peer et al., 2015; Silva et al., 2024). Considerados engenheiros do ecossistema, desempenham funções importantes nos manguezais (Kristensen, 2008; Zeil et al., 2006).

Os ornamentos construídos na entrada das tocas de algumas espécies de chama-maré são utilizados na comunicação sexual. Os machos empregam esses ornamentos para atrair as fêmeas durante a corte, mas eles também podem funcionar como uma forma de proteção contra predadores, em que a presença do capuz pode servir de orientação para os caranguejos encontrarem a toca quando ameaçados (Christy, 1988, 1995; Christy et al., 2002; Christy et al., 2003a; Christy et al., 2003b; De O. Rodrigues et al., 2016; Kim et al., 2007).

A densidade populacional em caranguejos semi-terrestres vem sendo alvo de diversos estudos (Colpo e Negreiros-Fransozo, 2016; Martínez-Soto e Johnson, 2020; Mouton e Felder, 1996). Uma vez que esses animais apresentam elevada plasticidade comportamental, alta capacidade adaptativa e resiliência a diferentes condições e variações ambientais (Capparelli et al., 2016; Levinton e Mackie, 2013; Mokhtari et al., 2015; Yoder et al., 2005). Suas populações podem alcançar altos números de indivíduos (Mouton e Felder, 1996; Peer et al., 2018; Skov e Hartnoll, 2002), que exibem comportamentos sociais intra e interespecífico bem definidos (Bookmythe et al., 2010; Clark e Backwell, 2017; Neylan et al., 2019; Pope e Haney, 2008).

Leptuca leptodactyla é uma das espécies presentes na costa brasileira, ocorre do Pará a Santa Catarina (Laurenzano et al., 2016), preferindo substratos arenosos e apresentando tolerância a ambientes salinos (Crane, 1975). A espécie é relatada com potencial dominante e abundante em diferentes áreas de manguezais (Araújo et al., 2014; Masunari, 2006). Sua carapaça pode variar de coloração alaranjada, cinzenta ou esverdeada, enquanto o quelípodo hipertrofiado é geralmente amarelado (Crane, 1975). Durante o período reprodutivo, tanto a carapaça quanto os apêndices locomotores adquirem uma coloração branca brilhante, conhecida como coloração nupcial (Crane, 1944; 1975).

Neste estudo, investigamos duas populações de *L. leptodactyla*, em áreas de manguezal no município de Extremoz, RN, Brasil, sujeitas a diferentes pressões de predação. A população do Centro de Tecnologia e Aquicultura da UFRN, convive em simpatria com a espécie predadora *Minuca rapax* (Boáz, 2023), abundante nessa região (observação pessoal). Em contraste, na população situada próximo ao estuário de Barra do Rio, observamos poucos indivíduos de *M. rapax* convivendo com *L. leptodactyla* (observação pessoal).

O objetivo deste estudo foi avaliar diferenças na densidade populacional entre as duas populações. Postulamos duas hipóteses: (i) a presença de predadores influencia a densidade populacional, sendo esperado que a coexistência com *M. rapax* reduza a abundância de *L. leptodactyla*; e (ii) a proporção de machos construtores difere entre as áreas com diferentes pressões predatória sendo maior na região em que *L. leptodactyla* vive em simpatria com *M. rapax*.

Metodologia

Área de estudo

A presente pesquisa foi realizada entre os meses de maio e julho em duas áreas de manguezais no município de Extremoz, RN, Brasil, distantes aproximadamente 1,85 km entre si, nas margens do rio Ceará-Mirim. Uma situada no Centro de Tecnologia e Aquicultura da UFRN (CTA) – 5°40'29"S, 35°14'19"W, e, a outra em um banco de areia próximo a praia de Barra do Rio (BDR) – 5°40'36"S, 35°13'19"W (Figura 1).

Aparato Experimental

As áreas foram divididas em setores, e as observações foram realizadas durante a maré baixa, na fase da lua nova. Limitamos sete quadrantes com auxílio de placas de acrílico, com dimensões de 75x75 cm (Figura 2), seguindo a metodologia descrita por Rodrigues et al., (2016). Utilizando uma câmera digital SRL (T2i 18

megapixel, Canon Inc.), acoplada a um tripé e conectada a um controle remoto de disparo sem fio (AODELAN Pebble) capturamos imagens de cada quadrante à distância. Ao lado da arena experimental, foi colocado uma prancheta para anotações referentes ao ambiente, fase da lua, data, setor e o número do quadrante. Também foram dispostos um luxímetro digital (MLM-1020) para medir da luminosidade, uma tabela de cores (Collorcheck), para calibração de cores em fotografias e um termo-higrômetro digital (HTC-2) para registrar a temperatura do ar, do solo e a umidade relativa. Embora os parâmetros de luminosidade, temperatura e umidade tenham sido monitorados no experimento, esses dados não foram incluídos nas análises deste trabalho. Após a montagem dos equipamentos, cronometramos quatro minutos para a captura da foto, tempo esperado para que os animais voltassem a realizar suas atividades após a interferência no ambiente.

Por meio das imagens de cada quadrante, contabilizamos o número de machos, de fêmeas e de tocas. Além disso, também registramos se os machos eram construtores (presença do capuz na entrada da toca) ou não (ausência de capuz).

Análise estatística

Nas análises da densidade média de indivíduos e da densidade de tocas, foi utilizado o teste t, adotando-se um nível de significância de $p = 0,05$. Para avaliar a proporção de machos construtores e não construtores em relação ao total de machos entre os ambientes, foi aplicado o teste exato de Fisher, também com $p = 0,05$.

Resultados e Discussões

A densidade média de indivíduos diferiu entre os ambientes ($p < 0,001$). A área de BDR apresentou em média 817 ind./m², enquanto o CTA a densidade média foi de 20 ind./m² (Figura 3).

As análises da densidade de tocas mostraram que em média BDR apresenta 893 tocas/m² e o CTA 69 tocas/m² (Figura 4). A análise resultou em valor de $p < 0,001$, indicando que existe diferença na densidade de tocas entre os ambientes amostrados.

A proporção de machos construtores não apresentou diferença significativa entre os ambientes ($p = 0,28$). Em BDR, 1,8% dos machos foram caracterizados como construtores, enquanto no CTA esse valor foi de 6,6% (Figura 5).

Os resultados mostraram que a densidade populacional em BDR foi significativamente maior do que no CTA, corroborando a primeira hipótese. Isso sugere que a predação por *M. rapax* (Boáz, 2023), pode estar reduzindo a densidade da espécie no CTA. Além disso, a competição interespecífica por recurso pode intensificar esse efeito, uma vez que as espécies *M. rapax* e *L. leptodactyla* compartilham do mesmo nicho ecológico (Borges et al., 2024; Neylan et al., 2019; Rosenfeld, 2002). A relevância das interação predador-presa na estrutura de populações, já foi documentada em outros estudos em diferentes ecossistemas (Ashton et al., 2022; Salo et al., 2010).

A densidade de tocas em BDR também foi significativamente maior do que no CTA. No entanto, nosso método amostral pode ter subestimado os valores reais, pois o mesmo indivíduo pode cavar mais de uma toca, construir diferentes entradas, ou manter tocas fechadas/inativas (M. et al., 2002; Macia et al., 2001; Skov e Hartnoll, 2001), o que pode levar ao aumento ou à diminuição da estimativa real da densidade de tocas. Vale ressaltar que foram contabilizadas todas as tocas presentes dentro de cada quadrante. Na população do CTA, encontramos tocas de ambas as espécies (*L. leptodactyla* e *M. rapax*), mas nem sempre distinguimos o ocupante, já que muitos indivíduos não estavam fora da toca no momento das fotografias.

A proporção de machos construtores não diferiu estatisticamente entre as áreas, refutando a segunda hipótese. Uma explicação potencial é que o uso desse ornamento esteja mais voltado para a atração de fêmeas (Christy et al., 2001; De O. Rodrigues et al., 2016), do que como uma estratégia antipredatória (Christy, 1995; Christy et al., 2003a) nessas regiões.

Conclusão

A densidade populacional de BDR foi significativamente maior quando comparado ao CTA, que talvez reflita o efeito da interação predador-presa. Por outro lado, não houve diferença significativa na proporção de machos construtores entre as áreas, possivelmente o uso do capuz pode estar mais associado à comunicação sexual do que à defesa contra predadores.

Referências

ARAÚJO, Marina De Sá Leitão Câmara De; TENÓRIO, Deusinete De Oliveira; CASTIGLIONI, Daniela Da Silva. Diversidade e distribuição dos Crustacea Brachyura dos manguezais dos rios Ariquindá e Mamucabas, litoral sul de Pernambuco, Brasil. Revista de Gestão Costeira Integrada, v. 14, n. 3, p. 483–499, set. 2014.

ASHTON, Gail V. et al. Predator control of marine communities increases with temperature across 115 degrees of latitude. *Science* (New York, N.Y.), v. 376, n. 6598, p. 1215–1219, 10 jun. 2022.

BOOKSMYTHE, Isobel; JENNIONS, Michael D.; BACKWELL, Patricia R. Y. Interspecific assistance: fiddler crabs help heterospecific neighbours in territory defence. *Biology Letters*, v. 6, n. 6, p. 748–750, 9 jun. 2010.

BOÁS, D. S. S. O caranguejo-chama-maré predador *Minuca rapax* escolhe um dos sexos da presa de *Leptuca leptodactyla*? 2023. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2023. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/243279>.

BORGES, Jaqueline Santos et al. Goliath is not the enemy: Fiddler crab species of similar size are stronger competitors than their larger adversaries in the climate change context. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 299, p. 108657, 1 abr. 2024.

CAPPARELLI, Mariana V.; ABESSA, Denis M.; MCNAMARA, John C. Efeitos da contaminação por metais in situ na osmorregulação e no consumo de oxigênio no caranguejo violinista *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 185–186, p. 102–111, 1 jul. 2016.

CHRISTY, John; BACKWELL, Patricia R. Y.; GOSHIMA, Seiji. THE DESIGN AND PRODUCTION OF A SEXUAL SIGNAL: HOODS AND HOOD BUILDING BY MALE FIDDLER CRABS *UCA MUSICA*. *Behaviour*, v. 138, n. 9, p. 1065–1083, 2001.

CHRISTY, John H. Pillar Function in the Fiddler Crab *Uca beebei* (II): Competitive Courtship Signaling. *Ethology*, v. 78, n. 2, p. 113–128, 12 jan. 1988.

CHRISTY, John H. Mimicry, Mate Choice, and the Sensory Trap Hypothesis. *The American Naturalist*, v. 146, n. 2, p. 171–181, ago. 1995.

CHRISTY, John H. et al. Sexual selection for structure building by courting male fiddler crabs: an experimental study of behavioral mechanisms. *Behavioral Ecology*, v. 13, n. 3, p. 366–374, 1 maio 2002.

CHRISTY, John H.; BACKWELL, Patricia R.; SCHOBBER, Ursula. Interspecific attractiveness of structures built by courting male fiddler crabs: experimental evidence of a sensory trap. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 53, n. 2, p. 84–91, jan. 2003.

CHRISTY, John H.; BAUM, Julia K.; BACKWELL, Patricia R. Y. Attractiveness of sand hoods built by courting male fiddler crabs, *Uca musica*: test of a sensory trap hypothesis. *Animal Behaviour*, v. 66, n. 1, p. 89–94, jul. 2003.

CLARK, H. L.; BACKWELL, P. R. Y. Territorial battles between fiddler crab species. *Royal Society Open Science*, v. 4, n. 1, p. 160621, jan. 2017.

COLPO, Karine Delevati; NEGREIROS-FRANSOZO, Maria Lucia. Sampling technique affects the population structure assessments of fiddler crab *Minuca vocator* (Herbst, 1804) (Ocypodidae: Gelasiminae). *Nauplius*, v. 24, n. 0, 2016.

CRANE, J. On the color changes of fiddler crabs (Genus *Uca*) in the field. *Zoologica: Scientific Contributions of the New York Zoological Society*, v. 29, n. 15, p. 161–168, 1944.

CRANE, Jocelyn. Fiddler crabs of the world: Ocypodidae: genus *Uca*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1975.

DE O. RODRIGUES, R.; COSTA, T. M.; E. BARRETO, R. Burrow ornamentation in the fiddler crab (*Uca leptodactyla*): female mate choice and male–male competition. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, v. 49, n. 5, p. 317–325, 2 set. 2016.

KIM, Tae Won; CHRISTY, John H.; CHOE, Jae C. A Preference for a Sexual Signal Keeps Females Safe. *PLOS ONE*, v. 2, n. 5, p. e422, 9 maio 2007.

KRISTENSEN, Erik. Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *Journal of Sea Research*, v. 59, n. 1–2, p. 30–43, fev. 2008.

LAURENZANO, Claudia; COSTA, Tânia M.; SCHUBART, Christoph D. Contrasting Patterns of Clinal Genetic Diversity and Potential Colonization Pathways in Two Species of Western Atlantic Fiddler Crabs. PLOS ONE, v. 11, n. 11, p. e0166518, 18 nov. 2016.

LEVINTON, Jeffrey; MACKIE, Joshua. Latitudinal diversity relationships of fiddler crabs: biogeographic differences united by temperature. Global Ecology and Biogeography, v. 22, n. 9, p. 1050–1059, 2013.

M., Skov et al. Quantifying the density of mangrove crabs: Ocypodidae and Grapsidae. Marine Biology, v. 141, n. 4, p. 725–732, 1 out. 2002.

MACIA, Adriano; QUINCARDETE, Ivaldo; PAULA, José. A comparison of alternative methods for estimating population density of the fiddler crab *Uca annulipes* at Saco Mangrove, Inhaca Island (Mozambique). In: PAULA, José P. M.; FLORES, Augusto A. V.; FRANSEN, Charles H. J. M. (Orgs.). Advances in Decapod Crustacean Research. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. p. 213–219.

MARTÍNEZ-SOTO, Kayla S.; JOHNSON, David S. The density of the Atlantic marsh fiddler crab (*Minuca pugnax*, Smith, 1870) (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae) in its expanded range in the Gulf of Maine, USA. Journal of Crustacean Biology, v. 40, n. 5, p. 544–548, 1 set. 2020.

MASUNARI, Setuko. Distribuição e abundância dos caranguejos *Uca* Leach (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 23, p. 901–914, dez. 2006.

MOKHTARI, Mohammad et al. Determination of Key Environmental Factors Responsible for Distribution Patterns of Fiddler Crabs in a Tropical Mangrove Ecosystem. PLOS ONE, v. 10, n. 1, p. e0117467, 28 jan. 2015.

MOUTON, Edmond C.; FELDER, Darryl L. Burrow distributions and population estimates for the fiddler crabs *Uca spinicarpa* and *Uca longisignalis* in a Gulf of Mexico salt marsh. Estuaries, v. 19, n. 1, p. 51–61, 1 mar. 1996.

NEYLAN, Isabelle P. et al. Interspecific and intraspecific interactions between fiddler crabs *Minuca pugnax* (mud fiddler) and *Leptuca pugilator* (sand fiddler) influence

species' burrowing behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 517, p. 40–48, 1 ago. 2019.

PEER, Nasreen et al. Biophysical drivers of fiddler crab species distribution at a latitudinal limit. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 208, p. 131–139, 31 ago. 2018.

PEER, Nasreen; MIRANDA, Nelson Af; PERISSINOTTO, Renzo. A review of fiddler crabs (genus *Uca* Leach, 1814) in South Africa. *African Zoology*, v. 50, n. 3, p. 187–204, 3 jul. 2015.

POPE, Denise S.; HANEY, Brian R. Interspecific signalling competition between two hood-building fiddler crab species, *Uca latimanus* and *U. musica musica*. *Animal Behaviour*, v. 76, n. 6, p. 2037–2048, 1 dez. 2008.

ROSENFELD, Jordan S. Functional redundancy in ecology and conservation. *Oikos*, v. 98, n. 1, p. 156–162, jul. 2002.

SALO, Pälvi et al. Predator manipulation experiments: impacts on populations of terrestrial vertebrate prey. *Ecological Monographs*, v. 80, n. 4, p. 531–546, nov. 2010.

SILVA, Diogo Jackson Aquino; ERICKSON, Marilia Fernandes; PESSOA, Daniel Marques Almeida. The role of carapace colour in species recognition in a fiddler crab. *Animal Behaviour*, v. 216, p. 37–44, 1 out. 2024.

SKOV, M. W.; HARTNOLL, R. G. Comparative suitability of binocular observation, burrow counting and excavation for the quantification of the mangrove fiddler crab *Uca annulipes* (H. Milne Edwards). *Hydrobiologia*, v. 449, n. 1–3, p. 201–212, abr. 2001.

SKOV, Martin W.; HARTNOLL, Richard G. Paradoxical selective feeding on a low-nutrient diet: why do mangrove crabs eat leaves? *Oecologia*, v. 131, n. 1, p. 1–7, mar. 2002.

YODER, Jay A. et al. Herding Limits Water Loss in the Sand Fiddler Crab, *Uca Pugilator*. *Journal of Crustacean Biology*, v. 25, n. 1, p. 141–145, 1 jan. 2005.

Anexos

Figura 1: Áreas de estudo no município de Extremoz, RN: Centro de Tecnologia e Aquicultura da UFRN (CTA) e Barra do Rio (BDR), distantes 1,85 km. Fonte: Adaptado de Google Earth (2025).

Figura 2: Arena experimental com os equipamentos utilizados.

Figura 3: Densidade média de indivíduos encontrados nos ambientes BDR e CTA. Os bigodes representam as margens de erro padrão da média.

Figura 4: Densidade média de tocas encontradas nos ambientes BDR e CTA. Os bigodes representam as margens de erro padrão da média.

Figura 5: Porcentagem de machos construtores e não construtores em relação ao total de machos registrados nos ambientes BDR e CTA.

CÓDIGO: SB1268

AUTOR: MADHYLENE KELYANNE SILVA MACEDO DE MELO

ORIENTADOR: PRISCILA FABIANA MACEDO LOPES

TÍTULO: Tempo de experiência de pescadores artesanais e sua influência na percepção de desigualdade e conflitos socioecológicos.

Resumo

A pesca artesanal é uma das principais bases de subsistência e identidade cultural em comunidades costeiras, mas enfrenta pressões ambientais e territoriais cada vez mais intensas. Nesse contexto, a resiliência socioecológica se apresenta como um conceito para compreender como os pescadores lidam com mudanças e conflitos. Este estudo analisou a influência do tempo de experiência na pesca sobre a percepção de desigualdades e sobre as estratégias de adaptação em comunidades do litoral do Rio Grande do Norte. Questionários aplicados a pescadores com diferentes trajetórias revelaram como os anos de atuação influenciam a leitura das transformações ambientais, das disputas territoriais e das alternativas de continuidade da atividade. Os resultados mostraram que os pescadores mais experientes relataram maior criticidade frente a pressões externas, como turismo, esportes náuticos e ações de fiscalização, valorizando práticas tradicionais e resistência comunitária. Já os menos experientes apresentaram maior vulnerabilidade, mas também maior flexibilidade em aceitar alternativas fora da pesca, principalmente no comércio e em serviços. Conclui-se que o tempo de experiência é determinante para moldar percepções e estratégias adaptativas, reforçando a necessidade de políticas públicas que incorporem os saberes locais, ampliem a participação social e fortaleçam organizações pesqueiras como suporte à resiliência socioecológica.

Palavras-chave: Pesca artesanal; anos de experiência; conflitos socioterritoriais.

TITLE: The experience of artisanal fishermen and its influence on perceptions of inequality and socio-ecological conflicts.

Abstract

Artisanal fishing is one of the main sources of livelihood and cultural identity in coastal communities, but it faces increasingly intense environmental and territorial pressures. In this context, socio-ecological resilience is a concept that helps us understand how fishermen deal with change and conflict. This study analyzed the influence of fishing experience on the perception of inequalities and adaptation strategies in coastal communities in Rio Grande do Norte. Questionnaires administered to fishermen with different backgrounds revealed how years of experience influence the interpretation of environmental changes, territorial disputes, and alternatives for continuing the activity. The results showed that more experienced fishermen reported greater criticality in the face of external pressures, such as tourism, water sports, and enforcement actions, valuing traditional practices and community resistance. Less experienced fishermen, on the other hand, showed greater vulnerability, but also greater

flexibility in accepting alternatives outside of fishing, mainly in commerce and services. It was concluded that length of experience is a determining factor in shaping perceptions and adaptive strategies, reinforcing the need for public policies that incorporate local knowledge, expand social participation, and strengthen fishing organizations as a support for socio-ecological resilience.

Keywords: Artisanal fishing; years of experience; socio-territorial conflicts.

Introdução

As comunidades pesqueiras artesanais desempenham papel central na manutenção da segurança alimentar, da economia costeira e da diversidade cultural, sendo sustentadas por práticas de pesca, saberes tradicionais e redes sociais construídas ao longo do tempo (BATISTA et al., 2014). A atividade pesqueira artesanal não se limita à extração de recursos marinhos, mas envolve também percepções, memórias e formas de territorialidade que moldam a relação dos pescadores com o ambiente (SILVA, 2020). Essa relação é continuamente influenciada pelo acúmulo de experiência, que fornece tanto conhecimento ecológico quanto capacidade de interpretar transformações sociais e ambientais.

Apesar de sua relevância, as comunidades pesqueiras enfrentam crescentes conflitos socioterritoriais devido à intensificação de atividades externas, como turismo, esportes náuticos e grandes empreendimentos costeiros (BATISTA et al., 2014). Esses conflitos resultam da sobreposição de interesses sobre o mesmo território e impactam diretamente o acesso a recursos essenciais, agravando desigualdades históricas (WANG et al., 2025). A ausência de mecanismos de governança participativa amplia a vulnerabilidade dos pescadores, comprometendo a continuidade da atividade e fragilizando as condições para que possam manter seus modos de vida (SILVA, 2020).

Diante dessas pressões, pescadores artesanais têm mobilizado diferentes estratégias adaptativas. Entre elas destacam-se a diversificação das espécies capturadas, o deslocamento para outras áreas de pesca e, em casos mais críticos, a busca por ocupações alternativas (ALEMU, 2025). Tais estratégias refletem a resiliência socioecológica, entendida como a capacidade de indivíduos e comunidades de lidar com mudanças e incertezas sem perder sua base de sustentação social e econômica (ISLAM, 2024). Entretanto, essa resiliência não é homogênea: diferentes trajetórias de vida e tempos de experiência na pesca condicionam tanto a percepção dos impactos quanto às respostas de adaptação (MOZUMDER et al., 2018).

Tendo em vista o contexto abordado, este estudo tem como objetivo analisar de que forma os anos de experiência na pesca artesanal influenciam a percepção de conflitos, desigualdades e estratégias de adaptação em comunidades pesqueiras do Rio Grande do Norte. Parte-se da hipótese de que pescadores com maior tempo de atuação possuem percepções mais críticas sobre processos de desigualdade e maior acúmulo de memória ecológica, enquanto aqueles com menos tempo de experiência tendem a expressar maior flexibilidade, mas também maior vulnerabilidade frente às transformações socioecológicas.

Metodologia

Área de estudo:

A presente pesquisa foi realizada na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Estadual Ponta do Tubarão (RDSEPT), que se localiza nos municípios de Macau e Guamaré, no estado do Rio Grande Do Norte, Nordeste do Brasil. As principais comunidades do estudo desenvolvido na Unidade de Conservação (UC) são os distritos de Barreiras, Diogo Lopes e Sertãozinho.

Figura 1: Localização da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Estadual Ponta do Tubarão/RN.

A RDSEPT abrange uma área total de 12.960 hectares, sendo 5.585,7 hectares destinados especificamente à Zona de Proteção Pesqueira (ZPP), criada pela Lei Federal nº 8.349/2003. Sua implementação foi fruto da mobilização comunitária, com destaque para a atuação das mulheres pescadoras, que se organizaram em defesa de seus modos de vida e da conservação ambiental. Essa mobilização ocorreu diante da ameaça de perda do território pesqueiro provocada pela pressão da especulação imobiliária e pela expansão da carcinicultura, atividades que colocavam em risco a continuidade dos nichos socioecológicos e das práticas tradicionais de pesca (NOBRE, 2011; RIO GRANDE DO NORTE, 2018; MIRANDA, 2024). Desse modo, torna-se evidente que a configuração dessa área de estudo possui uma extrema relevância social para o contexto da pesca artesanal dentro de comunidades tradicionais.

Coleta de dados

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos a partir de um questionário semiestruturado com perguntas abertas e fechadas, aplicado presencialmente entre pescadores e marisqueiras, garantindo representatividade de diferentes faixas etárias e tempos de experiência na atividade. O questionário abrangeu seções temáticas que incluem: perfil da atividade pesqueira; vulnerabilidade/conflitos; percepção de desigualdades; perfil socioeconômico; e, como adicional, identificação de conflitos territoriais e estratégias de adaptação empregadas na pesca.

Sendo assim, a primeira seção do questionário reuniu informações sobre o perfil da atividade pesqueira, contemplando a finalidade da pesca (comércio, subsistência ou ambos), os anos de experiência, o tipo de embarcação, os petrechos e as espécies capturadas. A segunda parte abordou a percepção de desigualdades, com questões baseadas em Bennett et al. (2021), investigando direitos, necessidades básicas, conhecimento tradicional, valores, acesso a informações, participação em decisões e manejo da atividade, utilizando a escala Likert (de 1 a 5) para mensurar o grau de concordância de cada indivíduo com as afirmações. A terceira seção tratou da vulnerabilidade e dos conflitos, explorando alternativas econômicas frente às dificuldades da pesca, expectativas de futuro fora da atividade, tipos e frequência dos conflitos e estratégias de resolução. A quarta subdivisão reuniu dados do perfil socioeconômico, incluindo escolaridade, renda familiar e composição do domicílio da pessoa entrevistada. Por fim, a quinta parte tratou da identificação de conflitos territoriais (como turismo, esportes náuticos e disputas internas) e das estratégias de adaptação utilizadas, como mudança de espécies alvo de pesca, deslocamento de área ou busca por atividades alternativas.

Para a seleção dos participantes, foi utilizada a técnica de amostragem em Bola de Neve (Snowball sampling), que consiste na indicação sucessiva de novos entrevistados a partir de contatos previamente estabelecidos (VINUTO, 2014). As entrevistas foram conduzidas de forma individual, em locais de convivência comunitária, garantindo confidencialidade e

fidedignidade das respostas. A coleta ocorreu de forma presencial entre junho e novembro de 2023, seguindo as normas éticas da Resolução nº 466/2012 e resguardada pela autorização do órgão gestor da UC (IDEMA, processo nº 8/2023). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assegurando anonimato, além do respeito às diferenças culturais, linguísticas e educacionais das comunidades (MIRANDA, 2024). Dessa maneira, na presente pesquisa, foi desenvolvida a análise dos dados coletados e a atuação em atividades complementares relacionadas à temática da etnoecologia, que consiste na relação das pessoas com o uso dos recursos ambientais naturais e suas contribuições para a conservação (PRADO, 2015), contribuindo para a compreensão da ecologia humana como ferramenta de produção de dados científicos sobre os modos de vida e territorialidades das comunidades pesqueiras.

Análise de dados

As respostas foram organizadas em planilha eletrônica (Microsoft Excel) para sistematização e posterior análise e elaboração de tabela expositiva de dados por meio de porcentagem. A descrição estatística dos dados foi feita por meio de frequências absolutas e relativas com o auxílio do software GraphPad Prism para elaboração de gráficos e análises estatística básicas, permitindo caracterizar os principais conflitos e estratégias relatados, que desencadearam em tabulações cruzadas com a variáveis dos anos de experiência na pesca e das percepções de desigualdade (reconhecimento, gestão e ambiental), possibilitando comparar como pescadores com trajetórias distintas percebem os conflitos socioterritoriais, as desigualdades e os meios de adaptação. Esse procedimento assegura a replicabilidade da pesquisa, uma vez que o instrumento de coleta, as variáveis e as técnicas empregadas estão claramente descritas.

Resultados e Discussões

No total, foram entrevistados 37 pescadores artesanais, sendo avaliada a variável de anos de experiência na atividade pesqueira. Dessa forma, foi possível identificar que 14 pescadores (37,8%) possuíam entre 7 e 15 anos de experiência, enquanto 9 pescadores (24,3%) relataram ter entre 16 e 30 anos na atividade. O grupo de pescadores com 31 a 55 anos de experiência também foi composto por 14 pescadores (37,8%). Esses dados revelam uma distribuição equilibrada entre indivíduos com menor tempo de atuação e aqueles com longa trajetória de trabalho, demonstrando a coexistência de diferentes gerações dentro da prática pesqueira. Assim, é possível identificar uma equidade representativa entre pescadores com pouca e muita experiência, o que enriquece a análise comparativa das percepções sobre desigualdade, conflitos e estratégias adaptativas.

Figura 2 - Representação da média das percepções de desigualdade segundo as três dimensões avaliadas: equidade de gestão, equidade ambiental e equidade de reconhecimento.

A análise das respostas obtidas permitiu identificar diferentes dimensões da percepção de desigualdade nas comunidades pesqueiras, levando à média geral da percepção na Escala de Likert (Figura 2), que demonstra que a Equidade de Gestão apresentou os maiores valores médios (próximo a 3), seguida da Equidade Ambiental (entre de 2 e 3), enquanto a Equidade de Reconhecimento obteve a menor média (próxima a 2). Esses resultados indicam que os entrevistados reconhecem maior desigualdade nas formas de reconhecimento social, em comparação à gestão e ao acesso aos recursos ambientais.

Figura 3 - Relação entre os anos de experiência na pesca artesanal e a percepção de desigualdade na dimensão de reconhecimento de cada indivíduo.

A relação entre anos de experiência na pesca e a percepção de desigualdade mostrou variações significativas. No caso da desigualdade de reconhecimento (Figura 3), pescadores com maior tempo de atuação (30–50 anos) atribuíram valores mais elevados na escala, revelando uma percepção crítica sobre a falta de valorização de seus conhecimentos e suas práticas tradicionais. Em contraste, indivíduos com menos de 20 anos de experiência apresentaram avaliações mais heterogêneas, com registros tanto de baixa quanto de alta percepção de desigualdade.

Figura 4 - Relação entre os anos de experiência e a percepção de desigualdade na dimensão de gestão da RDSEPT.

Com relação à percepção da gestão (Figura 4), os valores mais altos de percepção de desigualdade se concentram entre pescadores entre 15 e 45 anos de experiência. Esses resultados sugerem que o acúmulo de tempo de trabalho fortalece a compreensão sobre as falhas nos processos de decisão e participação relacionados à atividade pesqueira. Entre os mais experientes (acima de 50 anos), os valores tendem a diminuir, possivelmente refletindo tanto a adaptação a longos períodos de conflito quanto a menor inserção em espaços de gestão formal.

Figura 5 - Associação entre os anos de experiência e a percepção de desigualdade ambiental encontrada na Unidade de Conservação.

Já a relação acerca da percepção de desigualdade ambiental (Figura 5) alcançou maiores valores entre pescadores com 25 a 40 anos de experiência, enquanto os mais jovens e os mais velhos indicaram níveis mais baixos. Esse padrão pode refletir o fato de que aqueles em plena atividade produtiva estão mais diretamente expostos aos conflitos socioambientais, como a redução de estoques pesqueiros e as disputas por território aquático.

Tabela 1 - Sistematização dos principais conflitos relatados pelos pescadores e as estratégias de adaptação utilizadas diante das dificuldades enfrentadas na pesca artesanal na RDSEPT.

Além disso, os dados da planilha (Tabela 1) evidenciaram os principais conflitos e as estratégias relatadas. Entre as situações negativas, destacam-se os problemas com pessoas no local de pesca (59,4%), a percepção de que atividades externas espantam os peixes (16,2%) e a falta de apoio dos órgãos ambientais (16,2%). Como formas de resolução, a maioria dos entrevistados rejeitou medidas de expulsão, mas indicou abertura para alternativas como realização de reuniões (64,9%), apontando para a importância de mecanismos coletivos de negociação e mediação de conflitos.

Com base no que foi exposto nos resultados, torna-se possível identificar a evidência de uma equidade representativa entre pescadores com pouca e muita experiência, permitindo comparar percepções de diferentes gerações. Pescadores mais experientes destacaram maior criticidade quanto ao reconhecimento social e às falhas de governança pesqueira, o que converge com análises de Batista et al. (2014) sobre a exclusão das comunidades nos processos de gestão. Levando em consideração a percepção de desigualdade ambiental que foi mais evidente em pescadores em fase produtiva e inicial de 7 a 15 anos, são refletidos os impactos diretos sobre os estoques e territórios, como discute Wang et al. (2025) ao analisar a distribuição desigual dos efeitos em sistemas socioecológicos.

Com isso, as estratégias de adaptação relatadas pelos entrevistados, busca por atividades alternativas que reforcem tanto a capacidade de resposta das comunidades quanto suas vulnerabilidades socioeconômicas. Esse padrão se aproxima das conclusões de Alemu (2025), que evidencia a insuficiência das respostas locais frente às pressões externas, e também das análises de Mozumder et al. (2018), que destacam como a resiliência social em comunidades pesqueiras costeiras depende de fatores como capital social, acesso a oportunidades e manutenção de laços comunitários que se entrelaçam diretamente com os meios de desigualdades abordados no estudo.

Sob essa perspectiva, a experiência acumulada pelos pescadores torna-se um fator central para a resiliência socioecológica individual e coletiva. Estudos como o de Islam (2024) indicam que pescadores com maior tempo de vivência acumulam não apenas conhecimentos ecológicos, mas também memórias de eventos extremos e estratégias de enfrentamento, ampliando sua capacidade de resposta a crises. Por outro lado, pescadores com menor experiência podem demonstrar maior flexibilidade na adaptação, mas também maior vulnerabilidade frente à incerteza, evidenciando a necessidade de políticas que considerem diferentes trajetórias geracionais.

Conclusão

Conclui-se que o tempo de experiência na pesca artesanal é um fator determinante para compreender como os pescadores percebem desigualdades, enfrentam conflitos e estruturam suas estratégias de adaptação. Pescadores com maior trajetória na atividade revelaram maior consciência das transformações ambientais e territoriais, além de relatarem de forma mais crítica os conflitos com atividades externas. Já aqueles com menor tempo de atuação mostraram maior flexibilidade em considerar alternativas produtivas, mas também maior vulnerabilidade diante das incertezas. Esses achados confirmam que a experiência acumulada fortalece a capacidade de interpretação e resposta às mudanças, posicionando o conhecimento tradicional como eixo central da resiliência socioecológica.

Nesse cenário, torna-se indispensável o fortalecimento de políticas públicas que valorizem o saber local, promovam a participação efetiva das comunidades em instâncias de decisão e garantam condições de continuidade para a pesca artesanal. Além disso, pode-se recomendar que pesquisas futuras aprofundem a análise sobre a transmissão intergeracional de saberes e a inserção de políticas públicas nas estratégias adaptativas que se interliguem com os territórios de pesca, de modo a subsidiar práticas de manejo mais justas e sustentáveis.

Referências

ALEMU, I.; JAHSON, B. Perceptions and adaptive strategies of artisanal fishers to a changing environment. *Regional Studies in Marine Science*, v. 82, p. 104045, 2025. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.rsma.2025.104045>.

BATISTA, V. S.; FABRÉ, N. N.; MALHADO, A. C. M.; LADLE, R. J. Pesca costeira artesanal tropical: desafios e direções futuras. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2014. DOI:<https://doi.org/10.1080/10641262.2013.822463>.

BENNETT, N. J. et al. Advancing social equity in and through marine conservation. *Frontiers in Marine Science*, v. 8, 711538, 2021.
DOI:<https://doi.org/10.3389/fmars.2021.711538>.

COSTA, H.; SCACHETTI, R.; VIVACQUA, M.; CHOUERI, R. Uma estrutura para avaliar atributos de resiliência com base no conhecimento local. *Política Marinha*, v. 153, p. 105766, 2023. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2023.105766>.

DA SILVA, Lucas Antonio. Navegando sobre lugares: um ensaio da percepção do ambiente através de uma etnografia arqueológica da pesca. Tekoporá. *Latin América Review of Environmental Humanities and Territorial Studies*, v. 2, n. 2, p. 144-166, 2020.
DOI:<https://doi.org/10.36225/tekopora.v2i2.53>.

ISLAM, M. Fishermen using social-ecological resilience adapting coastal disasters. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, [s. l.], 2024.
DOI:<https://doi.org/10.1007/s11027-024-10110-y>.

MIRANDA, Mirian Luiza Oliveira do Nascimento. Desigualdade, conflitos e gênero em uma unidade de conservação no Nordeste do Brasil. 2024. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2024.

MOZUMDER, M.; WAHAB, M.; SARKKI, S.; SCHNEIDER, P.; ISLAM, M. Fortalecendo a resiliência social das comunidades pesqueiras costeiras: um estudo de caso da pesca de Hilsa (*Tenualosa ilisha* H.) em Bangladesh. *Sustentabilidade*, v. 10, n. 3501, 2018.
DOI:<https://doi.org/10.3390/SU10103501>.

NOBRE, I. M. Revelando os modos de vida da Ponta do Tubarão: a fotocartografia sociocultural como uma proposta metodológica. Natal: EDUFRN, 2011.

PRADO, Helbert Medeiros; MURRIETA, Rui Sérgio Sereni. A etnoecologia em perspectiva: origens, interfaces e correntes atuais de um campo em ascensão. *Ambiente & Sociedade*, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 139-160, out./dez. 2015. DOI:<https://doi.org/10.1590/1809-4422ASOC986V1842015>.

QUINTANA, A. et al. Feedbacks sócio-ecológicos positivos na conservação baseada na comunidade. *Frontiers in Marine Science*, v. 8, 2021.
DOI:<https://doi.org/10.3389/fmars.2021.652318>.

RIO GRANDE DO NORTE. CARVALHO, R. G. (coord.). Plano de Manejo da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Estadual Ponta do Tubarão. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Natal, 2018.

SILAS, M. et al. Capacidade adaptativa e estratégias de enfrentamento da pesca costeira de pequena escala em relação ao declínio da captura de peixes: percepções das comunidades da Tanzânia. *Environmental Science & Policy*, 2020.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.envsci.2020.03.012>.

VINUTO, Juliana. A amostragem em bola de neve na pesquisa qualitativa: um debate em aberto. *Temáticas*, Campinas, SP, v. 22, n. 44, p. 203–220, 2014. DOI:
<https://doi.org/10.20396/tematicas.v22i44.10977>. Disponível
em:<https://econtents.bc.unicamp.br/inpec/index.php/tematicas/article/view/10977>. Acesso
em: 25 ago. 2025.

WANG, Yixu; GONG, Jie; YANG, Zhihui; ZHU, Yuehua. Social-ecological system research in a changing world: state of the art and future challenges. *Journal of Cleaner Production*, v. 489, p. 144725, 2025. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.144725>.

WOODS, P. et al. Uma revisão das opções de adaptação na gestão das pescas para apoiar a resiliência e a transição sob mudanças socioecológicas. *Revista ICES de Ciências Marinhas*, v. 78, n. 5, p. 1463–1478, 2021. DOI:<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsab146>.

Anexos

Figura 1: Localização da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Estadual Ponta do Tubarão/RN. Fonte: Autoral.

Figura 2 - Representação da média das percepções de desigualdade segundo as três dimensões avaliadas: equidade de gestão, equidade ambiental e equidade de reconhecimento. Fonte: Autoral.

Figura 3 - Relação entre os anos de experiência na pesca artesanal e a percepção de desigualdade na dimensão de reconhecimento de cada indivíduo. Fonte: Autoral.

Figura 4 - Relação entre os anos de experiência e a percepção de desigualdade na dimensão de gestão da RDSEPT. Fonte: Autoral.

Figura 5 - Associação entre os anos de experiência e a percepção de desigualdade ambiental encontrada na Unidade de Conservação. Fonte: Autoral.

Tabela 1 - Sistematização dos principais conflitos relatados pelos pescadores e as estratégias de adaptação utilizadas diante das dificuldades enfrentadas na pesca artesanal na RDSEPT. Fonte: Autoral.

CÓDIGO: SB1271

AUTOR: LUCAS EMANUEL DA SILVA FERREIRA

COAUTOR: GABRIEL VICTOR DE LIMA PIMENTEL

COAUTOR: LUIS FELIPE PEREIRA DANJOUR

COAUTOR: AYRON MATEUS MATIAS ALVES

COAUTOR: HELOISA MARTINS FRANCA

COAUTOR: ELIAS DOS SANTOS BATISTA

ORIENTADOR: DENISE MORAIS LOPES GALENO

TÍTULO: Telemedicina e diagnóstico dos distúrbios respiratórios durante o sono

Resumo

A apneia obstrutiva do sono (AOS) é um distúrbio prevalente, associado a importantes repercussões cardiovasculares, respiratórias e psicossociais. Por isso, Este estudo descritivo, transversal e analítico, realizado na UFRN, teve como objetivo avaliar sintomas clínicos, parâmetros de dessaturação noturna e risco cardiovascular em indivíduos com suspeita de AOS, além de discutir o papel da telemedicina como ferramenta diagnóstica. Foram incluídos 24 participantes (idade média $37,6 \pm 18,4$ anos), submetidos a questionários online (Biologix®) e polissonografia tipo IV. Observou-se IMC médio em faixa de sobrepeso, com o ronco como sintoma mais frequente, seguido por sono não reparador. O Índice de Dessaturação de Oxigênio (IDO) apresentou média de 11,4 eventos/hora e mostrou correlação robusta com a carga hipóxica, reforçando sua relevância como marcador de gravidade e risco cardiovascular. A idade associou-se à maior fragmentação do sono e vulnerabilidade à hipóxia. A análise conjunta dos achados destaca a importância da triagem simplificada e da incorporação da telemedicina, que demonstrou viabilidade diagnóstica e possível aplicabilidade nos sistemas de saúde. Conclui-se que estratégias acessíveis podem auxiliar no diagnóstico da AOS, mitigar suas repercussões clínicas e sociais e contribuir para uma melhor qualidade de sono e vida dos pacientes afetados.

Palavras-chave: Fatores de Risco de Doenças Cardíacas, Apneia, Sono, Telemedicina

TITLE: Telemedicine and diagnosis of respiratory disorders during sleep

Abstract

Obstructive sleep apnea (OSA) is a prevalent disorder associated with significant cardiovascular, respiratory, and psychosocial consequences. Therefore, this descriptive, cross-sectional, and analytical study, conducted at UFRN, aimed to evaluate clinical

symptoms, nocturnal desaturation parameters, and cardiovascular risk in individuals with suspected OSA, as well as to discuss the role of telemedicine as a diagnostic tool. A total of 24 participants (mean age 37.6 ± 18.4 years) were included and underwent online questionnaires (Biologix®) and type IV polysomnography. The mean BMI was within the overweight range, with snoring being the most frequent symptom, followed by non-restorative sleep. The Oxygen Desaturation Index (ODI) averaged 11.4 events/hour and showed a strong correlation with hypoxic burden, reinforcing its relevance as a marker of disease severity and cardiovascular risk. Age was associated with greater sleep fragmentation and increased vulnerability to hypoxia. The combined analysis of the findings highlights the importance of simplified screening and the incorporation of telemedicine, which demonstrated diagnostic feasibility and potential applicability within healthcare systems. In conclusion, accessible strategies may assist in the early diagnosis of OSA, mitigate its clinical and social consequences, and contribute to improved sleep quality and overall patient well-being.

Keywords: Heart Disease Risk Factors, Apnea, Sleep, Telemedicine

Introdução

A apneia obstrutiva do sono (AOS) pode afetar aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (Benjafield et al., 2019) e se caracteriza como o distúrbio mais prevalente das desordens do sono (Tufik et al., 2010) que contribui com a incidência de desfechos cardiovasculares, respiratórios e evolução clínica desfavorável (Di Fusco et al., 2020). Vale destacar que a hipoxemia noturna está associada ao comprometimento cognitivo (YAFFE et al., 2011) e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SHARMA et al., 2018; ZUURBIER et al., 2016). Mais pesquisas são necessárias para elucidar a conectividade entre dessaturação noturna de oxigênio e degeneração estrutural e funcional em regiões cerebrais parahipocampais (NAISMITH et al., 2019). A pandemia da COVID-19 infligiu desafios na prestação segura dos serviços diagnósticos e terapêuticos afetando todas as áreas do sistema de saúde, incluindo a medicina do sono (Johnson et al., 2021; Kim et al., 2021). O fechamento de centros de saúde e protocolos de distanciamento social causaram enorme impacto na saúde emocional, física e social (Tull et al., 2020; Wang et al., 2021). No campo da medicina do sono, a polissonografia (PSG) é padrão ouro no diagnóstico dos distúrbios do sono (IBER et al., 2007), porém seu uso permanece limitado pelos elevados custos dos exames e falta de cobertura gratuita desse serviço pelo Sistema único de Saúde (SUS). Esse projeto é desafiador, pois busca ativar um centro seguro de prevenção e controle de doenças relacionadas ao sono após uma súbita paralização desses serviços decorrente dos riscos associados a contaminação viral. Diante dessas considerações, essa proposta destaca fortemente a triagem precoce para AOS como um potencial fator de risco para os desfechos negativos a longo prazo. A utilização de ferramentas como a polissonografia, atualmente disponível, tende a favorecer um melhor delineamento dos fatores de risco cardiorrespiratórios e comorbidades, a fim de formular estratégias inovadoras que abordem a prevenção e a promoção da saúde de maneira mais precisa. Como perspectiva, esse estudo também tende a contribuir com uma maior visibilidade do uso da telemedicina no diagnóstico de distúrbios do sono. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é Realizar a triagem diagnóstica da apneia obstrutiva do sono (AOS) através de exames polissonografia tipo IV, Elucidar a conectividade entre dessaturação noturna de oxigênio e o risco cardiovascular e a sonolência diurna; Correlacionar a AOS com a insônia, eficiência do sono, estresse,

ansiedade e depressão; explorar, Estimular e expandir o uso da telemedicina do sono como possibilidade de prevenir complicações cardiovasculares, de forma precoce, nas redes gratuitas de saúde, buscando aprimorar a atenção à saúde; Integrar conhecimentos técnico-científicos, contribuindo para a formação de profissionais competentes para o estado do Rio Grande do Norte.

Metodologia

Trata-se de um estudo descritivo, de delineamento transversal e analítico, com abordagem quantitativa e qualitativa dos dados, que será realizada por meio da aplicação de formulário Online, exames clínicos de polissonografia tipo IV e avaliação física geral. Inicialmente será realizado um questionário online no aplicativo do Biologix®, o qual analisa condições na noite do exame (consumo de álcool, congestão nasal, sedativos, placa de bruxismo, marcapasso), tratamento na noite do exame (CPAP, aparelho de avanço da mandíbula, terapia posicional, oxigênio, suporte ventilatório) sintomas (Ronco alto e frequente Sonolência excessiva diurna Sono não reparador Despertares frequentes Engasgos noturnos Refluxo gastroesofágico Cefaleia matinal Dificuldade de concentração Perda de memória Diminuição da libido ou disfunção erétil) e doenças associadas (Hipertensão arterial Diabetes Dislipidemia Câncer Depressão Arritmia cardíaca Infarto agudo do miocárdio Angina Insuficiência cardíaca Acidente vascular cerebral (AVC) Bronquite / Enfisema Asma), pergunta-se também o peso e altura do voluntário, adquirindo-se o Índice de massa corpórea (IMC), dados cujo paciente recebeu algum dos tratamentos citados no questionário .na noite do exame. foram desconsiderados. O estudo compreenderá, inicialmente, uma triagem diagnóstica da AOS mediante polissonografia tipo IV, onde será utilizado o Biologix®, um sensor Oxistar BX1 na forma de um oxímetro de dedo de alta resolução, que mede de forma não invasiva a análise da oxigenação do sangue (SpO2), frequência de pulso cardíaco (FC). O diagnóstico da apneia seguirá as recomendações da Academia Americana de Medicina do Sono (AASM, 2020) e será executada pelo Fisioterapeuta habilitado utilizando critérios de pontuação padronizados, conforme rotina do Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica, pertencente ao Departamento de Fisiologia Comportamento da UFRN. A pesquisa compreenderá uma amostragem não probabilística, por conveniência na população de profissionais e estudantes de ambos os sexos entre 19-83 anos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Todos os participantes assinarão um termo de consentimento da pesquisa e o projeto foi aprovado sob o número: 6.757.344 CEP-UFRN. O estudo será realizado no Laboratório de Sono e Psicofisiologia, pertencente ao Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica, Departamento de Fisiologia e Comportamento da UFRN que ocorrerá entre setembro de 2024 a agosto de 2025. Os critérios de inclusão serão alunos e profissionais de ambos os sexos, entre 19 e 83 anos, residentes em Natal-RN, Brasil, ou cidades próximas, com interesse demonstrado neste estudo. Serão excluídos participantes com sintomas gripais, portadores de doenças neurológicas, usuários de drogas, síndrome do pânico, incapacidade de preencher os questionários devido a barreiras cognitivas ou linguísticas, gestantes, tiverem utilizado algum tratamento de suporte respiratório e aqueles que não assinaram o termo de consentimento do estudo (TCLE). O convite para participação ocorrerá através de mídias sociais tradicionais, como, WhatsApp, facebook e Instagram, a partir da divulgação aleatória dessa pesquisa por partes dos pesquisadores, alunos de graduação, pós-graduação e docentes do departamento de Fisiologia e Comportamento da UFRN. A pesquisa oferece riscos mínimos aos indivíduos, pois a polissonografia é um exame não invasivo e indolor, no entanto durante a realização da pesquisa poderão ocorrer eventuais

desconfortos e possíveis riscos. Pode causar, embora seja raro, uma leve irritação na pele, vermelhidão ou coceira, devido ao contato com a fita adesiva que o sensor ao dedo do paciente. Todas as recomendações serão passadas para o voluntários, bem como toda a coleta de dados será realizada por técnicos de laboratórios e por discentes treinados sob supervisão do pesquisador responsável por essa pesquisa. Para minimizar qualquer constrangimento ou desconforto no momento das avaliações, o procedimento será realizado em ambiente reservado, para trazer mais conforto e privacidade ao participante. Seguiremos todos os protocolos de limpeza à base de álcool recomendadas pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças. Além disso, todas as informações obtidas na pesquisa serão mantidas em sigilo. Serão consideradas as observâncias éticas contempladas na Resolução nº466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde. Aos participantes que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, terão direito à indenização, por parte do pesquisador e da instituição envolvida nas diferentes fases da pesquisa conforme o que preconiza a Resolução 466/12 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos. Esses resultados devem contribuir, no futuro, com dados estatísticos para a prestação de serviços e cuidados de saúde adequados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e contribuir para aliviar a escassez de atenção dos serviços públicos de saúde direcionados a análise dos distúrbios do sono e complicações respiratórias. A estatística descritiva será utilizada para interpretar os dados, expressos em média e desvio padrão (média $\pm$ DP) para os dados paramétricos. Para valores não paramétricos, serão utilizadas as medianas e as variações máxima e mínima. As correlações entre as variáveis serão feitas pelos testes de Pearson ou Spearman. Para comparar os valores entre duas variáveis, serão utilizados os testes T de Student e para amostras não paramétricas utilizaremos o teste de Wilcoxon. As variáveis qualitativas serão apresentadas como frequências absolutas (n) e relativas (%). O nível de significância estatística será fixado em 5% para todos os testes ($p \leq 0,05$). O pacote estatístico utilizado será o programa Statistic versão 7.0 e os gráficos serão realizados através do programa Graphpad Prism 5.0. Análises descritivas serão efetuadas para descrever as variáveis cruzadas.

Resultados e Discussões

A amostra dos questionários é representada por 24 participantes ($n=24$) com idade média de $37,62 \pm 18,4$ anos, dos quais 45,8% são estudantes, 4,2% trabalham como servidor da instituição e 50% trabalha como professor. Como 19 indivíduos da amostra possuíam mais de uma noite de registro, foram consideradas as noites com maior IDO apresentado para as análises. Acerca dos participantes 62,5% são do sexo masculino e 47,5% do sexo feminino. Relacionado às medidas antropométricas o IMC apresentou média de $27,18 \pm 4,55$ Kg/m², Observou-se que 54 % dos voluntários apresentavam IMC acima de 25 kg/m², condição que pode contribuir para maior risco anestésico. Isso se deve ao acúmulo de tecido adiposo em regiões da orofaringe, especialmente na base da língua, o que dificulta a manutenção e o manejo das vias aéreas. A obesidade está associada a depósitos excessivos de tecido adiposo nas faringe e hipofaringe, resultando no estreitamento das vias aéreas superiores e dificultando a laringoscopia e a intubação (AL-SHAHID et al., 2022). Além disso, pacientes obesos apresentam maior volume lingual, o que compromete a exposição adequada durante a laringoscopia convencional (SEYNI-BOUREIMA et al., 2022). Como resultados dos questionários, Dos 24 voluntários avaliados, 10 (41,7%) relataram ronco alto e frequente, sendo este o sintoma mais prevalente. Outros sintomas com frequência relevante foram: sono não reparador, referido por 9 participantes (37,5%); dificuldade para manter o

sono, por 6 voluntários (25%); dificuldade de concentração com 8 voluntários, representando (33,33%) da amostra, e perda de memória, com 5 voluntários (20,8%). Além disso, 5 participantes (20,8%) afirmaram não apresentar nenhum sintoma. Sintomas adicionais, embora menos frequentes, incluíram: sonolência ou cansaço diurno em 5 casos (20,8%); sonolência excessiva diurna em 4 casos (16,67%); diminuição da libido ou disfunção erétil em 3 casos (12,5%); despertares frequentes, com 3 voluntários (12,5%), 2 voluntários (8,33%) relataram ter sono agitado e 1 (4,17%) relatou ter despertares com engasgos noturnos e cefaleia matinal (Figura 10). No que se refere à associação de sintomas, verificou-se que 9 participantes (37,5%) relataram apenas um único sintoma, enquanto 6 (25%) apresentaram dois sintomas simultâneos. Ademais, 4 voluntários (16,7%) referiram três sintomas e 5 participantes (20,8%) relataram quatro ou mais sintomas concomitantes, evidenciando uma parcela da amostra com importante sobreposição de queixas relacionadas ao sono e suas repercussões. Quanto as condições na noite do exame, 20,8% realizaram o exame com congestão nasal, 4,1% com uso de sedativos, 4,1 com uso de cafeína após às 15 h e 70,8 sem condições específicas. Em relação á doenças associadas, 66,6% não relataram nenhuma doença, 5 voluntários (20,8%) Possuem Hipertensão arterial sistêmica, dos quais 2 possuem associação com outras doenças, 1 diabético e dislipidêmico e outro apresentando também Refluxo gastroesofágico (DRGE), 4,1 relatou ter depressão e 4,1 apenas DRGE. Em relação ao Índice de saturação de oxigênio (SpO₂, observou-se média de $95,91\% \pm 1,93$ entre os valores médios, o Valor mínimo coletado foi 78%, enquanto o máximo 100%. Em relação ao tempo de permanência com SpO₂ < 90% (min) tivemos 54,1% dos voluntários com tempo maior que 0, sendo o maior permanecendo 38,1 min nesse estado, 46,9% não tiveram quedas da saturação a baixo de 90%. Em relação ao número de dessaturações, observou-se média de $77,16\% \pm 97,6$, o Valor mínimo coletado foi 4 dessaturações, enquanto o máximo foram 321 dessaturações. Já O Índice de Dessaturação de Oxigênio (IDO), que representa o número de episódios de queda da saturação periférica de oxigênio durante o sono, é um marcador importante do impacto da apneia sobre a oxigenação. Trata-se de uma medida clinicamente relevante, pois reflete a gravidade da hipóxia intermitente, condição associada a maior risco cardiovascular. No presente estudo, o IDO apresentou média de $11,4 \pm 14,4$ eventos/hora. Em relação á classificação, 50% dos voluntários apresentaram valores normais (<5 eventos/hora), 29,1% leve (5–14,9 eventos/hora), 4,1% moderado (15–29,9 eventos/hora) e 16,7% grave (≥ 30 eventos/hora). A carga hipóxica, definida como o tempo acumulado ponderado em que a saturação de oxigênio permanece abaixo de um limiar crítico, é considerada um marcador robusto da intensidade e duração da hipóxia intermitente durante o sono. Clinicamente, valores mais elevados estão associados a maior estresse oxidativo, inflamação sistêmica e risco cardiovascular aumentado, mesmo em pacientes com Índice Apneia-Hipopneia (IAH) relativamente baixo. No presente estudo, a carga hipóxica apresentou média de $38,1 \pm 40,4$ %·min/hora, com valores variando de 2,1 a 141,3 %·min/hora. Esses achados evidenciam grande heterogeneidade entre os voluntários avaliados, resultados possivelmente relacionado à idade, estilo de vida e morbididades, sugerindo que alguns voluntários apresentam carga hipóxica clinicamente significativa, compatível com maior vulnerabilidade a desfechos cardiovasculares. A frequência cardíaca mínima apresentou média de $45,3 \pm 5,6$ bpm (mínimo: 36; máximo: 58), enquanto a frequência cardíaca média foi de $61,2 \pm 8,1$ bpm (mínimo: 48; máximo: 83) e a frequência cardíaca máxima alcançou $109,0 \pm 11,9$ bpm (mínimo: 91; máximo: 138). O tempo total de sono foi em média de $339,6 \pm 65,7$ minutos (mínimo: 229; máximo: 484,5). O tempo para iniciar o sono apresentou média de $27,1 \pm 15,1$ minutos (mínimo: 5,5; máximo: 60). Já o tempo acordado após o início do sono foi de $52,4 \pm 36,6$ minutos (mínimo: 2; máximo: 153,5). A eficiência do sono foi em média de $80,3 \pm 8,9\%$ (mínimo: 54; máximo: 97), enquanto o tempo total de gravação apresentou média de $421,8 \pm$

70,9 minutos (mínimo: 272; máximo: 543). O tempo com ronco variou de 0 a 259 minutos, com média de $50,9 \pm 76,5$ minutos, evidenciando grande variabilidade entre os indivíduos. Por fim, o índice de massa corporal (IMC) médio foi de $27,1 \pm 4,6$ kg/m² (mínimo: 20; máximo: 39), com predominância de valores na faixa de sobrepeso. A análise e cruzamento dos dados (Figura 8 e 9) obtidos por meio da plataforma Biologix revelou padrões consistentes que reforçam a relação entre apneia obstrutiva do sono (AOS), hipóxia intermitente e risco cardiovascular. Observou-se inicialmente uma correlação positiva moderada entre a eficiência do sono (%) e o tempo total de sono (min) ($r = 0,47$; $p < 0,05$) (Figura 1), indicando que indivíduos com maior eficiência tendem a apresentar maior tempo de sono efetivo. Esse achado demonstra que a manutenção de uma boa eficiência do sono está diretamente relacionada à preservação da arquitetura normal do repouso, favorecendo a restauração fisiológica e o equilíbrio cardiovascular (FRANGOPOULOS et al., 2020), sendo forte indicativo da relação entre insônia e cansaço diurno. No que diz respeito ao Índice de Dessaturação de Oxigênio (IDO), verificou-se forte correlação positiva com o número de dessaturações (Nº DO) ($r = 0,97$; $p < 0,05$) e com a carga hipóxica ($r = 0,95$; $p < 0,05$) (Figura 6). Isso confirma que o IDO é um marcador robusto da gravidade da hipóxia intermitente, refletindo não apenas a frequência dos eventos respiratórios, mas também a intensidade com que impactam a oxigenação (HEIN et al., 2024). Por outro lado, a forte correlação negativa do IDO com a SpO₂ mínima ($r = -0,84$; $p < 0,05$) e a SpO₂ média ($r = -0,84$; $p < 0,05$) evidencia que quanto mais profundas as quedas da saturação, maior a gravidade do quadro, trazendo mais riscos cardiovasculares decorrentes do tempo de hipoxemia. (HEIN et al., 2024; FRANGOPOULOS et al., 2020). A carga hipóxica, definida como a soma do tempo e da intensidade das quedas de saturação, também apresentou associação expressiva com diferentes parâmetros. Houve correlação negativa com SpO₂ mínima ($r = -0,82$; $p < 0,05$) e média ($r = -0,87$; $p < 0,05$), além de forte correlação positiva com o tempo de SpO₂ < 90% ($r = 0,81$; $p < 0,05$) (Figura 7) e SpO₂ < 80% ($r = 0,81$; $p < 0,05$). Esses dados demonstram que a carga hipóxica integra tanto a profundidade quanto a duração da dessaturação, traduzindo de maneira mais fiel o estresse hipóxico imposto ao organismo (Li et al., 2022). Essa condição favorece processos de inflamação crônica, disfunção endotelial e ativação simpática, todos amplamente reconhecidos como determinantes do risco cardiovascular aumentado na AOS (TURNBULL et al., 2017; SILVA; SANTOS; MELO, 2024). A idade surgiu como variável relevante, apresentando correlação positiva com carga hipóxica ($r = 0,76$; $p < 0,05$) (Figura 4), IDO ($r = 0,71$; $p < 0,05$), Nº DO ($r = 0,67$; $p < 0,05$) (Figura 3) e SpO₂ < 90% ($r = 0,69$; $p < 0,05$) (Figura 2). Isso sugere que o envelhecimento está associado a maior vulnerabilidade à hipóxia intermitente, possivelmente em função da redução progressiva da complacência das vias aéreas superiores, da perda de reflexos protetores e da menor eficiência dos mecanismos compensatórios cardiovasculares e respiratórios (SILVA; SANTOS; MELO, 2024). Outro aspecto relevante foi a associação entre idade e fragmentação do sono. O tempo acordado após o início do sono apresentou forte correlação com a idade ($r = 0,90$; $p < 0,05$), assim como o tempo para adormecer ($r = 0,55$; $p < 0,05$) (Figura 5). Esse achado reforça que indivíduos mais velhos tendem a apresentar sono mais fragmentado e de menor qualidade, o que pode potencializar os efeitos deletérios da hipóxia intermitente sobre o sistema cardiovascular (TURNBULL et al., 2017). O tempo com ronco também se mostrou associado, ainda que de forma mais discreta, ao número de dessaturações ($r = 0,31$; $p < 0,05$) e ao IDO ($r = 0,36$; $p < 0,05$). Embora o ronco seja muitas vezes considerado apenas um sintoma benigno, essa correlação indica que pode refletir instabilidade respiratória significativa e, em alguns casos, contribuir como marcador indireto da gravidade do distúrbio (FRANGOPOULOS et al., 2020). Em síntese, a realização da triagem diagnóstica da Apneia Obstrutiva do Sono (AOS) por meio da

polissonografia tipo IV permitiu identificar um conjunto expressivo de sintomas e correlações fisiopatológicas relevantes na amostra estudada. Observou-se que o ronco alto e frequente constituiu o sintoma mais prevalente (41,7%), seguido de sono não reparador (29,2%), além de manifestações como dificuldade de concentração, perda de memória e insônia. Importante destacar que 20,8% dos voluntários apresentaram múltiplas queixas concomitantes, revelando o impacto abrangente da AOS sobre diferentes esferas da vida cotidiana. No tocante à conectividade entre dessaturação noturna e risco cardiovascular, os resultados foram consistentes. O Índice de Dessaturação de Oxigênio (IDO) demonstrou forte associação com a carga hipóxica, traduzindo de maneira robusta tanto a frequência quanto a profundidade dos eventos de hipóxia intermitente. Ademais, a correlação negativa do IDO com a SpO₂ mínima e média confirmou que quedas mais profundas da saturação elevam substancialmente o risco cardiovascular, em consonância com a literatura recente (HEIN et al., 2024; TURNBULL et al., 2017). Em relação aos aspectos psicofisiológicos, a análise evidenciou que maior eficiência do sono correlacionou-se positivamente com tempo total de sono efetivo, enquanto a fragmentação e a dificuldade de adormecer foram mais pronunciadas em indivíduos de maior idade. Por fim, observou-se que o IMC apresentou correlação levemente negativa com tempo total de sono ($r = -0,26$; $p < 0,05$) e tempo de gravação ($r = -0,28$; $p < 0,05$), sugerindo que o excesso de peso pode estar associado a menor duração do sono e pior regulação da arquitetura noturna, em consonância com o papel conhecido da obesidade na fisiopatologia da AOS (TURNBULL et al., 2017).

Conclusão

Esses achados sustentam a inter-relação entre AOS, insônia, sonolência diurna e sintomas de estresse, ansiedade e depressão, reforçando o caráter multifatorial do distúrbio. Outro ponto relevante foi a demonstração do potencial da telemedicina, por meio da plataforma Biologix, na coleta, análise e interpretação dos dados. Os resultados animadores obtidos reforçam a viabilidade da expansão da telemedicina do sono como estratégia diagnóstica em redes públicas de saúde, ampliando o acesso, reduzindo custos e possibilitando diagnósticos mais precoces em populações vulneráveis. Do ponto de vista acadêmico e formativo, o estudo contribuiu para a integração de conhecimentos técnico-científicos aplicados à prática clínica, ampliando a competência dos futuros profissionais de saúde no enfrentamento das repercussões cardiovasculares e psicossociais da AOS no estado do Rio Grande do Norte. Apesar dos avanços, algumas limitações devem ser reconhecidas. O tamanho reduzido da amostra ($n=24$) restringe a generalização dos achados para populações maiores. Além disso, a utilização de polissonografia tipo IV, embora prática e acessível, não permite a análise detalhada da arquitetura do sono, o que poderia enriquecer a correlação com distúrbios como insônia e fragmentação. Também se destaca a possibilidade de viés de autorrelato quanto a sintomas e doenças associadas, visto que parte das informações foi obtida por meio de questionários. Para continuidade do desenvolvimento mostrado na pesquisa, deve-se ampliar a amostra estudada para consolidar as associações encontradas; implementar protocolos de acompanhamento longitudinal para avaliar desfechos cardiovasculares e neuropsicológicos em pacientes diagnosticados; fortalecer parcerias com serviços públicos de saúde para consolidar a telemedicina do sono como ferramenta rotineira de triagem; e promover capacitações interdisciplinares que preparem profissionais para o diagnóstico precoce e manejo integral da AOS. Assim, os achados reforçam a importância de estratégias diagnósticas acessíveis e integradas, capazes de reduzir o subdiagnóstico da AOS e mitigar suas repercussões clínicas e sociais. Os resultados aqui apresentados apontam para um

cenário promissor e animador, tanto para a prática clínica quanto para a saúde pública, indicando que a combinação entre diagnóstico simplificado e telemedicina pode transformar a abordagem da AOS no futuro próximo.

Referências

- LI, Q. et al. Independent association between oxygen desaturation index and cardiovascular outcomes. *Nature and Science of Sleep*, v. 14, p. 1723–1733, 2022. DOI: 10.2147/NSS.S379394.
- FRANGOPOULOS, F. et al. Association between respiratory sleep indices and cardiovascular disease in sleep apnea—A community-based study in Cyprus. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 8, p. 2475, 2020. DOI: 10.3390/jcm9082475.
- HEIN, M. et al. Impact of intermittent hypoxia related to obstructive sleep apnoea syndrome on low-grade inflammation in hypertensive patients: potential implications for cardiovascular risk. *Life*, v. 14, n. 5, p. 592, 2024. DOI: 10.3390/life14050592.
- TURNBULL, C. D. Intermittent hypoxia, cardiovascular disease and obstructive sleep apnea. *Journal of Thoracic Disease*, v. 9, n. 12, p. 4223–4236, 2017. DOI: 10.21037/jtd.2017.10.33.
- SILVA, A. R.; SANTOS, P. H.; MELO, J. P. Apneia obstrutiva do sono como fator de risco cardiovascular: revisão integrativa. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 10, n. 5, p. 275-291, 2024. DOI: 10.51891/rease.v10i5.18618.
- AL-SHAHID, A. M.; et al. Airway challenges in a patient with morbid obesity. *Journal of Anesthesia and Perioperative Medicine*, 2022. Disponível em: PMC. Acesso em: 26 ago. 2025.
- SEYNI-BOUREIMA, R.; ZHANG, Z.; ANTOINE, M. M. L. K.; ANTOINE-FRANK, C. D. A review on the anesthetic management of obese patients undergoing surgery. *BMC Anesthesiology*, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2022. DOI: 10.1186/s12871-022-01579-8.
1. AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Versão 2.5, 2018. 1. Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, Penzel T, Pépin JL, Peppard PE, Sinha S, Tufik S, Valentine K, Malhotra A. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med*. 2019 Aug;7(8):687-698.
2. Bertolazi AN, Fagundes SC, Hoff LS, Dartora EG, Miozzo IC, de Barba ME, Barreto SS. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. *Sleep Med*. 2011 Jan;12(1):70-5.
2. BERTOLAZI, A. N. et al. Validation of the Pittsburgh Sleep Quality Index in the Brazilian Portuguese language. *Sleep*, v. 3, n. 3, p. 347-352, 2008.
3. Botega NJ, Bio MR, Zomignani MA, Garcia Jr C, Pereira WAB. Transtornos do humor em enfermagem de clínica médica e validação de escala de medida (HAD) de ansiedade e depressão. *Revista de Saúde Pública*, v. 29, n. 5, p. 355-63. 1995.
4. Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. *Journal of health and social behavior*, v. 24, p. 385- 396, 1983.
5. Di Fusco SA, Pignalberi C, Santini L, Colivicchi F, Santini M. Arrhythmias and sleep apnea: physiopathologic link and clinical implications. *J Interv Card Electrophysiol*. 2020 Apr;57(3):387-397.
6. Iber C, Ancoli-israel S, Chesson A, Quan SF. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2007.
3. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991 Dec;14(6):540-5.
7. Johnson KG, Sullivan SS, Nti A, Rastegar V, Gurubhagavatula I. The impact of the COVID-19 pandemic on sleep medicine practices. *J Clin Sleep Med*. 2021 Jan 1;17(1):79-87.
8. Kim SW, Kim HH, Kim KY, Lee SH, Kang HH. Impacts of the COVID-19 pandemic on sleep center operations and sleep apnea treatment in Korea: A multicenter survey. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Dec 23;100(51):e28461.
9. Naismith sl, Duffy SL, Cross N, Grunstein R, Terpening A, Hoyos C, D'rozario A et al.

Nocturnal Hypoxemia Is Associated with Altered Parahippocampal Functional Brain Connectivity in Older Adults at Risk for Dementia. *J Alzheimers*, vol. Pre-press, pp. 1-14, 2019. 10. Sharma RA, Varga AW, Bubu OM, Pirraglia E, Kam K, Parekh A, et al. Obstructive sleep apnea severity affects amyloid burden in cognitively normal elderly. A longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med* 197, 83, 1933-943, 2018. 11. Silveira, F., Duarte, R., 2010. Ronco: Critérios Diagnósticos e tratamentos, *J BrasPneumol*, 32 (2), pp 17-18. 12. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events Summary of Updates in Version 2.6 January 10, 2020. <https://aasm.org/clinical-resources/scoring-manual/> Acesso em: 25 de setembro de 2022. 13. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Síndrome da apnéia obstrutiva do sono no Estudo Epidemiológico do Sono de São Paulo . *Sono Med* . 2010. 14. Tull MT, Edmonds KA, Scamaldo KM, Richmond JR, Rose JP, Gratz KL. Psychological Outcomes Associated with Stay-at-Home Orders and the Perceived Impact of COVID-19 on Daily Life. *Psychiatry Res*. 2020 Jul;289:113098. 15. Wang H, He L, Gao Y, Gao X, Lei X. Effects of physical activity and sleep quality on well-being: A wrist actigraphy study during the pandemic. *Appl Psychol Health Well Being*. 2021 May;13(2):394-405. 16. Yaffe, K, Laffan AM, Harrison SL, Redline S, Spira AP, Ensrud KE, Stone KL. Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *JAMA* 306 (6), 613–619, 2011. 17. Zuurbier LA, Vernooij MW, Lui AI, Kocavska D, Hofman A, Whitmore H, et al. Apnea-hypopnea index, nocturnal arousals, oxygen desaturation and structural brain changes: A population- based study. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* 1, 1-7, 2016.

Anexos

- Figura 1. Correlação entre Tempo de sono e Eficiência do sono. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,47$; $p < 0,05$).
- Figura 2. Correlação entre [Idade] e [$SpO_2 < 90\%$]. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,69$; $p < 0,05$).
- Figura 3. Correlação entre [Idade] e [Número de Dessaturações de oxigênio]. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,67$; $p < 0,05$).
- Figura 4. Correlação entre [IDADE] e [Carga Hipóxica]. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,76$; $p < 0,05$).

- Figura 5. Correlação entre [Idade] e [Tempo para Dormir]. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,55$; $p < 0,05$).
- Figura 6. Correlação entre [IDO] e [Carga Hipóxica]. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,95$; $p < 0,05$).
- Figura 7. Correlação entre [Carga Hipóxica] e [$SpO_2 < 90\%$]. Observa-se tendência positiva entre as variáveis ($r = 0,81$; $p < 0,05$).

Figura 8. Correlação entre dados .

Figura 9. Correlação Entre os Dados.

Figura 10, Distribuição do número de voluntários e sintomas .

CÓDIGO: SB1284

AUTOR: WENDELL MARINHO BEZERRA

COAUTOR: LAURO JEFERSON TARGINO DA SILVA

ORIENTADOR: AURIGENA ANTUNES DE ARAUJO

TÍTULO: Modelos experimentais em animais para avaliação antinociceptiva da formulação de capsaicina

Resumo

Este estudo avaliou a eficácia analgésica de um nanoemulgel de capsaicina (FLC) em comparação com a formulação comercial Moment® em modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina em ratos. Utilizou-se o teste de Hot Plate em temperaturas variadas (47°C, 51°C, 55°C) para análise termo-dependente. Os resultados demonstraram que o nanoemulgel FLC superou significativamente o Moment®, especialmente a 47°C, com aumento $\geq 50\%$ na latência da resposta nociceptiva. A superioridade da FLC é atribuída à sua nanoestrutura, que proporciona maior penetração cutânea, liberação sustentada e dessensibilização eficaz de fibras C via receptor TRPV1. Conclui-se que a nanoformulação é uma alternativa promissora para dor neuropática, embora estudos futuros (como Tail Flick) sejam necessários para complementar os achados.

Palavras-chave: Nanoemulgel; Capsaicina; Dor Neuropática; Analgesia; Teste Hot Plate.

TITLE: EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS FOR ANTINOCICEPTIVE EVALUATION OF CAPSAICIN FORMULATION

Abstract

This study evaluated the analgesic efficacy of a capsaicin nanoemulgel (FLC) compared to the commercial formulation Moment® in a streptozotocin-induced diabetic neuropathy rat model. The Hot Plate test at varied temperatures (47°C, 51°C, 55°C) was used for thermo-dependent analysis. Results showed that the FLC nanoemulgel significantly outperformed Moment®, especially at 47°C, with a $\geq 50\%$ increase in nociceptive response latency. FLC's superiority is attributed to its nanostructure, which provides enhanced skin penetration, sustained release, and effective C-fiber desensitization via TRPV1 receptors. The nanoformulation is a promising alternative for neuropathic pain, though future studies (Tail Flick) are required to complement these findings.

Keywords: Nanoemulgel; Capsaicin; Neuropathic Pain; Analgesia; Hot Plate Test.

Introdução

A dor é um fenômeno complexo e multifatorial que representa um dos principais motivos de busca por assistência médica em todo o mundo, estando associada a significativa redução da qualidade de vida e impacto socioeconômico relevante. Entre os diferentes quadros algícos,

destacam-se as condições inflamatórias e neuropáticas, que frequentemente apresentam difícil controle com os tratamentos convencionais disponíveis. Nesse contexto, a busca por alternativas terapêuticas inovadoras e eficazes, especialmente aquelas que associam estratégias farmacológicas já conhecidas a novos sistemas de liberação, tem se tornado uma área de grande interesse científico e clínico (Hecke, 2014; Crasta, et al. 2025).

A capsaicina, um alcaloide pungente extraído de espécies do gênero *Capsicum*, tem sido amplamente estudada por seu potencial analgésico e anti-inflamatório, mediado principalmente pela ativação do receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1). A exposição repetida desse receptor leva à dessensibilização neuronal, resultando em diminuição da transmissão de sinais dolorosos. Apesar de sua eficácia comprovada em diferentes condições, a aplicação tópica de capsaicina em formulações convencionais, como pomadas ou cremes, é frequentemente limitada pela baixa solubilidade em meio aquoso, instabilidade química e, sobretudo, pela sensação de ardência intensa que compromete a adesão do paciente ao tratamento (Chan et al., 2021; Shrivastava et al., 2011).

A lidocaína, por sua vez, é um anestésico local amplamente utilizado na prática clínica, atuando por meio do bloqueio reversível dos canais de sódio dependentes de voltagem, reduzindo a excitabilidade neuronal e promovendo analgesia de início rápido. Sua associação com a capsaicina é promissora, pois pode atenuar a sensação inicial de ardência provocada pela ativação do TRPV1, além de potencializar o efeito analgésico global (Bezerra, et al. 2020; Karnina et al., 2021).

No entanto, para que esses fármacos alcancem maior eficácia clínica, torna-se necessária a utilização de sistemas de liberação que melhorem a biodisponibilidade cutânea, promovam estabilidade e controlem a liberação dos ativos. Nesse sentido, os sistemas nanotecnológicos, como as nanoemulsões e nanoemulgéis, têm se destacado. Esses sistemas apresentam vantagens como elevada estabilidade físico-química, aumento da penetração cutânea, possibilidade de liberação controlada e redução de efeitos adversos locais. A incorporação de capsaicina e lidocaína em um nanoemulgel surge, portanto, como uma estratégia inovadora para potencializar os efeitos terapêuticos desses fármacos, garantindo maior segurança e eficácia clínica (Kim, et al. 2014; Mushtaq, et al. 2023).

Estudos pré-clínicos utilizando modelos animais de dor são ferramentas fundamentais para avaliar o potencial analgésico e anti-inflamatório de novas formulações. Testes comportamentais, como hot plate e tail flick, permitem mensurar de forma confiável a resposta nociceptiva frente a estímulos térmicos, sendo amplamente empregados na triagem farmacológica de agentes com ação sobre o sistema nervoso central e periférico. Além disso, a aplicação desses modelos em condições específicas, como em ratos com diabetes tipo I, permite avaliar a eficácia do tratamento em cenários clínicos de dor neuropática, nos quais há carência de terapias eficazes (Casaril, 2024; Bishnoi, 2011).

Diante desse panorama, faz-se necessário desenvolver uma avaliação acerca da atividade analgésica e anti-inflamatória em ratos previamente tratados com um nanoemulgel de capsaicina associada à lidocaína em modelos experimentais de dor.

Metodologia

2.1 ANIMAIS

Serão utilizados 102 ratos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia da UFRN. Os animais serão alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões de 16 cm (altura) × 34 cm (largura) × 40 cm (profundidade), mantendo-se no máximo 5 animais por gaiola. As condições ambientais serão controladas com temperatura mantida em $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar entre 40-60%, e ciclo claro/escuro de 12 horas (luz das 6h às 18h). Todos os animais receberão água purificada e ração comercial específica para roedores ad libitum. A limpeza das gaiolas será realizada três vezes por semana, com troca completa do material de cama (maravalha). A eutanásia será realizada mediante administração intraperitoneal de solução contendo cetamina 10% (240 mg/kg) e xilazina 2% (30 mg/kg), seguindo os protocolos estabelecidos pelo CEUA/UFRN.

2.2 TESTES EXPERIMENTAIS

2.2.1 Hot Plate Test em Animais Saudáveis

Serão utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 200-250g. O experimento visa avaliar o efeito analgésico através de modelo de dor aguda termicamente induzida, medindo respostas medulares e supraespinhais. Os animais serão distribuídos em três grupos experimentais ($n=12$ por grupo): Grupo Controle Negativo (Formulação branca), Grupo Controle Positivo (Moment® 0,075%) e Grupo Experimental (formulação teste). O protocolo de pré-tratamento consistirá na aplicação tópica, durante duas semanas consecutivas (3 vezes ao dia), com swab estéril esfregado na região plantar das patas anteriores e posteriores por 5 segundos por aplicação. O teste seguirá metodologia adaptada de Jamwal et al. (2017), onde cada animal será posicionado individualmente sobre a superfície aquecida do equipamento Hot Plate (Ugo Basile), previamente regulado para as temperaturas de teste: 47°C , 51°C e 55°C . O tempo de latência para a resposta nociceptiva (lamber as patas ou saltar) será cronometrado manualmente por observador treinado. Para evitar danos teciduais, serão estabelecidos tempos de corte de 120 segundos (47°C), 40 segundos (51°C) e 20 segundos (55°C). Entre os testes nas diferentes temperaturas, será respeitado intervalo de recuperação de 5 minutos. As avaliações serão realizadas nos momentos pré-tratamento (baseline) e pós-tratamento.

2.2.2 Tail Flick Test em Animais Saudáveis

Para este experimento serão utilizados 30 ratos machos Wistar com peso entre 200-250g. O objetivo é avaliar a analgesia através de modelo de dor aguda com resposta predominantemente medular. Os grupos experimentais ($n=10$ por grupo) serão: Grupo Controle Negativo (Formulação branca), Grupo Controle Positivo (Moment® 0,075%) e Grupo Experimental (formulação teste). O pré-tratamento consistirá na aplicação tópica, por duas semanas (3 vezes ao dia), com swab estéril esfregado na face ventral da porção distal da cauda por 5 segundos. O teste seguirá protocolo descrito por Jamwal et al. (2017) utilizando analgesímetro de cauda (Insight Equipamentos). O equipamento será ligado 30 minutos antes dos testes para estabilização térmica. Cada animal será contido suavemente e a região ventral do terço distal da cauda será posicionada sobre o filamento térmico. Será aplicada rampa de calor com incremento de 1°C por segundo a partir da temperatura basal. A latência para o movimento reflexo de retirada da cauda será registrada automaticamente pelo sistema. O tempo de corte estabelecido será de 60 segundos para prevenir lesões teciduais. As avaliações ocorrerão nos momentos pré e pós-tratamento.

2.2.3 Hot Plate Test em Animais Diabéticos

Serão utilizados 36 ratos machos Wistar (200-250g) com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ). Considerando perda amostral esperada de 20%, trabalhar-se-á com

n=30 animais. A indução do diabetes será realizada após jejum noturno de 10-12 horas, com administração intraperitoneal de STZ (60 mg/kg) dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5. A solução será preparada imediatamente antes do uso e protegida da luz. Sete dias pós-injeção, a glicemia será dosada através de amostras de sangue coletadas da ponta da cauda, utilizando glicosímetro portátil. Animais com glicemia ≥ 300 mg/dL serão considerados diabéticos. Os que não desenvolverem hiperglicemia poderão receber segunda dose de STZ (45 mg/kg) após uma semana. Os animais diabéticos serão mantidos em condições especiais: alojados em pares, com troca diária de cama devido à poliúria, monitoramento diário do estado geral e pesagem semanal. Após 4 semanas de diabetes confirmada, os animais com neuropatia estabelecida serão distribuídos nos grupos: Controle Negativo (Formulação branca), Controle Positivo (Moment® 0,075%) e Experimental (n=10/grupo). O pré-tratamento tópico será idêntico ao descrito no item 2.2.1, por duas semanas. O teste de Hot Plate seguirá os mesmos parâmetros do item 2.2.1, com avaliações nos tempos: pré-STZ (baseline sem diabetes), pré-tratamento (com diabetes estabelecida) e pós-tratamento.

2.2.4 Tail Flick Test em Animais Diabéticos

30 ratos machos Wistar diabéticos (indução por STZ conforme item 2.2.3) serão utilizados para este experimento. Os grupos experimentais (n=10 por grupo) serão: Controle Negativo (Formulação branca), Controle Positivo (Moment® 0,075%) e Experimental. O protocolo de pré-tratamento será idêntico ao descrito no item 2.2.2, com aplicação tópica na cauda por duas semanas. O teste de Tail Flick seguirá exatamente a metodologia descrita no item 2.2.2. As avaliações serão realizadas em três momentos distintos: pré-STZ (antes da indução do diabetes), pré-tratamento (após estabelecimento do diabetes) e pós-tratamento (após as duas semanas de aplicação tópica). Esta abordagem permitirá avaliar a evolução da neuropatia diabética e o efeito do tratamento experimental sobre a hiperalgesia térmica.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos no presente estudo, sumarizados nas Tabelas 1 e 2, demonstram de forma robusta os efeitos diferenciados dos tratamentos testados no modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, avaliados por meio do teste de Hot Plate em diferentes temperaturas (47 °C, 51 °C e 55 °C). A análise dos tempos de latência para a resposta nociceptiva revelou perfis de ação distintos entre a formulação comercial (Moment®) e a formulação nanoemulgel (FLC) contendo capsaicina, fornecendo dados valiosos sobre seus mecanismos de ação e eficácia termo-dependente.

Inicialmente, os animais do grupo controle negativo (CN) exibiram variações discretas ou mesmo reduções nos tempos de latência ao longo do experimento, corroborando a estabilidade do modelo de hiperalgesia térmica e a ausência de efeito analgésico inespecífico. Este resultado era esperado, uma vez que esse grupo não recebeu nenhum tratamento farmacológico ativo, servindo como parâmetro para confirmar a integridade do modelo experimental de dor neuropática (MULDER; PRITCHETT, 2004; Jamwal et al., 2017).

Por outro lado, o grupo tratado com a formulação comercial Moment® exibiu um aumento relevante, porém modesto, no tempo de latência em todas as temperaturas testadas. Embora este aumento tenha sido estatisticamente significativo em comparação ao grupo CN, especialmente nas temperaturas mais elevadas (51 °C e 55 °C). Este perfil de ação sugere que a formulação comercial possui uma eficácia analgésica generalizada, porém com limitações em termos de potência. A ação da capsaicina no Moment® provavelmente ocorre por sua

conhecida capacidade de ativar e subsequentemente dessensibilizar o receptor TRPV1 (Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1) em fibras aferentes primárias, reduzindo a liberação de neuropeptídeos pró-nociceptivos. No entanto, a relativa moderada eficácia pode estar relacionada a limitações inerentes à sua formulação convencional, como baixa penetração cutânea ou instabilidade do princípio ativo, o que restringe sua biodisponibilidade no sítio de ação (Chan et al., 2021; Shrivastava et al., 2011).

Em contraste, a FLC demonstrou um perfil farmacológico notavelmente superior e termo-dependente. Os dados da Tabela 1 mostram que este grupo exibiu os maiores aumentos percentuais no tempo de latência, com vários indivíduos ultrapassando consistentemente o critério de eficácia estabelecido de $\geq 50\%$ de incremento. Este efeito foi particularmente pronunciado na temperatura de 47 °C, na qual a FLC não apenas se mostrou significativamente superior ao grupo CN, mas também ao grupo tratado com Moment®. Este resultado indica uma potente ação antinociceptiva em faixas térmicas específicas, possivelmente relacionada a um mecanismo de ação mais eficiente e direcionado. A tecnologia do nanoemulgel, caracterizada por gotículas na escala nanométrica, confere à formulação uma maior área superficial e capacidade de penetração através do estrato córneo, permitindo uma liberação sustentada e um direcionamento mais eficaz da capsaicina para os terminais nervosos cutâneos onde o receptor TRPV1 é expresso. Essa otimização na entrega do fármaco parece resultar em uma dessensibilização mais profunda e duradoura das fibras C nociceptivas (Hecke, 2014; Crasta, et al. 2025).

A análise estatística comparativa, apresentada na Tabela 2, confirma e detalha essas observações. Os resultados indicam que a FLC promoveu uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CN principalmente na temperatura de 47 °C, destacando seu efeito mais potente em uma faixa térmica mais próxima da fisiológica. Já o Moment® demonstrou significância em temperaturas mais altas (51 °C e 55 °C), que representam estímulos nociceptivos de maior intensidade. Este contraste é de grande relevância farmacológica, pois sugere que a nanoformulação é capaz de modular a resposta dolorosa em estímulos de menor intensidade, os quais são frequentemente os mais debilitantes em condições de dor neuropática crônica. Além disso, a FLC também demonstrou uma ação moduladora da dor estatisticamente superior ao Moment® em 47 °C, validando a hipótese de que a nanoestruturação melhora o desempenho terapêutico da capsaicina.

Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstram, de forma robusta, a superioridade da formulação de nanoemulgel de capsaicina (FLC) sobre a formulação comercial (Moment®) no manejo da hiperalgesia térmica em um modelo animal de neuropatia diabética. O perfil farmacológico distinto e termo-dependente observado, com a FLC exibindo uma potente ação antinociceptiva, particularmente significativa em temperaturas mais baixas (47 °C), evidencia que a nanoestruturação confere vantagens críticas à formulação. Estas vantagens incluem uma maior penetração cutânea, liberação sustentada do princípio ativo e um direcionamento mais eficaz aos receptores TRPV1, resultando em uma dessensibilização mais profunda e duradoura das fibras nociceptivas.

A eficácia superior da FLC em estímulos de menor intensidade, frequentemente os mais debilitantes na dor neuropática crônica, posiciona esta nanoformulação como uma alternativa

terapêutica inovadora e promissora. A tecnologia do nanoemulgel mostrou-se capaz de superar as limitações de biodisponibilidade e potência das formulações tópicas convencionais, oferecendo um potencial caminho para melhorar a adesão ao tratamento e o controle da dor em condições neuropáticas.

Reconhece-se, contudo, que a completa caracterização do perfil analgésico desta formulação exigirá investigações adicionais. O modelo de Tail Flick, que avalia predominantemente vias medulares de modulação da dor, não foi finalizado até a presente data, constituindo uma limitação do estudo e uma direção clara para pesquisas futuras. A execução deste protocolo será fundamental para confirmar e ampliar os achados aqui reportados, permitindo uma avaliação mais abrangente do mecanismo de ação da formulação.

Portanto, este estudo não apenas valida o uso da nanotecnologia para otimizar a entrega tópica de capsaicina, mas também fornece uma base sólida para investigações translacionais futuras, visando a aplicação clínica desta formulação avançada no tratamento de síndromes dolorosas de difícil manejo.

Referências

- BEZERRA, Marco M. et al. A brief history behind the most used local anesthetics. *Tetrahedron*, [S.l.], v. 76, n. 47, p. 131628, 2020. DOI: 10.1016/j.tet.2020.131628. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040402020308358>.
- CHAN, T. C.; LEE, M.; HUANG, W.; CHANG, W.; KRUEGER, J. G.; TSAI, T. Capsaicin attenuates imiquimod-induced epidermal hyperplasia and cutaneous inflammation in a murine model of psoriasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 141, p. 111950, 2021. ISSN 0753-3322.
- CRASTA, Andrea; PAINGINKAR, Tanvi; AMATHA, S.; PAWAR, Sachin D.; MUDDUKRISHNA, B. S.; VASANTHARAJU, S. G.; OSMANI, Riyaz Ali M.; RAVI, Gundawar. Transdermal Drug Delivery System: A Comprehensive Review of Innovative Strategies, Applications, and Regulatory Perspectives. *OpenNano*, [S.l.], p. 100245, 29 abr. 2025.
- CASARIL, Angela M.; GAFFNEY, Caitlyn M.; SHEPHERD, Andrew J. Animal models of neuropathic pain. In: ROSNER, Jan; KARLSSON, Páll (ed.). *International Review of Neurobiology*. [S. l.]: Academic Press, 2024. v. 179, p. 339-401.
- BISHNOI, M.; BOSGRAAF, C. A.; ABOOJ, M.; ZHONG, L.; PREMKUMAR, L. S. Streptozotocin-Induced Early Thermal Hyperalgesia is Independent of Glycemic State of Rats: Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and Inflammatory Mediators. *Molecular Pain*, [S. l.], v. 7, p. 52, 2011.
- HECKE, V. O.; AUSTIN, S. K.; KHAN, R. A.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*, v. 155, n. 4, p. 654-662, abr. 2014. DOI: 10.1016/j.pain.2013.11.013.
- KARNINA, Resiana et al. Molecular mechanisms of lidocaine. *Annals of Medicine and Surgery*, [S.l.], v. 69, p. 102733, set. 2021. DOI: 10.1016/j.amsu.2021.102733. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S204908012100683X>.

Kim, J. H.; Ko, J. A.; Kim, J. T.; Cha, D. S.; Cho, J. H.; Park, H. J.; Shin, G. H. Preparation of a capsaicin-loaded nanoemulsion for improving skin penetration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 3, p. 725–732, 22 jan. 2014.

Shrivastava A, Saxena P. Stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography method for the estimation of capsaicin. *Pharm Methods*. 2011 Apr;2(2):135-42. doi: 10.4103/2229-4708.84451. PMID: 23781444; PMCID: PMC3658042.

MUSHTAQ, Abeeda; WANI, Sajad Mohd; MALIK, A. R.; GULL, Amir; RAMNIWAS, Seema; NAYIK, Gulzar Ahmad; ERCISLI, Sezai; MARC, Romina Alina; ULLAH, Riaz; BARI, Ahmed. Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chemistry: X*, [S.l.], v. 18, p. 100684, 30 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100684>.

Anexos

TABELAS EM ANEXO

TABELA 1 (1/2)

TABELA 1 (2/2)

CÓDIGO: SB1305

AUTOR: HELOISA CAMPOS DE AMORIM

ORIENTADOR: JUDNEY CLEY CAVALCANTE

TÍTULO: Morfometria e classificação do músculo palmar longo em população potiguar: um estudo cadavérico

Resumo

Localizado no compartimento anterior do antebraço, o músculo palmar longo auxilia os músculos flexores da região. É altamente variável, originando-se no tendão flexor comum do epicôndilo medial do úmero e inserindo-se na aponeurose palmar. Contudo, o MPL pode, em alguns casos, passar pelo retináculo dos flexores e nele se inserir, assim como no abdutor curto do polegar ou no flexor superficial dos dedos. Também pode apresentar variações, como músculos invertidos, com dois ventres ou bifurcações na inserção. O estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e envolveu dissecações de rotina em antebraços de corpos não reclamados ou doados para estudo. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para estudos em cadáver. Tem como objetivo determinar a incidência do músculo palmar longo, bem como sua morfometria e classificações dos tipos de músculo na população do estado do Nordeste brasileiro. Foram realizadas dissecação, análise, morfometria (comprimento, largura e espessura de ventre e tendão) com paquímetro digital e, por fim, as classificações dos tipos de músculo. Ao final, 59 membros participaram das medições e foi realizada a média das medições das variáveis morfométricas. Portanto, morfometria e classificação são altamente relevantes, tendo em vista que tais achados podem ser importantes para implicações clínicas e auxiliam na devida compreensão da musculatura do antebraço.

Palavras-chave: Anatomia. Dissecação. Variação anatômica. Antebraço. Cadáver.

TITLE: Morphometry and classification of the palmaris longus muscle in the population of Rio Grande do Norte: a cadaveric study

Abstract

Located in the anterior compartment of the forearm, the palmaris longus muscle assists the flexor muscles of the region. It is highly variable, originating from the common flexor tendon of the medial epicondyle of the humerus and inserting into the palmar aponeurosis. However, the PLM can, in some cases, pass through the flexor retinaculum and insert into it, as well as into the abductor pollicis brevis or the flexor digitorum superficialis. It may also present variations, such as reversed muscles, with two bellies or bifurcated insertions. The study was conducted at the Anatomy Laboratory of the Biosciences Center at the Federal University of Rio Grande do Norte and involved routine dissections of forearms from unclaimed bodies or those donated for study. The present study was approved by the Ethics Committee for studies on cadavers. Its objective is to determine the incidence of the palmaris longus muscle, as well as its morphometry and classification of muscle types in the population of the Northeastern

region of Brazil. Dissection, analysis, morphometry (length, width, and thickness of belly and tendon) were performed using a digital caliper and muscle type classifications were carried out. In the end, 59 limbs were included in the measurements and the average values of the morphometric variables were calculated. Therefore, morphometry and classification are highly relevant, considering that such findings have clinical implications and assist in the forearm musculature.

Keywords: Anatomy. Dissection. Anatomical variation. Forearm. Cadaver.

Introdução

O palmar longo é um músculo fusiforme que se situa no compartimento anterior do antebraço. Ele se origina do epicôndilo medial do úmero por meio do tendão flexor comum, uma faixa tendínea que serve como ponto de origem para os cinco flexores longos do antebraço: flexor radial do carpo, flexor ulnar do carpo, pronador redondo e flexores superficial e profundo dos dedos. O tendão dirige-se para a superfície palmar da mão, passando superficialmente ao retináculo dos flexores. Poucas fibras tendíneas se fundem com a superfície superior do retináculo, enquanto a maioria delas se amplia e continua distalmente para se inserir na aponeurose palmar. Todavia, é possível encontrar muitas variações em sua conformação estrutural, bem como a sua ausência, sem que haja relevante prejuízo funcional ou repercussões clínicas.

Metodologia

Foi realizada a dissecação de membros superiores de corpos não reclamados ou doados para estudo e pesquisa na Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Após a análise, foram feitas análise e medição do músculo palmar longo. A dissecação foi feita com materiais cirúrgicos rotineiros, como tesoura metzenbaum, pinças, cabo e lâmina de bisturi.

Posteriormente, foi analisada a presença ou não do músculo palmar longo. Após ser feita a dissecação e análise de presença ou ausência, foram realizadas 3 medições com paquímetro digital das seguintes especificações: comprimento de ventre, largura de ventre, espessura de ventre, comprimento de tendão, largura de tendão, espessura do tendão e comprimento completo do músculo. Essas medições foram colocadas em planilha Excel e depois houve a realização da média aritmética das 3 medições em cada parâmetro de medida.

Resultados e Discussões

De acordo com os critérios de inclusão para estudo, dos 110 braços analisados, 104 foram incluídos para análise no projeto, em que 51 eram direitos e 53 esquerdos. Posteriormente, ao ser analisada a presença ou ausência do músculo, foi constatado que, dos 104 braços, havia ausência do músculo em 13 membros, sendo 03 direitos e 10 esquerdos, representando 12,5% do total de membros superiores analisados. E, conseqüentemente, foi evidenciada a presença em 91 membros, sendo 48 direitos e 43 esquerdos, representando 87,5% dos membros totais. Após isso, ocorreram algumas intercorrências em relação às etiquetas dos membros e totalizou-se na tabela um n de 80 membros completamente analisados e medidos. Desses 80, foram retirados 15 das medições, por apresentarem ausência do músculo e, por fim, mais 6 membros superiores estavam deteriorados e incapazes de realizar medição. Ao final, 59 membros entraram para análise e média dos parâmetros. Entre eles, algumas variações foram

confirmadas e encontradas, mas as classificações ainda estão em análise com os professores responsáveis.

Conclusão

Portanto, foi comprovada a incidência do músculo palmar longo em 87,5% dos membros superiores dissecados e analisados no Laboratório de Anatomia, caracterizando a ausência apresentada de 12,5% como uma variação anatômica de proporção significativa. Foram reveladas variações anatômicas significativas do músculo palmar longo, incluindo um músculo acessório com características singulares. Tais achados podem ter implicações clínicas e auxiliam na devida compreensão da musculatura do antebraço.

Referências

- ZIELINSKA, N. et al. A very rare case of the accessory palmaris longus muscle and clinical significance. *Folia Morphologica*, 2023.
- LONGHURST, G.; STONE, D.; MAHONY, N. Bilateral reversed palmaris longus muscle: a case report and systematic literature review. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 2019.
- Olewnik, Ł. et al. Morphological variability of the palmaris longus muscle in human fetuses. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 2018.
- KOWALCZYK, A.; TOPUZOV, N. Three in one - unusual palmaris longus muscle anatomical variation. *Folia Morphologica*, 2024.
- Angelini Júnior LC, Angelini FB, Oliveira BC, Soares SA, Angelini LC, Cabral RH. Use of the tendon of the palmaris longus muscle in surgical procedures: study on cadavers. *Acta Ortop Bras*, 20(4): 226-229, 2012.
- Depuydt KH, Schuurman AH, Kon M. Reversed palmaris longus muscle causing effort-related median nerve compression. *J Hand Surg Br*, 23(1):117-9, 1998.
- Dimitriou I, Katsourakis A, Natsis K, Kostretzis L, Noussios G. Palmaris longus muscle's prevalence in different nations and interesting anatomical variations: review of the literature. *J Clin Med Res*, 7(11):825-830, 2015.
- Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly R. O membro superior. In *Anatomia. Estudo regional do corpo humano*. Guanabara Koogan, 4a Ed. 1988.
- Mathew AJ, Sukumaran TT, Joseph S. Versatile but temperamental: a morphological study of palmaris longus in the cadaver. *J Clin Diagn Res*, 9(2): AC01-AC03, 2015.
- Ninkovid M, Hefel L, Ohler K. Acute median nerve compression produced by reversed palmaris longus muscle. *Eur J Plast Surg*, 18:129-130, 1995.
- Olewnik L, Wysiadecki G, Polguj M, Podgórski M, Jezierski H, Topol M. Anatomical variations of the palmaris longus muscle including its relation to the median nerve – a proposal for a new classification. *BMC Musculoskel Dis*, 18:539, 2017.

Olewnik L, Wyśiadecki G, Polgaj M, Podgórski M, Łabętowicz P, Ruzik K, Topol M. Morphological variability of the palmaris longus muscle in human fetuses. *Surg Radiol Anat*, 40:1283–1291, 2018.

Sebastin SJ, Lim AYT, Bee WH, Wong TCM, Methil BV. Does the absence of the palmaris longus affect grip and pinch strength? *J Hand Surg*, 30B: 4: 406–408, 2005.

Yaminne K. Clinical prevalence of palmaris longus agenesis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Anat*, 26:709–718, 2013.

CÓDIGO: SB1309

AUTOR: THAYNARA LIMA DOS REIS

COAUTOR: MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA PACHECO

ORIENTADOR: GUILHERME ORTIGARA LONGO

TÍTULO: REFÚGIOS NO RECIFE: O PAPEL DOS MICROHABITATS NA
RESILIÊNCIA TÉRMICA DO CORAL *Siderastrea stellata*

Resumo

Os recifes de corais abrigam cerca de 25% da biodiversidade marinha. Todavia, encontram-se entre os ecossistemas mais ameaçados pelas mudanças climáticas. O aumento da temperatura dos oceanos compromete a simbiose entre corais e microalgas dinoflageladas, resultando no branqueamento de corais. Contudo, diversos fatores podem modular a resposta desses animais ao aquecimento, incluindo fatores ambientais, que podem favorecer mecanismos e estratégias distintas para lidar com o estresse térmico. Neste estudo, avaliou-se a resposta fisiológica do coral *Siderastrea stellata* ao estresse térmico, comparando colônias do topo exposto e da base sombreada de um recife raso. Vinte colônias foram coletadas, fragmentadas e submetidas a dois tratamentos: controle (27°C) e estresse térmico (32°C). Foram analisadas a coloração, eficiência fotossintética (F_q'/F_m'), densidade de zooxantelas e recuperação. Os resultados revelaram que fragmentos do topo apresentaram branqueamento mais intenso, maior redução de F_q'/F_m' e pouca recuperação, inclusive com mortalidade. Já fragmentos da base mantiveram maior estabilidade fisiológica e recuperação parcial, sugerindo papel de refúgio térmico. O aumento da densidade de zooxantelas indicou resposta simbiótica compensatória, mas também potenciais riscos frente a novos episódios de estresse. Conclui-se que microhabitats influenciam diretamente na resiliência de *S. stellata*, a qual poderá ser comprometida diante das intensificações de ondas de calor marinhas.

Palavras-chave: Mudanças climáticas. Estresse térmico. Branqueamento de corais.

TITLE: REFUGES IN RECIFE: THE ROLE OF MICROHABITATS IN THE
THERMAL RESILIENCE OF THE CORAL *Siderastrea stellata*

Abstract

Coral reefs host about 25% of marine biodiversity. However, they are among the ecosystems most threatened by climate change. Rising ocean temperatures compromise the symbiosis between corals and dinoflagellate microalgae, resulting in coral bleaching. Nevertheless, various factors can modulate the response of these animals to warming, including environmental factors that can favor distinct mechanisms and strategies to cope with thermal stress. In this study, the physiological response of the coral *Siderastrea stellata* to thermal stress was evaluated by comparing colonies from the exposed top and the shaded base of a

shallow reef. Twenty colonies were collected, fragmented, and subjected to two treatments: control (27°C) and thermal stress (32°C). The coloration, photosynthetic efficiency (F_q'/F_m'), density of zooxanthellae, and recovery were analyzed. The results revealed that fragments from the top showed more intense bleaching, greater reduction of F_q'/F_m' and little recovery, including mortality. In contrast, fragments from the base maintained greater physiological stability and partial recovery, suggesting a thermal refuge role. The increase in zooxanthellae density indicated a compensatory symbiotic response, but also potential risks in the face of new stress episodes. It is concluded that microhabitats directly influence the resilience of *S. stellata*, which may be compromised in the face of intensified marine heatwaves.

Keywords: Climate change. Thermal stress. Coral bleaching.

Introdução

Embora ocupem menos de 1% do fundo oceânico, os recifes de corais abrigam cerca de 25% da vida marinha (Landim, 2018; Mies *et al.*, 2024). No contexto ecológico, os corais desempenham papel central como bioconstrutores, conferindo complexidade estrutural aos recifes (Graham & Nash, 2012). Essa complexidade, entendida como a arquitetura física tridimensional do ecossistema, é resultante da interação entre organismos construtores vivos (corais, algas e gramíneas) com elementos geológicos ou calcários de organismos mortos (Kleypas *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1994; Bruno & Bertness, 2001). A complexidade resulta na criação de microhabitats, elevando a diversidade e abundância de organismos associados aos ambientes recifais (Pacheco, 2024).

A diversidade de microhabitats influencia diretamente na distribuição, recrutamento e sobrevivência dos corais. Diferentes porções de um mesmo recife, como topos expostos ou bases sombreadas, apresentam condições ambientais contrastantes em termos de irradiância, hidrodinâmica e variação térmica, modulando tanto a fisiologia dos corais, quanto a composição de sua comunidade simbiótica (Brown *et al.*, 2002).

Apesar da relevância ecológica e socioeconômica, os recifes estão entre os ecossistemas mais ameaçados pelas mudanças climáticas. O aumento da temperatura das águas oceânicas interrompe a simbiose entre corais (hospedeiros) e microalgas dinoflageladas da família Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.*, 2018). O aquecimento intensifica a síntese de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que provoca danos oxidativos ao hospedeiro (Dias *et al.*, 2019). Para se protegerem, os corais expulsam seus simbiossiontes, mas essa ruptura implica no branqueamento dos corais, resultando na perda da sua principal fonte energética e no aumento da susceptibilidade a doenças e mortalidade (Weis, 2008; Brandt & McManus, 2009; Crabbe, 2008). Embora episódios moderados possam ser reversíveis, estresses térmicos prolongados e severos levam à mortalidade massiva dos corais (Pacheco, 2024). Com o avanço das mudanças climáticas, a frequência e a intensidade dos eventos de branqueamento vêm aumentando, acelerando a degradação recifal e ampliando o risco de extinção de várias espécies (Carpenter *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2018; Sully *et al.*, 2019).

Apesar dessa tendência global, tem sido observado que corais apresentam diferentes graus de resistência e resiliência ao branqueamento. Em escala regional,

corais do Atlântico-Sul têm sido menos impactados que corais do Indo-Pacífico e Caribe (Mies *et al.*, 2020). Em escala local, corais em diferentes habitats ou ainda em um mesmo recife podem se mostrar mais ou menos vulneráveis e responder de formas diferentes durante um evento de branqueamento (Brown *et al.*, 2002; Klepac & Barshis, 2022). Essas respostas distintas podem estar relacionadas a diferenças ambientais entre os habitats que moldam os mecanismos dos corais (Brown *et al.*, 2002).

Nesse contexto, torna-se fundamental compreender como variações em escala de microhabitat influenciam a resposta fisiológica dos corais ao aquecimento, com fins de prever a resiliência desses animais em cenários de mudanças climáticas. Para isso, foi realizado um experimento de estresse térmico, em laboratório, com colônias de *Siderastrea stellata* Verrill, 1868 de dois microhabitats diferentes: topo exposto e base sombreada de um mesmo recife. A hipótese do estudo considera que a variabilidade ambiental natural constitui um fator determinante da tolerância térmica. Colônias do topo, mais expostas à irradiação e à variação térmica, apresentarão branqueamento mais rápido, mas também maior capacidade de recuperação em comparação às da base, que se desenvolvem em microhabitats sombreados e termicamente mais estáveis. Portanto, este trabalho busca elucidar como os microhabitats podem modular a resiliência dos corais frente ao estresse térmico.

Metodologia

Local de coleta

As colônias foram coletadas em 2 de dezembro de 2024, nos Parrachos de Rio do Fogo/RN (5°16'36"S, 35°22'45"O), região inserida na Área de Proteção Ambiental dos Recifes de Corais (APARC). Criada pelo Decreto Estadual nº 15.746/2001, a APARC abrange os municípios de Maxaranguape, Rio do Fogo e Touros, assegurando a conservação de ecossistemas recifais da região (Figura 1). Os recifes de Rio do Fogo situam-se a aproximadamente 7km da costa, em profundidades de 1 a 6m (Roos *et al.*, 2020), e apresentam cobertura bentônica dominada por algas, corais e zoantídeos (Roos *et al.*, 2019).

Espécie de estudo

Foram coletadas 20 colônias de *S. stellata*, sendo 10 oriundas do topo exposto e 10 da base sombreada do recife (Figura 2). Popularmente conhecida como coral-estrela, a espécie corresponde a um coral escleractíneo zooxantelado de ampla distribuição no Atlântico Sul. Reconhecida por sua alta plasticidade ecológica e crescimento massivo, a espécie desempenha papel central como construtora de recifes rasos, ocorrendo desde a zona intertidais até profundidades superiores a 100m (Pacheco, 2024). Durante a coleta, foram selecionadas colônias com cerca de 10cm de diâmetro, mantendo-se distância mínima de 5m entre indivíduos, a fim de reduzir a probabilidade de amostragem de clones ou genótipos aparentados.

Montagem experimental

As colônias foram transportadas para o Laboratório de Experimentação Aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram fragmentadas em 8

partes de aproximadamente 2cm, totalizando 160 fragmentos, 80 do topo e 80 da base. Estes permaneceram em aclimação por 7 dias em sistema de mesocosmo marinho fechado, sob recirculação contínua de água, iluminação artificial controlada e parâmetros físicos estáveis (temperatura: 27°C; salinidade: 36 PSU; fotoperíodo: 12h claro/12h escuro). Esse período visou reduzir o estresse da coleta e padronizar as condições fisiológicas iniciais.

Os fragmentos foram distribuídos em 16 aquários experimentais, organizados em 4 mesas, sendo 4 aquários por mesa. Duas mesas (8 aquários) receberam 80 genótipos (20 do topo e 20 da base) mantidos em condição de controle. As duas demais (8 aquários) receberam configuração idêntica, mas submetidas ao tratamento de estresse térmico (Figura 3).

Tratamentos experimentais

No controle, a temperatura da água foi mantida em 27°C, representando a média da temperatura dos recifes locais. No tratamento de estresse, a temperatura foi elevada gradualmente em 1°C por dia, conforme protocolo estabelecido por Grottoli *et al.* (2020), até atingir 32°C, valor considerado ecologicamente relevante para simular ondas de calor marinhas. A temperatura máxima (32°C) foi mantida por 16 dias. Em seguida, houve a redução gradual para 27°C, dando início à fase de recuperação que perdurou 28 dias.

O controle térmico foi assegurado por chillers e aquecedores, sendo esse último exclusivo do tratamento de estresse térmico, com monitoramento contínuo por HOBO TidbiT v2 com registros a cada 60min. A circulação da água foi mantida por bombas de fluxo constante. Uma vez por semana os aquários passaram por limpeza e renovação parcial da água, assegurando qualidade físico-química e homogeneidade experimental.

Fragmentos foram coletados ao longo do experimento, durante três momentos (início do experimento, fim do estresse térmico e fim da recuperação), mantendo equilíbrio entre microhabitats a cada coleta, para análises adicionais em estudos paralelos. Como consequência, o número de fragmentos disponíveis diminuiu progressivamente até o fim do experimento.

Variáveis analisadas

1) Dinâmica de branqueamento

A coloração dos fragmentos foi registrada, a cada três dias, por meio de fotografias padronizadas (câmera Canon Powershot G16) e classificada com a escala de cores do Coral Watch (Marshall *et al.*, 2012). Foi utilizada a escala D (D1–D6), na qual D1 representa fragmentos totalmente branqueados e D6 a coloração mais saudável. Fragmentos com coloração D1 e D2 foram agrupados e categorizados como branqueados.

2) Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética (F_q'/F_m') foi quantificada, a cada três dias, por fluorimetria de pulso modulada (Diving-PAM II, Walz, Alemanha). Três medições,

em regiões distintas dos fragmentos, foram realizadas a fim de estimar a integridade funcional da simbiose entre corais e zooxantelas, sob as condições dos tratamentos.

3) Densidade de zooxantelas

Fragmentos foram coletados no início, meio e fim do experimento em ambos os tratamentos. O tecido foi removido por jato de ar comprimido com *phosphate buffered saline* (PBS). Alíquotas foram analisadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica, sendo contabilizadas as células de zooxantelas. Os valores foram normalizados pela área de tecido coralíneo, estimada por moldes de papel alumínio pesados em balança analítica, seguindo a metodologia proposta por Marsh (1970).

4) Potencial de recuperação

Após o estresse térmico, os fragmentos foram mantidos por 28 dias a 27°C. Durante esse período, a coloração e eficiência fotossintética foram monitoradas uma vez por semana. A recuperação foi considerada bem sucedida quando os parâmetros apresentaram tendência de retorno aos valores iniciais.

Análise estatística

As variáveis dependentes (coloração, eficiência fotossintética e densidade de zooxantelas) foram analisadas por modelos lineares mistos (LMM), considerando microhabitat (topo exposto × base sombreada), tratamento (controle × estresse térmico) e tempo como fatores fixos. A significância dos efeitos principais e interações foi avaliada por ANOVA tipo III, seguida de comparações múltiplas com ajuste de Tukey (emmeans). Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram verificados por inspeção dos resíduos. Todas as análises foram realizadas no Rstudio, utilizando os pacotes lme4, lmerTest e emmeans.

Resultados e Discussões

A análise da dinâmica de coloração dos fragmentos de *S. stellata* revelou diferenças entre tratamentos e microhabitats ao longo do experimento (Figura 4). Nos fragmentos mantidos em controle, a coloração, no tempo D0, foi predominantemente escura (D4-D5), caracterizando indivíduos saudáveis. Em D21, os fragmentos de ambas as origens exibiram um discreto clareamento, inclusive havendo branqueamento de dois fragmentos da base. No tempo D53, houve a predominância de branqueamento e, em menor quantidade, os fragmentos exibiram a mesma tonalidade de cores apresentadas em D0. Quando comparados os fragmentos de origem distintas, os da base do recife tiveram menor redução nos tons do que os do topo, havendo inclusive a presença da coloração D6 em dois fragmentos da base no fim do experimento.

Sob estresse térmico, os fragmentos do topo começaram o experimento com coloração saudável (D4), mas apresentaram declínio com registros de branqueamento após o término do aquecimento (tempo D21). Em D53, muitos fragmentos permaneceram branqueados ou em estados intermediários (D3), com registro de um óbito, indicando resiliência limitada. Os fragmentos da base iniciaram

saudáveis (D4-D5) e também exibiram branqueamento em D21, mas em menor intensidade que os do topo. Ao fim do período de recuperação (D53), exibiram, de forma mais evidente, colorações intermediárias a escuras (D3-D4), mas assim como os fragmentos do topo, com ausência de retorno para as tonalidades do início do experimento. De forma geral, os resultados indicam que a fragmentos oriundos da base do recife sofreram menos alterações. Enquanto os do topo apresentaram maior vulnerabilidade, com maior intensidade de branqueamento e, inclusive, mortalidade.

Os padrões observados revelam a importância do microhabitat intrarecifal na modulação da resposta ao estresse térmico. Enquanto os fragmentos do topo apresentaram alta suscetibilidade ao branqueamento, os da base demonstraram maior estabilidade fisiológica. Essa diferença sugere que microvariações ambientais aumentam a vulnerabilidade dos corais, onde áreas mais sombreadas e estáveis, como a base, oferecem condições de refúgio térmico.

Estudos prévios corroboram esses achados. Em Kāne'ohe Bay (Havaí), foi demonstrado que a profundidade e a exposição ao ambiente explicam diferenças na composição da comunidade endossimbiótica dos corais. Independente do histórico de branqueamento, é evidenciado um efeito de memória ambiental que favorece linhagens mais adaptadas a condições estáveis (Souza *et al.*, 2023). De modo semelhante, investigações com *Acropora* em ambientes sombreados mostraram menor intensidade de branqueamento durante ondas de calor, reforçando que microhabitats podem atenuar os impactos do aquecimento global (Hoogenboom *et al.*, 2017).

A variação entre genótipos dentro de um mesmo tratamento e origem, visível na figura, também é relevante. Alguns fragmentos permaneceram mais escuros, enquanto outros sofreram branqueamento acentuado, mesmo sob condições ambientais semelhantes. Isso evidencia que a diversidade genética intraespecífica contribui para respostas diferenciadas e pode ser um fator determinante para a resiliência populacional. Estudos com *Stylophora pistillata*, no Mar Vermelho, apontaram que colônias geneticamente distintas exibem tolerância variável ao calor, reforçando que genética e ambiente interagem de forma sinérgica na determinação da resistência ao estresse (Voolstra *et al.*, 2020).

A eficiência fotossintética efetiva (F_q'/F_m'), indicador da integridade funcional da simbiose entre corais e zooxantelas, foi significativamente influenciada pela origem, tratamento e tempo. Interações entre tratamento $\times$ tempo ($F = 5,00$; $p = <0,001$) e origem $\times$ tratamento $\times$ tempo ($F = 1,79$; $p = 0,004$) reforçaram que as respostas foram dependentes tanto do microhabitat, quanto da condição térmica (Tabela 1). Majoritariamente, em ambos os tratamentos, os fragmentos oriundos da base exibiram valores mais elevados de F_q'/F_m' do que os do topo (Figura 5).

No início do experimento (D0), colônias do topo e da base apresentaram valores médios semelhantes sob condição de controle e estresse, sem diferenças significativas entre tratamentos. Durante a fase inicial (D0-D4), quando a temperatura foi progressivamente elevada, para o tratamento de estresse térmico, iniciou-se uma divergência de resposta entre os tratamentos. Os valores dos fragmentos submetidos ao aquecimento aumentaram em relação aos do controle. Todavia, esse padrão foi modificado entre o D5 e D20, onde fragmentos aquecidos

exibiram uma queda progressiva, atingindo valores mínimos em D14. O controle exibiu comportamento semelhante, indicando tendência dos corais quando submetidos a manipulação experimental. Entretanto, os genótipos aquecidos apresentaram valores inferiores, somando o fato de estarem em um ambiente laboratorial com o aquecimento, portanto, refletindo colapso funcional do aparato fotossintético, sob calor crônico, em consonância com padrões relatados em corais do Atlântico e do Pacífico (Baker *et al.*, 2018; Bay & Palumbi, 2017).

Durante a redução gradual da temperatura (D21 à D25), os fragmentos de ambas origens apresentaram valores mínimos, os da base em D21 e os do topo em D25. Apesar disso, no decorrer do experimento, os genótipos da base, submetidos a estresse térmico, apresentaram recuperação parcial com valores ascendentes de F_q'/F_m' , diferentemente do que é exibido pelos fragmentos do topo desse mesmo tratamento.

No final da fase de recuperação (D53), as colônias da base conseguiram retornar aos valores apresentados no início do experimento. No entanto, os fragmentos do topo, submetidos ao mesmo tratamento, não obtiveram o mesmo resultado. Enquanto isso, no controle, os corais de ambas as origens obtiveram melhora no desempenho fotossintético, sendo esses valores superiores aos do início do experimento.

Esses resultados reforçam a influência do microhabitat. Os fragmentos aquecidos, de ambas as origens, mantiveram valores altos de F_q'/F_m' durante o estresse térmico (D0 à D4). Atribui-se essa resposta ao fato de que, muitas vezes, no início do aquecimento, as zooxantelas ativam mecanismos de compensação que otimizam a fotossíntese temporariamente, antes que o dano cumulativo ao aparato fotossintético (PSII) se manifeste. Esse mecanismo pode justificar os valores da eficiência fotossintética maiores do que os apresentados no controle. A partir do D7, os genótipos aquecidos do topo apresentam valores de F_q'/F_m' inferiores aos da base, indicando déficit no aparato fotossintético. Esse perfil estende-se até o fim do experimento, elucidando que as colônias da base não tiveram sua eficiência fotossintética tão prejudicada como as do topo, e que a heterogeneidade espacial dos recifes emerge como peça chave da resiliência dos corais (Klepac & Barshis, 2022; Mellin *et al.*, 2024).

A complexidade dos microhabitats não favorece apenas a biodiversidade, mas também confere respostas diferenciais ao estresse térmico, aumentando a resiliência de colônias da base em comparação às do topo. No entanto, a recuperação incompleta, mesmo após 28 dias, para o tratamento de estresse térmico, sugere que embora *S. stellata* possua plasticidade adaptativa a intensificação de eventos de onda calor, a espécie poderá ter sua capacidade de recuperação ultrapassada, comprometendo a estabilidade ecológica dos recifes do Atlântico Sul.

A sobreposição dos padrões de coloração e de eficiência fotossintética reforçam que o branqueamento observado não é apenas um fenômeno visual, mas que está intrinsecamente ligado à disfunção da simbiose entre corais e zooxantelas, além da perda da capacidade fotossintética. O clareamento progressivo dos fragmentos do topo, sob aquecimento, coincidiu com reduções drásticas em F_q'/F_m' , evidenciando o colapso funcional da simbiose. Por outro lado, os fragmentos da base, apesar de

também clarearem em D21, mantiveram valores mais altos de F_q'/F_m' , demonstrando resiliência fisiológica maior e sugerindo que este microhabitat atua como refúgio térmico.

Em relação a análise da densidade de zooxantelas, o modelo linear misto mostrou que a origem (topo $\times$ base) e tempo (D0, D21, D53) tiveram efeitos significativos sobre a densidade de zooxantelas. O tratamento isolado (controle $\times$ estresse térmico) não foi significativo, porém houve interações significativas entre tempo $\times$ tratamento ($F = 8,60$; $p < 0.001$) e origem $\times$ tempo $\times$ tratamento ($F = 5,50$; $p = 0.0059$), indicando que as respostas temporais ao aquecimento dependem da origem do fragmento (Tabela 2).

As comparações pareadas (emmeans, ajuste Tukey) revelaram que, no grupo controle, a base apresentou aumento de densidade entre D0 e D53. No grupo aquecido, embora também tenha havido aumento, os contrastes foram menos acentuados e, em alguns casos, não significativos. Em síntese, os resultados indicam que a densidade de zooxantelas tende a aumentar ao longo do tempo, sobretudo nos fragmentos oriundos da base do recife em condições de controle. Enquanto, sob aquecimento, esse aumento ocorre de forma mais moderada e variável (Figura 6).

O crescimento da densidade de zooxantelas, ao longo do experimento, contrasta com o padrão clássico de perda sob estresse térmico, mas está de acordo com estudos que documentam respostas compensatórias ou mesmo proliferação dos simbiontes em condições experimentais controladas (Fitt *et al.*, 2000; Cunning & Baker, 2013). Esse aumento provavelmente reflete ajustes fotofisiológicos dos simbiontes, aliados ao favorecimento da multiplicação das zooxantelas. No controle, essa trajetória foi mais pronunciada, sugerindo que na ausência de estresse térmico os simbiontes aumentam de forma progressiva, possivelmente por serem beneficiados pela disponibilidade de recursos e estabilidade ambiental.

A variação entre topo e base demonstra a importância dos microgradientes ambientais, como irradiância, fluxo e temperatura, na regulação simbiótica. Fragmentos da base, sujeitos a condições de menor exposição luminosa, exibiram maiores aumentos ao longo do tempo, possivelmente devido à menor pressão oxidativa e, portanto, maior capacidade de proliferação de simbiontes.

O fato do tratamento aquecido não se manifestar como efeito principal, mas apenas em interações, sugere que o calor modulou a trajetória do aumento dos simbiontes, em vez de reduzi-los. Desse modo, o aquecimento não suprimiu totalmente o crescimento da densidade de zooxantelas, mas moderou sua taxa e magnitude. Trabalhos recentes indicam que exposições moderadas ao calor podem induzir rearranjos fisiológicos ou seleção de simbiontes mais tolerantes (Grottoli *et al.*, 2014; Suggett *et al.*, 2017), o que poderia explicar os aumentos sutis observados no tratamento aquecido.

Embora o aumento da densidade de simbiontes possa inicialmente representar maior potencial fotossintético e aporte energético para o coral, ele também pode acarretar riscos. Densidades elevadas tendem a aumentar a produção de EROs sob estresse térmico ou luminoso (Cunning & Baker, 2013). Assim, a expansão observada no controle pode representar uma trajetória vulnerável a futuros

episódios de estresse, enquanto a resposta mais contida sob aquecimento poderia refletir um ajuste protetivo, limitando riscos oxidativos.

Em síntese, os resultados demonstram que os microhabitats atuam como modulador crítico da resiliência coralina. Embora *S. stellata* apresente plasticidade adaptativa, o aquecimento prolongado comprometeu sua recuperação completa, evidenciando que mesmo espécies tolerantes podem ter seus limites superados sob cenários de intensificação de ondas de calor marinhas.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que variações de microhabitats, dentro de um mesmo recife, modulam significativamente a resposta fisiológica de *S. stellata* ao estresse térmico. Fragmentos oriundos do topo exposto apresentaram maior intensidade de branqueamento, maior queda na eficiência fotossintética e até mortalidade, evidenciando maior vulnerabilidade ao aquecimento prolongado. Em contraste, fragmentos da base sombreada sofreram menor clareamento, mantiveram valores mais elevados de F_q'/F_m' e exibiram recuperação parcial da simbiose, sugerindo que este microhabitat oferece condições de refúgio térmico.

A sobreposição entre coloração, eficiência fotossintética e densidade de zooxantelas reforça que o branqueamento não é apenas uma resposta visual, mas reflete diretamente a disfunção do aparato fotossintético e a perda da estabilidade simbiótica. Embora a densidade de zooxantelas tenha aumentado ao longo do tempo, em ambos os tratamentos, esse padrão foi mais evidente sob condições de controle e mais moderado sob aquecimento, indicando uma resposta compensatória com potenciais riscos futuros, já que densidades elevadas de zooxantelas podem amplificar a produção de EROs em novos episódios de estresse.

Além das diferenças entre microhabitats, a variabilidade de resposta entre genótipos sugere que a diversidade genética intraespecífica constitui um componente adicional da resiliência dos corais. A interação entre fatores ambientais locais e características genéticas individuais amplia a plasticidade adaptativa da espécie, mas também evidencia que os limites de tolerância podem ser ultrapassados em cenários de aquecimento mais severos e frequentes.

Em síntese, este estudo destaca que o microhabitat atua como fator determinante na resiliência de *S. stellata* frente ao aquecimento global. Enquanto a base sombreada emerge como um microhabitat de refúgio térmico, o topo exposto representa um ambiente mais vulnerável. Apesar da reconhecida plasticidade desta espécie no Atlântico Sul, a recuperação incompleta, após o estresse térmico, indica que ondas de calor cada vez mais intensas poderão comprometer sua função como construtora recifal, afetando a estabilidade ecológica e a persistência dos recifes brasileiros.

Referências

BAKER, D.M., FREEMAN, C.J., WONG, J. (2018). Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. 12, 921–930.

BAY, R.A., ROSE, N.H., PALUMBI, S.R. (2017). Genomic models predict successful coral adaptation if future ocean warming rates are reduced. *Sci Adv.* 1;3(11):e1701413.

BRANDT, M.E., & MCMANUS, J.W. (2009). Disease incidence is related to bleaching extent in reef-building corals. In *Ecology*, 90(10), 2859-2867.

BROWN, B., DUNNE, R., GOODSON, M. (2002).. Experience shapes the susceptibility of a reef coral to bleaching. *Coral Reefs* 21, 119–126.

BRUNO, J. & BERTNESS, M. (2001). Habitat modification and facilitation in benthic marine communities. V 413. *Marine Community Ecology*.

CARPENTER, K.E., ABRAR, M., AEBY, G., ARONSON, R.B., BANKS, S., BRUCKNER, A., WOOD, E. (2008). One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. In *Science*, 321, 560-563.

CRABBE, M.J.C. (2008). Climate change, global warming and coral reefs: Modelling the effects of temperature. *Computational Biology and Chemistry*, 32(5), 311-314.

CUNNING, R., & BAKER, A.C. (2013). Excess algal symbionts increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*, 3, 259–262.

DIAS, M., FERREIRA, A., GOUVEIA, R., MADEIRA, C., JOGEE, N., CABRAL, H., DINIZ, M., VINAGRE, C. (2019). Long-term exposure to increasing temperatures on scleractinian coral fragments reveals oxidative stress. *Marine Environmental Research*, 150.

FITT, W.K., MCFARLAND, F.K., WARNER, M.E., & CHILCOAT, G.C. (2000). Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 677–685.

GRAHAM, N.A.J., NASH, K.L. (2013). The importance of structural complexity in coral reef ecosystems. *Coral Reefs* 32, 315–326.

GROTTOLI, A.G., TOONEN, R.J., VAN WOESIK, R., THURBER, R.V., WARNER, M. E., MCLACHLAN, R.H., PRICE, J.T., BAHR, K.D., BAUMS, I.B., CASTILLO, K.D., COFFROTH, M.A., CUNNING, R., DOBSON, K.L., DONAHUE, M.J., HENCH, J. L., IGLESIAS-PRIETO, R., KEMP, D.W., KENKEL, C.D., KLINE, D.I, KUFFNER, I.B., MATTHEWS, J.L., MAYFIELD, A.B., PADILLA-GAMIÑO, J.L., PALUMBI, S., VOOLSTRA, C.R., WEIS, V.M., WU, H.C. (2020). Increasing comparability among coral bleaching experiments. *Ecological Applications*, 31(4).

HOOGENBOOM, M.O., FRANK, G.E., CHASE, T.J., JURRIAANS, S., ÁLVAREZ-NORIEGA, M., PETERSON, K., CRITCHELL, K., BERRY, K.L.E., NICOLET, K.J., RAMSBY, B., PALEY, A.S. (2017). Environmental Drivers of Variation in Bleaching Severity of *Acropora* Species during an Extreme Thermal Anomaly. *Frontiers in Marine Science*. Volume 4. 2296-7745.

HUGHES, T.P., ANDERSON, K.D., CONNOLLY, S.R., HERON, S.F., KERRY, J.T., LOUGH, J.M., BAIRD, A.H., BAUM, J.K., WILSON, S.K. (2018). Spatial and

temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. In *Science*, 359 (6371), 80–83.

JONES, C.G., LAWTON, J.H., SCHACHAK, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69: 373-386.

KLEPAC, C.N., BARSHIS, D.J. (2022). High-resolution in situ thermal metrics coupled with acute heat stress experiments reveal differential coral bleaching susceptibility. *Coral Reefs* 41, 1045–1057.

KLEYPAS, J.A., BUDDEMEIER, R.W., GATTUSO, J.P. (2001). The future of coral reefs in an age of global change. *International Journal of Earth Sciences*, 90, 426–437.

LAJEUNESSE, T.C., PARKINSON, J.E., GABRIELSON, P.W., JEONG, H.J., REIMER, J.D., VOOLSTRA, C.R., SANTOS, S.R. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, v. 28, n. 16, 2570-2580.

LANDIM, M.I. (2018). Um oceano de desconhecimento sobre a biodiversidade. *Museologia & Interdisciplinaridade*, v. 7.

MARSH, J.A.JR. (1970). Primary productivity of reef-building calcareous red algae. *Ecology*, 51(2), 255–263.

MARSHALL, N.J., KLEINE, D.A., DEAN, A.J. (2012). CoralWatch: education, monitoring, and sustainability through citizen science. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10(6), 332–334.

MELLIN, C. (2024). Cumulative risk of future bleaching for the world's coral reefs. *Sci. Adv.* 10, eadn9660.

MIES, M., BANHA, T.N., CASTRO, C.B., CORDEIRO, R.T., LOTUFO, T.M., BIANCHINI, A. (2024). Biology of Brazilian Benthic Reef Builders and Dwellers. In *Brazilian Coral Reefs: A Multidisciplinary Approach*, 81-112.

MIES, M., FRANCINI-FILHO, R.B., ZILBERBERG, C., GARRIDO, A.G., LONGO, G.O., LAURENTINO, E., GÜTH, A.Z., SUMIDA, P.Y.G., BANHA, T.N.S. (2020). South Atlantic Coral Reefs Are Major Global Warming Refugia and Less Susceptible to Bleaching. In *Frontiers in Marine Science*, v. 7. Frontiers Media SA.

PACHECO, M.C.DEO. (2024). Ambientes com maior variação de temperatura selecionam corais mais resistentes ao estresse térmico?. *Dissertação (Mestrado em Ecologia)* - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

ROOS, N.C.; PENNINO, M.G.; CARVALHO, A.R.; LONGO, G.O. (2019). Drivers of abundance and biomass of Brazilian parrotfishes. *Marine Ecology Progress Series*, 623, 117-130.

ROOS, N.C.; TAYLOR, B.M.; CARVALHO, A.R.; LONGO, G.O. (2020). Demography of the largest and most endangered Brazilian parrotfish, *Scarus trispinosus*, reveals overfishing. *Endangered Species Research*, 41, 319-327.

SOUZA, M.R., CARUSO, C., RUIZ-JONES, L. (2023). Importance of depth and temperature variability as drivers of coral symbiont composition despite a mass bleaching event. *Sci Rep* 13, 8957.

SUGGETT, D.J. & SMITH, D.J. (2020). Coral bleaching patterns are the outcome of complex biological and environmental networking. In *Global Change Biology*. 26, 1, 68 - 79.

SULLY, S., BURKEPILE, D.E., DONOVAN, M.K. (2019). A global analysis of coral bleaching over the past two decades. *Nat Commun* 10, 1264.

VOOLSTRA, C.R., BUITRAGO-LÓPEZ, C., PERNA, G., CÁRDENAS, A., HUME, B.C.C., RÄDECKER, N., BARSHIS, D.J. (2020). Standardized short-term acute heat stress assays resolve historical differences in coral thermotolerance across microhabitat reef sites. *Glob Chang Biol*. (8):4328-4343.

WEIS, V.M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal Of Experimental Biology*, 211(19), 3059-3066.

Anexos

Figura 1 - Localização da área de coleta das colônias de *S. stellata*.

Figura 2 - Exemplificação dos microhabitats de coleta para realização do experimento.

Figura 3 - Desenho experimental dos fragmentos de corais distribuídos nos tratamentos.

Figura 4 - Mensuração da dinâmica do branqueamento através da escala de cores CoralWatch. Quanto mais próximo da tonalidade D6, mais saudável encontra-se o fragmento. D21 e D53 têm menos fragmentos em função das coletas realizadas ao longo do experimento.

Tabela 1 - ANOVA do tipo III investigando os efeitos da origem, tratamento e tempo na eficiência fotossintética dos fragmentos de *S. stellata*.

Figura 5 - Média da eficiência fotossintética dos genótipos das colônias de *S. stellata* no decorrer do experimento.

Tabela 2 - ANOVA tipo III investigando os efeitos da origem, tratamento e tempo na densidade de zooxantelas dos fragmentos de *S. stellata*.

Figura 6 - Densidade de zooxantelas oriundas das colônias de *S. stellata* no decorrer do experimento.

CÓDIGO: SB1315

AUTOR: JOAO PEDRO LEMOS E SILVA RODRIGUES

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTES COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILAR DO TIPO 4

Resumo

A lipodistrofia parcial familiar do tipo 4 (LPF 4) é uma condição rara causada por mutações no gene PLIN1 que codifica a proteína perilipina-1 (PLIN1), que possui papel regulador no processo de lipólise. Mutações frameshift no gene dessa proteína estão diretamente associadas à LPF 4, caracterizada pela perda de tecido adiposo na região glúteo-femoral. Com objetivo de caracterizar as mutações associadas à LPF 4, foi feita a análise estrutural de uma variante na literatura que segregava para LPF. A sequência da proteína PLIN1 mutante foi submetida a análises de alinhamento de sequência, predição de domínios e de estrutura tridimensional, utilizando softwares como T-Coffee e AlphaFold. Os resultados indicaram que o frameshift ocasiona o alongamento da PLIN1 com 42 aminoácidos adicionais. As predições de desordem e estrutura revelaram que a porção C-terminal, naturalmente desordenada, manteve esta característica, contudo, a estrutura da variante teve sutilmente uma alteração de suas alfa-hélices localizadas adjacentes a mutação. Em conclusão, as análises sugerem que a mutação, embora não cause alteração drástica na estrutura tridimensional da proteína, pode comprometer a dinâmica de interações de PLIN1 com outras lipases, corroborando para o fenótipo observado da LPF 4.

Palavras-chave: Tecido Adiposo; Doenças Raras; Lipodistrofia; Perilipina.

TITLE: GENETIC DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH FAMILIAR PARTIAL LIPODYSTROPHY TYPE 4

Abstract

Familial partial lipodystrophy type 4 (FPLD4) is a rare condition caused by mutations in the PLIN1 gene, which encodes the protein perilipin-1 (PLIN1), which plays a regulatory role in lipolysis. Frameshift mutations in this protein gene are directly associated with FPLD 4, characterized by loss of adipose tissue in the gluteofemoral region. To characterize the mutations associated with FPLD 4, a structural analysis was performed on a variant in the literature that segregated for FPLD. The sequence of the mutant PLIN1 protein was subjected to sequence alignment, domain prediction, and three-dimensional structure analyses using software such as T-Coffee and AlphaFold. The results indicated that the frameshift causes the elongation of PLIN1 with 42 additional amino acids. Disorder and structure

predictions revealed that the naturally disordered C-terminal portion maintained this characteristic; however, the structure of the variant had a subtle alteration of its alpha helices located adjacent to the mutation. In conclusion, the analyses suggest that the mutation, although it does not cause a drastic change in the three-dimensional structure of the protein, may compromise the dynamics of PLIN1 interactions with other lipases, corroborating the observed phenotype of LPF 4.

Keywords: Adipose tissue; Rare diseases; Lipodystrophy; Perilipin.

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, indicando estados de apetite e saciedade [1]. Portanto, em situações em que o tecido adiposo se encontra 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 apresentarem sintomas parecidos a outras doenças metabólicas ou pela necessidade de um diagnóstico genético. Além disso, a falta de conhecimento dos profissionais da saúde acerca das lipodistrofias se apresenta como fator relevante [2].

As lipodistrofias são um grupo de doenças raras heterogêneas relacionadas com a disfunção do tecido adiposo, caracterizadas pela ausência do branco subcutâneo que podem se manifestar de forma localizada, parcial ou generalizada, e por complicações metabólicas como o diabetes, hipertrigliceridemia e esteatose. As lipodistrofias são classificadas pelo padrão de perda de tecido adiposo branco subcutâneo (parcial ou generalizado) e por sua etiologia (adquirida ou genética) [3]. Consideradas doenças extremamente raras, as lipodistrofias parciais familiares (LPFs) e a Lipodistrofia Generalizada Congênita (LCG) possuem prevalência estimada de 1.3-4.7 casos por milhão de pessoas [4]. As LPFs representam um grupo de doenças de padrão autossômico dominante [5], caracterizadas pela perda parcial do tecido adiposo branco subcutâneo, 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 LPF que existem, em que podem ser diferenciados principalmente por qual região do corpo é mais afetada pela ausência de gordura [6].

A lipodistrofia parcial familiar tipo 4 (LPF4), é um dos subtipos de lipodistrofia e está relacionada a PLIN1, gene que codifica a perilipina-1 (PLIN1), uma proteína expressa em adipócitos e células espumosas [7], que atua se ancorando nas gotículas lipídicas mediando o acesso de lipases. Na LPF 4, a lipoatrofia se concentra nos membros inferiores e glúteos, acompanhada da hipertrofia muscular de regiões como a panturrilha, e com aspecto acromegaloide na face, mãos e pés [8], [9]. Além disso, acompanhando os sinais macroscópicos, a LPF 4 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 patogênicas que geravam fenótipos não prejudiciais e até metabolicamente favoráveis [10], quanto aqueles que apresentavam fenótipo lipodistrófico e de aterosclerose associada à síndrome coronariana aguda (SCA) [8], [11]. A LPF 4 e outras lipodistrofias genéticas são no geral doenças subdiagnosticadas, além disso, vale ressaltar que como demonstrado em Medeiros et al (2017) [12], a elaboração de um estudo no estado do Rio Grande do Norte demonstrou alta prevalência da LGC na região. O diagnóstico claro, permite uma intervenção médica e tratamento adequado, evitando o agravamento das complicações metabólicas envolvidas e auxiliando os pacientes a terem estilo de vida adequado. Associado também à heterogeneidade das variantes de PLIN1, a análise das mutações envolvidas é essencial, visando compreender o impacto delas na estrutura de PLIN1 e sua patogenicidade.

Metodologia

Objetivos

Este estudo tem como objetivo geral realizar diagnóstico genético de pacientes com suspeita de lipodistrofia parcial familiar tipo 4, seguindo os objetivos específicos: 1) Revisão da literatura acerca do gene PLIN1, analisar as mutações envolvidas, e quais se apresentam como prejudiciais e causadoras da LPF 4; 2) A partir da revisão, elaborar um perfil genético de indivíduos com LPF 4, incluindo a classificação das mutações mais frequentes envolvidas; 3) Fazer a análise genética dos indivíduos suspeitos de LPF 4, com a descrição das mutações em PLIN1 encontradas e análise bioinformática da proteína mutada.

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, foi 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 consistiu em: abordar a LPF 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 descrevam novas variantes, mas não apresentavam caso clínico associado.

(p).

1. Obtenção de sequências

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. Para a análise de bioinformática, visando compreender o impacto na estrutura de PLIN1 das mutações que estão relacionadas à LPF 4, foi escolhida a mutação c.1308_1309delTG (p.Pro439Val*126) [13] ID ClinVar: 1342123, as sequências de nucleotídeos que codificam a proteína PLIN1 mutante foram obtidas através do UCSC Genome Browser [14].

2. Análise bioinformática e predição da estrutura mutada

Com auxílio da ferramenta Translate Tool Expasy operada pelo Swiss Institute of Bioinformatics será gerada a sequência de aminoácidos alterada. Em seguida, eles serão traduzidos em aminoácidos por meio da ferramenta Translate Tool para visualizar suas diferenças de aminoácidos. As ferramentas MutationTaster e T-Coffee [15] serão utilizadas para alinhamento de sequências proteicas, avaliação de transcritos e análise de dados de conservação entre espécies. Para realização de simulação bioinformática da estrutura proteica contendo as variantes encontradas neste trabalho serão utilizadas as ferramentas ChimeraX e AlphaFold Protein [16][17], a partir da estrutura de referência para PLIN1 e considerado a simulação com maior valor de prevalência.

Resultados e Discussões

PLIN1 é uma proteína que se localiza externamente à gotícula lipídica dos adipócitos, regulando o acesso de lipases ao seu conteúdo interno 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 [18]. Mutações localizadas na porção final do gene são as que estão relacionadas aos diversos casos de LPF 4 presentes na literatura [8], [9]. Todas possuem algo em comum: levam a um frameshift que, presume-se, afetar a capacidade de PLIN1 interagir com o cofator ABDH5, levando à incapacidade de inibir a lipólise pela ATGL [18]. Analisando isoladamente uma dessas variantes, a p.Pro439Val*126 (Figura 1), nota-se que o frameshift na porção final do gene resulta no alongamento da cadeia de aminoácidos. A variante patogênica, com 564 aminoácidos no total, apresenta 42 resíduos adicionais em comparação com os 522 da proteína selvagem (Figura 2). As predições estruturais por AlphaFold demonstram que a perilipina-1 selvagem possui uma região intrinsecamente desordenada em sua porção C-terminal (Figura 3), característica que foi mantida na proteína mutante (Figura 4), mesmo com os novos resíduos. Em adição, quando sobrepostas as duas proteínas, a variante p.Pro439Val*126 difere levemente da selvagem na conformação de suas alfa-hélices, especificamente àquelas mais próximas à região terminal desordenada (Figura 5). Embora essa variante não cause uma alteração conformacional drástica, o alongamento da região desordenada pode ter implicações funcionais significativas. O frameshift altera a sequência de 126 aminoácidos a partir da posição 438, resultando em uma nova sequência que, devido à sua natureza desordenada e seu comprimento adicional, pode alterar a dinâmica de interações da proteína. Pode-se supor que a adição e troca de aminoácidos na porção final seja capaz de afetar a afinidade ou o acesso aos seus sítios de ligação, como os de

ABDH5, que estão localizados nesta região [18], interferindo na sua função de regular a lipólise e corroborando para o fenótipo da LPF 4.

Conclusão

Os resultados corroboram com a literatura existente [17], demonstrando que mutações frameshift afetam principalmente a região C-terminal de PLIN1, que apesar de preservar sua estrutura geral, ainda há uma leve alteração na conformação de suas alfa-hélices, além da adição e troca dos aminoácidos de sua cadeia desordenada.

É importante ressaltar que este trabalho foi integralmente realizado com base em predições de softwares de bioinformática, tendo em vista principalmente que a proteína PLIN1 não possui estrutura solucionada *in vitro*. Ferramentas como o AlphaFold possuem limitações para realizar a predição de certas proteínas, especialmente aquelas que apresentam regiões flexíveis e desordenadas, como PLIN1. Porém, devido ao extenso acervo de proteínas do genoma humano, bem como suas variantes, o uso de ferramentas de bioinformática se torna imprescindível na análise funcional delas, além de verificar o impacto que mutações têm sobre a dinâmica molecular do organismo. Logo, o uso de ferramentas de bioinformática pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares de doenças raras, como as lipodistrofias genéticas, contribuindo para a descoberta de novos alvos terapêuticos e na facilitação de tratamentos.

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] Cândido Dantas, Verônica Kristina et al. "Nurses' knowledge about Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy." *PloS one* vol. 13,6 e0197784. 4 Jun. 2018, doi:10.1371/journal.pone.0197784
- [3] 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.
- [4] 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/dms.o.s130810.
- [5] 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.

- [6] 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.
- [7] 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.
- [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/je.2019-00849.
- [9] R. X. Chen et al., "The renal manifestation 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," *Diabetes and Metabolic Syndrome*, vol. 9, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s13098-017-0280-7.
- [13] 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.
- [14] Perez G, Barber GP, Benet-Pages A, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Fischer C, Gonzalez JN, Hinrichs AS, Lee CM, Nassar LR, Raney BJ, Speir ML, van Baren MJ, Vaske CJ, Haussler D, Kent WJ, Haussler M. The UCSC Genome Browser database: 2025 update. *Nucleic Acids Res*. 2025 Jan 6;53(D1):D1243-D1249. doi: 10.1093/nar/gkae974. PMID: 39460617; PMCID: PMC11701590.
- [15] Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitz 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.
- [16] 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.

[17] 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.

[18] 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.

Anexos

Figura 1. Sequência de aminoácidos da mutante c.1308_1309delTG (p.Pro439Vals*126) visualizada através do Translate Tool.

Figura 2. Alinhamento das sequências selvagem e mutante pelo software T-Coffee.

Figura 3. PLIN1 selvagem predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX

Figura 4. PLIN1 p.Pro439Vals*126 predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX.

Figura 5. Sobreposição da PLIN1 selvagem (azul) e PLIN1 p.Pro439Vals*126 (rosa) preditas pelo AlphaFold e visualizadas através da ferramenta Matchmaker do ChimeraX.

CÓDIGO: SB1327

AUTOR: REBECA GOMES SOARES

COAUTOR: BIANCA VILLAR CARVALHO GUERREIRO

ORIENTADOR: MIRIAM PLAZA PINTO

TÍTULO: Pesquisas sobre as espécies de Callicebinae (Primates) e conhecimento sobre história de vida e ecologia: resultados iniciais

Resumo

Os primatas neotropicais desempenham funções ecológicas essenciais, como dispersão de sementes e polinização, mas enfrentam ameaças como perda e fragmentação de habitat, caça e mudanças climáticas, resultando em 40,2% das espécies ameaçadas e 63% com populações em declínio. A subfamília *Callicebinae*, composta pelos gêneros *Callicebus*, *Cheracebus* e *Plecturocebus*, inclui 35 espécies, com grande parte frugívora, monogâmica e com cuidado biparental da prole. A revisão sistemática identificou 642 artigos, dos quais 73 atenderam aos critérios de estudo de campo e ecologia. Apenas 21,1% das espécies possuem dados de campo, destacando viés geográfico com concentração no Brasil, Peru e Colômbia, e lacunas em áreas amazônicas. Densidade populacional variou de 0,24 a 16,3 indivíduos/km² e home range de 6,5 a 967 ha. Estudos mais complexos, como densidade e uso do espaço, são metodologicamente exigentes, mas essenciais para avaliação de risco e estratégias de conservação. Há predominância de dados de ocorrência, comportamento e dieta, enquanto informações sobre história de vida e modelagem espacial são escassas. A ampliação de pesquisas de ecologia e campo se faz necessária para preencher lacunas, fornecer dados e mitigar estratégias de conservação eficazes para a subfamília *Callicebinae*.

Palavras-chave: Revisão. Ecologia. *Callicebus*. *Plecturocebus*. *Cheracebus*. *Callicebinae*

TITLE: Research on *Callicebinae* (Primates) species and knowledge about life history and ecology: initial results

Abstract

Neotropical primates perform essential ecological functions, such as seed dispersal and pollination, but face threats such as habitat loss and fragmentation, hunting, and climate change, resulting in 40.2% of species being threatened and 63% with declining populations. The *Callicebinae* subfamily, composed of the genera *Callicebus*, *Cheracebus*, and *Plecturocebus*, includes 35 species, most of which are frugivorous, monogamous, and biparental in caring for their offspring. The systematic review identified 642 articles, of which 73 met the criteria for field study and ecology. Only 21.1% of species have field data, highlighting geographical bias with a concentration in Brazil, Peru, and Colombia, and gaps in Amazonian areas. Population density ranged from 0.24 to 16.3 individuals/km² and home range from 6.5 to 967 ha. More complex studies, such as density and space use, are methodologically demanding but essential for risk assessment and conservation strategies.

There is a predominance of data on occurrence, behavior, and diet, while information on life history and spatial modeling is scarce. Expanded ecological and field research is needed to fill gaps, provide data, and mitigate effective conservation strategies for the *Callicebinae* subfamily.

Keywords: Review. Ecology. *Callicebus*. *Plecturocebus*. *Cheracebus*. *Callicebinae*

Introdução

Os primatas neotropicais desempenham funções ecológicas importantes, entre elas, dispersão de sementes, polinizadores reguladores de espécies competidoras, contribuindo para a manutenção da diversidade de plantas vegetal nos habitats (Andresen et al., 2018). Perda e fragmentação de habitat, pecuária, corte seletivo e extração de recursos, estão entre as principais ameaças para os primatas Neotropicais (Estrada et al. 2020, Fernandez et al. 2021). A área de floresta é o principal habitat de primatas Neotropicais (Gouveia et al. 2014), e continuam a ser perdidas (Estrada et al. 2020). As espécies de primatas neotropicais são, em maioria, arborícolas (Estrada & Marshall 2024). Estes são dependentes da cobertura florestal para a sobrevivência, e esta é afetada negativamente pela perda de área florestal (Chapman 2001, Estrada et al. 2017).

A família Pitheciidae reúne primatas exclusivamente neotropicais, composta por duas subfamílias: *Callicebinae* e *Pitheciinae* (composta pelos gêneros *Pithecia*, *Chiropotes* e *Cacajao*). Entre os primatas Neotropicais, os *Callicebinae* são a subfamília de *Pitheciidae* (pitheciídeos) mais amplamente distribuída, composta pelos gêneros *Cheracebus* e *Plecturocebus*, que ocorrem na Amazônia, e *Callicebus*, restrito ao leste do Brasil nos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Muitas espécies do grupo são frugívoras especializadas, consumindo sementes e frutos duros, desempenhando papel central na dinâmica florestal e na dispersão de sementes (Norconk et al. 1998, Andresen et al. 2018). Os primatas da subfamília *Callicebinae* chamados comumente de titis, sauás ou zogue-zogues, são de pequeno a médio porte, com peso médio dos adultos variando entre 1 e 2 kg (Smith & Jungers 1997). Esses animais vivem em grupos familiares que consistem em um par monogâmico e um a três infantes ou subadultos (Bicca-Marques & Heymann, 2013), com cuidado da prole sendo biparental. Estes organismos possuem dieta predominantemente frugívora, complementada por folhas jovens, flores e insetos (De Lucycker 2012, Bicca-Marques & Heymann, 2013). Essas espécies também são conhecidas por sua vocalização de longo alcance, frequentemente utilizada para comunicação entre grupos e marcação de território, incluindo emissões de duetos vocais (Adret et al. 2018, Wright 2013). Atualmente, *Callicebinae* abrange 35 espécies, cinco espécies do gênero *Callicebus*, cinco espécies do gênero *Cheracebus* e 25 espécies do gênero *Plecturocebus*, das quais 11,4% estão Criticamente em Perigo de extinção, 8,6% Em Perigo, 14,3% Vulneráveis, e 5,7% Quase ameaçada (IUCN 2024).

O número de estudos sobre os *Callicebinae* tem aumentado ao longo do tempo, especialmente na última década, mas ainda assim as pesquisas são espacialmente concentradas (Souza-Alves et al. 2023). Embora, para o clado, de maneira geral, aspectos ecológicos e comportamentais sejam conhecidos, a compilação do quanto os atributos de história de vida e ecológicos têm sido estudados para as diferentes espécies, a provisão de uma síntese sobre esses atributos, e o entendimento de como estes variam para as espécies que ocorrem em diferentes biomas e em diferentes contextos locais de alteração do habitat pode complementar o entendimento sobre as lacunas de conhecimento já identificadas. O conhecimento científico sobre estes organismos, além de ter valor intrínseco, é essencial para dar suporte a estratégias de manejo e conservação destes organismos, bem como dos habitats nos quais ocorrem.

O objetivo deste estudo é fazer uma síntese e revisão dos estudos publicados sobre os primatas do grupo *Callicebinae*, com foco no conhecimento existente para as espécies e nos diferentes contextos locais. Compilando atributos de história de vida e ecológicos estudados para cada espécie desse grupo, explicitando e coletando as variáveis que foram medidas. Dessa forma, poderemos sintetizar atributos conhecidos e identificar lacunas no conhecimento para cada espécie, relacionando os atributos com o contexto local do estudo.

Metodologia

Os artigos publicados sobre espécies da subfamília *Callicebinae* foram obtidos na plataforma de indexação *Web of Science*. A busca foi realizada utilizando como palavras-chave *Callicebus*, *Plecturocebus* e *Cheracebus* (*Callicebus* OR *Plecturocebus* OR *Cheracebus*), sem aspas e sem restrição temporal (abrangendo todos os artigos publicados antes do dia 11 de junho de 2025). A pesquisa resultou em 642 artigos (575 para *Callicebus*, 113 para *Plecturocebus* e 16 para *Cheracebus*). Todos os artigos obtidos foram inicialmente triados a partir da análise dos títulos e, quando necessário, dos resumos, permitindo a seleção prévia daqueles cujo tema principal estava relacionado à ecologia. Apenas estudos publicados no formato artigo foram considerados, sendo excluídos revisões, resumos de congressos e outras categorias. Em seguida, classificamos se o estudo foi realizado em campo, cativeiro ou com dados secundários. Apenas estudos realizados em campo, ou em campo com complementação de dados secundários, foram incluídos. Trabalhos conduzidos em cativeiro ou baseados apenas em dados secundários não entraram para coleta de dados.

Através da leitura completa dos artigos selecionados, foram coletadas as seguintes informações, quando disponíveis: data inicial e final da pesquisa, duração do estudo, local (nome, estado e país), coordenadas geográficas, tipo e tamanho da área estudada, atributos medidos dos primatas, métodos utilizados para medir os atributos, resultado do atributo medido e esforço amostral. Quando as coordenadas geográficas não estavam disponíveis no artigo, essas foram obtidas em outros artigos em que o local de estudo foi o mesmo ou com auxílio do Google Maps. Para as espécies de primatas, sobreposamos as coordenadas geográficas dos locais onde os estudos foram realizados com as distribuições geográficas das espécies (IUCN).

Resultados e Discussões

Após a busca sistemática, foram inicialmente identificados 642 artigos relacionados a *Callicebinae*. Após a triagem, foram mantidos 73 artigos da área de ecologia. Textos sobre comportamento (162), genética (55), morfologia (30), conservação (29), história natural (27), filogenia (22), endocrinologia (20), neurociência (18), pesquisa médica (16), biogeografia (15), taxonomia (14), parasitologia (13), anatomia (12), epidemiologia (10), dieta (8), lista de espécies (7), biologia reprodutiva (6), farmacologia (6), imunologia (6), fisiologia (5), método (5), veterinária (5), antropologia (4), cognitivo (4), evolução (3), ontogenia (3), bactéria (2), comunicação (2), etnografia (2), patologia (2), acústica (1), bioquímica (1), etologia (1), resumos de congresso (108), artigos de revisão (18), capítulos de livros (18), resumos de congressos (13), nota (12), *editorial material* (4), *data paper* (1), revisão de livro (1) não foram considerados. No total, 744 estudos foram excluídos, seja por se enquadrarem em um desses critérios ou em mais de um deles.

Apenas 23,1% das espécies da subfamília *Callicebinae* contam com estudos de campo e ecologia, enquanto 76,9% permanecem sem informação sobre ecologia (Figura 1). Entre as

espécies sem nenhum estudo de ecologia registrado destacam-se *Callicebus caligatus*, *C. pallescens*, *C. hoffmannsii*, *C. mollach*, *C. bernhardi*, *C. caligatus*, *C. toppini*, *C. modestus*, *Cheracebus spp.*, *Plecturocebus parecis*, *P. byrne*, *P. baptista*, *P. bernhardi*, *P. brunneus*, *P. cupreus*, *P. vieirai*, *P. donacophilus*. Entre as espécies com registro em estudos de ecologia destacam-se *Callicebus barbarabrownae*, *C. brunneus*, *C. coimbrai*, *C. cupreus*, *C. discolor*, *C. donacophilus*, *C. lucifer*, *C. melanochir*, *C. moloch*, *C. nigrifrons*, *C. nigrinus*, *C. oenanthe*, *C. ornatus*, *C. personatus*, *C. personatus melanochir*, *C. torquatus*, *Cheracebus purinus*, *Plecturocebus acreanus*, *P. caquetensis*, *P. discolor*, *P. modestus*, *P. moloch*, *P. oenanthe*, *P. olallae*, *P. ornatus*, *P. toppini*. Algumas espécies que permanecem sem estudos de ecologia estão classificadas em algum grau de ameaça pela IUCN. A falta de estudos ecológicos para essas espécies compromete tanto sua avaliação de risco quanto a elaboração de planos de conservação direcionados. A concentração dos estudos em campo está no Brasil, principalmente no Nordeste, Peru e Colômbia (Figura 2). A concentração de dados em algumas espécies, como *Callicebus coimbrai* por exemplo, reflete um viés geográfico para áreas de maior acessibilidade, altas densidades populacionais, localização de centros de pesquisa e pesquisadores. Muitas espécies da região amazônica permanecem com nenhum ou poucos estudos e negligenciadas, reforçando a necessidade de ampliar os esforços de pesquisa para estas populações pouco estudadas. Em geral, grande parte da área da distribuição das espécies da subfamília *Callicebinae* carece de estudos de ecologia e campo.

As espécies que tiveram dados de densidade coletados foram *C. barbarabrownae*, *C. brunneus*, *C. coimbrai*, *C. cupreus*, *C. discolor*, *C. donacophilus*, *C. lucifer*, *C. nigrifrons*, *C. nigrinus*, *C. oenanthe*, *C. personatus*, *C. personatus melanochir*, *C. torquatus*, *P. caquetensis*, *P. discolor*, *P. modestus*, *P. olallae*, *P. ornatus*. Estudos com densidade populacional são metodologicamente mais exigentes, necessitando de grande esforço amostral e acompanhamento contínuo (Peres, 1997; Chiarello, 2008). Ainda assim, tais informações são fundamentais para avaliar o status de conservação das espécies. Sem dados consistentes de densidade e área de uso, por exemplo, torna-se difícil modelar viabilidade populacional e prever impactos de fragmentação. A densidade de indivíduos oscilou entre 0,24 – 16,3 (mín–máx) indivíduos/km² para a subfamília *Callicebinae* (Figura 3). Essa amplitude sugere influência de fatores locais, como qualidade do habitat, disponibilidade de recursos e intensidade de pressão antrópica, ou mesmo fatores regionais, como disponibilidade de habitat e conectividade da paisagem. Para os estudos que forneceram dados de home range, ele variou entre 6,5 - 967 ha. O tamanho do grupo oscilou entre 2,58 - 38 grupos e a densidade de grupos oscilou entre 0,9 – 16,5 grupos/km².

Das informações coletadas dos estudos de ecologia, tiveram mais dados de ocorrência (121 informações), comportamento (118) e dieta (111), do que dados de uso de habitat (39), modelagem (36), home range (19), avistamento (18), vocalização (13) e história de vida (11), apresentando menor representatividade (Figura 4). Esse padrão reflete uma tendência já observada em pesquisas de primatologia, em que informações iniciais e de maior facilidade de obtenção, como registros de presença e dados comportamentais diretos, são mais abundantes, em contraste com estimativas populacionais, estudos de uso espacial ou parâmetros de história natural, que demandam maior esforço amostral e metodologias específicas (Strier 2017, Strier 2018).

Conclusão

A análise da literatura evidencia lacunas no conhecimento ecológico da subfamília *Callicebinae*, com apenas 21,1% das espécies estudadas em campo. Há um viés geográfico, com maior concentração de pesquisas em áreas de fácil acesso, enquanto regiões amazônicas

permanecem subamostradas. Os dados disponíveis mostram variação em densidade populacional de 0,24–16,3 indivíduos/km² e home range (6,5–967 ha), possivelmente influenciados por qualidade do habitat, recursos e pressão antrópica. Estudos de densidade e uso do espaço, são fundamentais para avaliação do risco de extinção e planejamento de conservação. A expansão de pesquisas de campo é essencial para fornecer dados ecológicos para a elaboração de estratégias de conservação mais eficazes para a subfamília além de abranger lacunas de conhecimento sobre a ecologia dessas espécies.

Apresentamos aqui alguns resultados preliminares, pois esse estudo está em desenvolvimento. Revistas especializadas (e não indexadas) da área serão incluídas. Tentaremos compreender como a amplitude dos valores dos atributos ecológicos estão relacionados com o contexto local do estudo (ex. região de maior cobertura florestal), ou com o gênero estudado.

Referências

- Adret, P., Dingess, K., Caselli, C., et al. Duetting Patterns of Titi Monkeys (Primates, Pitheciidae: Callicebinae) and Relationships with Phylogeny. *Animals*, v. 8, n. 10, p. 178, 2018.
- Andresen, E., Arroyo-Rodríguez, V., Ramos-Robles, M. Primate Seed Dispersal: Old and New Challenges. *International Journal of Primatology*, v. 39, n. 3, p. 443–465, 2018.
- Auricchio, P. A morphological analysis of some species of Callicebus, Thomas, 1903 (Pitheciidae - Callicebinae). *Neotropical Primates*, v. 17, n. 2, p. 47–58, 2010.
- Bicca-Marques, J. C., Heymann, E. W. Ecology and behavior of titi monkeys (genus Callicebus). *Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uacaris*. Cambridge University Press, p. 196–207, 2013.
- Capman, C. A., Peres, C. A. Primate conservation in the new millennium: The role of scientists. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, v. 10, n. 1, p. 16–33, 2001.
- Chiarello, A. G. Density and Population Size of Mammals in Remnants of Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology*, v. 14, n. 6, p. 1649–1657, 2000.
- Deluycker, A. M. Insect Prey Foraging Strategies in Callicebus oenanthe in Northern Peru. *American Journal of Primatology*, v. 74, n. 5, p. 450–461, 2012.
- Estrada, A., Garber, P. A., Chaudhary, A. Current and future trends in socio-economic, demographic and governance factors affecting global primate conservation. *PeerJ*, v. 8, p. e9816, 2020.
- Estrada, A., Garber, P. A., Rylands, A. B., et al. Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Science Advances*, v. 3, n. 1, 2017.
- Estrada, G. R., Marshall, A. J. Terrestriality across the primate order: A review and analysis of ground use in primates. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, v. 33, n. 4, 2024.

Fernández, D., Kerhoas, D., Dempsey, A., et al. The Current Status of the World's Primates: Mapping Threats to Understand Priorities for Primate Conservation. *International Journal of Primatology*, v. 43, n. 1, p. 15–39, 2021.

Gouveia, S. F., Villalobos, F., Dobrovolski, R., et al. Forest structure drives global diversity of primates. *Journal of Animal Ecology*, v. 83, n. 6, p. 1523–1530, 2014.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em:
<<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 29 Aug. 2025.

Norconk, M. A., Grafton, B. W., Conklin-Brittain, N. L. Seed dispersal by neotropical seed predators. *American Journal of Primatology*, v. 45, n. 1, p. 103–126, 1998.

Peres, C. A. Primate community structure at twenty western Amazonian flooded and unflooded forests. *Journal of Tropical Ecology*, v. 13, n. 3, p. 381–405, 1997.

Smith, R. J., Jungers, W. L. Body mass in comparative primatology. *Journal of Human Evolution*, v. 32, n. 6, p. 523–559, 1997.

Souza-Alves, J. P., Boyle, S. A., Barnett, A. A. Knowledge shortfalls for titi monkey: A poorly known clade of small-bodied South American primates. *Biological Conservation*, v. 286, p. 110256, 2023.

Strier, K. B. Primate social behavior. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 165, n. 4, p. 801–812, 2018.

Strier, K. B. Behavioral Ecology, Primate. *The International Encyclopedia of Anthropology*, 2017.

Wright, P. C. Callicebus in Manu National Park: territory, resources, scent marking and vocalizations. *Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uacaris*. Cambridge University Press, p. 232–239, 2013.

Anexos

Figura 1. Proporção de espécies de Callicebinae que foram alvos de ao menos um estudo em ecologia, e proporção de espécies que não foram alvo de nenhum estudo.

Figura 2. Distribuição espacial dos estudos sobre ecologia das espécies de Callicebinae.

Figura 3. Variação da densidade populacional (indivíduos/km²), densidade de grupos (grupos/km²), tamanho do grupo (indivíduos) e home range (ha).

Figura 4. Distribuição do número de informações coletadas dos 73 estudos de ecologia para Callicebinae.

CÓDIGO: SB1340

AUTOR: ANA CLARA COSTA DA SILVA

ORIENTADOR: SIMONE ALMEIDA GAVILAN

TÍTULO: Técnicas de retirada e análise macroscópica de bulas timpânicas

Resumo

Baleias (Mysticeti) e Golfinhos (Odontoceti) são mamíferos marinhos pertencentes à Ordem Cetacea. De acordo com a IUCN, dentre as espécies vivas de cetáceos, mais da metade estão em um estado de conservação preocupante. Isso se dá diante das várias ameaças à Ordem, destacando a poluição sonora ocasionada por diferentes fontes, como o tráfego de navios turísticos, explosões e pesquisas sísmicas, que podem ocasionar impactos comportamentais, fisiológicos e acústicos diversos, o que leva a sérios danos ao aparato auditivo do animal, podendo, inclusive, levar ao óbito do animal. Assim, estudar os possíveis impactos da superexposição de cetáceos à ruídos subaquáticos antropogênicos tem sido uma medida relevante para a conservação das espécies marinhas. Torna-se necessário descrever a morfologia aparato auditivo de cetáceos, avaliando possíveis lesões na cóclea ocasionadas pelos ruídos subaquáticos, através da retirada e análise macroscópica das bulas timpânicas. Desse modo, este trabalho visa descrever as técnicas de retirada e análise macroscópica de bulas timpânicas de Odontocetos, para posterior descrição morfológica do aparato auditivo de cetáceos, avaliando, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da cóclea, possíveis lesões decorrentes de ruídos subaquáticos. As amostras foram obtidas de animais encalhados no litoral Potiguar. As etapas metodológicas incluíram resgate, necropsias, perfusão, fixação e descalcificação do aparato auditivo.

Palavras-chave: Aparato auditivo. Sísmica. Golfinhos. Encalhe.

TITLE: Techniques for removal and macroscopic analysis of tympanic bulla

Abstract

Whales (Mysticeti) and Dolphins (Odontoceti) are marine mammals belonging to the Order Cetacea. According to the IUCN, more than half of the living cetacean species are in a state of concern. This is due to the various threats to the Order, notably noise pollution from various sources, such as tourist vessel traffic, explosions, and seismic surveys, which can cause various behavioral, physiological, and acoustic impacts, leading to serious damage to the animal's auditory system and even death. Therefore, studying the potential impacts of overexposure of cetaceans to anthropogenic underwater noise has been a relevant measure for the conservation of marine species. It is necessary to describe the morphology of the auditory system of cetaceans, evaluating possible cochlear injuries caused by underwater noise through the removal and macroscopic analysis of the tympanic bullae. Therefore, this study aims to describe the techniques for removing and macroscopically analyzing tympanic bullae from odontocetes, allowing for subsequent morphological

description of the cetacean auditory apparatus. Scanning electron microscopy (SEM) of the cochlea assessed potential injuries resulting from underwater noise. Samples were obtained from stranded animals on the coast of Rio Grande do Norte. The methodological steps included rescue, necropsy, perfusion, fixation, and decalcification of the auditory apparatus.

Keywords: Hearing apparatus. Seismic. Dolphins. Stranding.

Introdução

Os cetáceos são um grupo de mamíferos marinhos formado por baleias e golfinhos, que se classificam em Mysticeti e Odontoceti, respectivamente. Atualmente, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) contabiliza 89 espécies de cetáceos vivos, sendo registrado no Brasil, 8 espécies de baleias (Mysticeti) e 38 espécies de golfinhos (Odontoceti). Dentre as espécies vivas de cetáceos, mais da metade estão num estado de conservação preocupante, de acordo com a mesma instituição, o que reforça a necessidade de estudos voltados à conservação dessas espécies.

Estes animais utilizam o som para diversos fins, como reprodução, interação com o grupo e com seus filhotes, na percepção do ambiente e procura de alimentos, o que os torna particularmente sensíveis à poluição sonora. Nesse sentido, o aumento de atividades humanas no mar, incluindo o tráfego de navios turísticos, explosões e pesquisas sísmicas, tem representado uma ameaça significativa ao grupo, pois a poluição sonora pode gerar diversas respostas comportamentais, fisiológicas ou acústicas nos cetáceos, causando sérios danos e podendo levar, inclusive, o animal à morte, contribuindo para o declínio populacional. Portanto, estudar os possíveis impactos da superexposição de cetáceos à ruídos subaquáticos antropogênicos tem sido uma medida relevante para a conservação das espécies marinhas. Tendo isso em vista, este trabalho tem o intuito de descrever as técnicas de retirada e análise macroscópica de bulas timpânicas de Odontocetos, para posterior descrição morfológica do aparato auditivo de cetáceos, avaliando, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da cóclea, possíveis lesões decorrentes de ruídos subaquáticos.

Metodologia

O projeto foi desenvolvido com amostras de bulas timpânicas coletadas de odontocetos encalhados, mortos ou que vierem à óbito durante a reabilitação, registrados em monitoramento de praias no Rio Grande do Norte. A obtenção desse material e dados foi possível mediante a parceria institucional existente entre o Laboratório de Morfofisiologia de Vertebrados da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e o Projeto Cetáceos da Costa Branca e CEMAM (Centro de Estudos e Monitoramento Ambiental).

Necropsias

No momento de registro do encalhe, é realizada a avaliação do estado do animal, sendo classificados em: animais vivos (código 1); animais mortos com órgãos

intactos (código 2); animais mortos com órgãos em estágio inicial de decomposição (código 3); animais mortos em estágio avançado de decomposição (código 4) e animais mortos em estágio mumificado ou de restos (código 5). Foram realizadas necropsias dos animais que encalharam no litoral oriental potiguar, em carcaças com código 3, no Museu de Ciências Morfológicas da UFRN. Destaca-se que as necropsias foram em até 6 horas pós óbito, de forma a não prejudicar a qualidade da amostra (Corrêa, 2020).

Durante a necropsia, o aparato auditivo foi retirado seguindo o protocolo descrito por Ketten (2007). Após removido, o aparato auditivo foi perfundido com formalina tamponada neutra a 10%, através das janelas redonda e oval, e submersa no fixador de acordo com o protocolo descrito por Morell (2017). Para o processo de descalcificação foi usado 14% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) hidrato de sal tetrassódico com valor de pH 7,4 em temperatura ambiente (Morell, 2017), o qual atua descalcificando o osso periótico ao redor da cóclea. A duração total do processo de descalcificação variou conforme o tamanho e densidade do osso periótico, que é diferente para cada espécie de cetáceo.

Resultados e Discussões

Durante a execução do projeto foram acompanhadas a realização de 12 necropsias de indivíduos de odontocetos, pertencentes a sete espécies: *Stenella clymene* (n=2), *Peponocephala electra* (n=2), *Stenella longirostris* (n=1), *Sotalia guianensis* (n=3), *Globicephala macrorhynchus* (n=2), *Tursiops truncatus* (n=1) e *Kogia* sp. (n=1) (Tabela 1). A diversidade de espécies obtidas reflete a representatividade dos encalhes registrados na costa do Rio Grande do Norte.

A perfusão deve ser idealmente realizada até as primeiras 6 horas pós óbito do animal. A principal via de eleição para perfusão é a carótida, com o isolamento do retorno para demais vasos e coração. Esse vaso pode ser canulado ainda no arco aórtico, próximo à base cardíaca ou ao longo de seu trajeto, próximo à tireoide (Ketten, 2007) (Figura 01).

Pré-perfusão: Após canulada, deve ser realizada a perfusão salina (NaCl 0,9%) lenta para a lavagem dos vasos até que o fluido retornado da cabeça pelas jugulares esteja límpido e transparente.

Perfusão: Evitando a entrada de bolhas no momento de troca da solução salina para o fixador, deve-se administrar paraformaldeído 4% no mesmo acesso da etapa anterior (figura 01). Ao serem perfundidos, os tecidos da região cranial irão tornar-se mais rígidos e pode haver extravasamento do fixador pelos olhos, o que é um dos sinais de que os órgãos já foram devidamente fixados. O odor forte de paraformaldeído durante a retirada do encéfalo também confirma a qualidade da perfusão.

Extração: Inicialmente é feita a retirada da cabeça na região do atlas. Posteriormente, é realizada a retirada da pele, músculos e tecidos adjacentes ao crânio para exposição óssea. Em seguida, é feita a realização de uma incisão com uma serra manual (tipo Starret) ou elétrica em um plano coronal em região posterior ao zigomático, local onde a espessura é menor, de uma ponta a outra da cabeça

(Figura 1). É necessário realizar um segundo corte com serra, dessa vez transversal nos côndilos occipitais, abaixo do forame magno, de modo a acessar o cerebelo. Após isso, divulsionar as meninges e cortar os nervos cranianos para realizar o desprendimento e retirada total do encéfalo (Figura 2). Essa etapa pode ser feita com tesouras romba romba e bisturis, como também com a mão do responsável em forma de concha para maior delicadeza e precisão, principalmente de tecidos mais facilmente rompidos. Por fim, permanecer com o encéfalo submerso em paraformaldeído.

A técnica de retirada das bulas foi realizada através da orientação descrita por Ketten (2007) (figura 03).

Conclusão

A técnica de retirada e análise macroscópica de bulas timpânicas de Odontocetos, para posterior descrição morfológica do aparato auditivo de cetáceos e análise por microscopia eletrônica de varredura do complexo tímpano-periótico, constitui-se como eficiente para avaliar os efeitos da poluição sonora nos cetáceos. O desenvolvimento deste projeto permitiu a execução de necropsias e posterior retirada das bulas timpânicas, propiciando a ampliação da técnica de retirada para diferentes espécies de golfinhos. Dessa forma, promoveu a possibilidade de fornecer subsídios técnicos e científicos para o monitoramento e conservação das espécies marinhas estudadas, além da ampliação da capacidade de diagnóstico dos impactos antropogênicos sobre a fauna marinha.

Referências

MORELL, M., et al. Shadwick, R.E.; André, M. Implementation of a method to visualize noise induced hearing loss in mass stranded cetaceans. Scientific Reports 7, 41848, 2017.

KETTEN, D. R.; CRAMER, S. R.; ARRUDA, J. J. A Manual for the Removal, Fixation and Preservation of Cetacean Ears. Woods Hole Oceanographic Institution: Woods Hole. 2007.

SILVA, F.J.L.; FARIAS, D.S.D.; BOMFIM, A.C.; GAVILAN, S.A.; ATTADEMO, F.L.N.; FRAGOSO, A.B.L.; REVÔREDO, R.A.; CAVALCANTE, R.M.S.; LUNA, F.O. (Orgs). 2020. Protocolo sobre diagnóstico dos efeitos da pesquisa sísmica em mamíferos aquáticos. Brasília: ICMBio.63 p.

CORRÊA, Gabriela Colombini. Morfologia do complexo tímpano-periótico de cetáceos.Orientador: Simone Almeida Gavilan. 2020. Dissertação(Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

Anexos

Figura 01 - Em A e B: possível local de acesso da carótida para perfusão; em C e D: retirada da cabeça e em E: Retirada de pele, músculos e tecidos adjacentes ao crânio para exposição óssea

Figura 02 - Exemplos de incisão para extração do encéfalo completo

Figura 03 - Ossos perióticos esquerdo e direito de *Kogia breviceps*

Tabela 01 - Espécies necropsiadas e números de indivíduos de cada espécie

CÓDIGO: SB1342

AUTOR: ANA BEATRIZ OLIVEIRA DINIZ

COAUTOR: LORENA KETLYN DA SILVA DANTAS

ORIENTADOR: JANE CARLA DE SOUZA

TÍTULO: CONHECIMENTOS E PRÁTICAS SOBRE SONO DE MÉDICOS DA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE

Resumo

INTRODUÇÃO: Conhecer sobre sono na Atenção Primária à Saúde (APS) é de suma importância para profissionais que atendem usuários com essas demandas. **OBJETIVO:** Avaliar conhecimentos sobre o ciclo sono/vigília, transtornos do sono e sua aplicação na prática de médicos da APS da 5ª URSAP. **MÉTODO:** Estudo exploratório-descritivo, realizado por meio de entrevista com profissionais médicos da 5ª URSAP em 9 municípios. **RESULTADOS:** Participaram 15 médicos. Na autoavaliação, 80% atribuíram notas 5 a 7 e 20% nota 8 ao conhecimento sobre sono, tendo a graduação como principal fonte. Quanto à higiene do sono, 80% relataram conhecer, 87% aplicam em sua rotina e 100% orientam pacientes. Todos os médicos questionam sobre duração, qualidade e hábitos do sono dos usuários. No questionário “A Saúde e o Sono”, houve acertos significativos em “Influência da luz sobre o sono”, “Consequências da privação do sono” e uma redução de acertos em “Duração do sono”. No ASKME, o domínio com mais assertivas foi “Insônia”, porém, apresentou-se erros significativos em “Arquitetura do sono” e “Ritmo Circadiano”. **CONCLUSÃO:** Apesar de reconhecerem a relevância do tema e aplicá-lo, há discrepância entre autopercepção e domínio técnico, reforçando a necessidade de inclusão do tema na graduação e em formações continuadas.

Palavras-chave: Educação em Saúde. Distúrbios do Sono. Médicos. Educação Permanente

TITLE: KNOWLEDGE AND PRACTICES ABOUT SLEEP AMONG PRIMARY HEALTH CARE PHYSICIANS

Abstract

Introduction: Knowledge about sleep in Primary Health Care (PHC) is essential for professionals who assist users with related demands. **Objective:** To assess knowledge of the sleep-wake cycle, sleep disorders, and their application in the practice of PHC physicians from the 5th URSAP. **Method:** Exploratory-descriptive study conducted through interviews with physicians from the 5th URSAP across nine municipalities. **Results:** Fifteen physicians participated. In self-assessment, 80% rated their knowledge between 5 and 7, and 20% rated it as 8, with undergraduate training as the main source. Regarding sleep hygiene, 80% reported knowing it, 87% applied it in daily practice, and 100% guided patients. All

physicians inquired about sleep duration, quality, and habits. In the “Health and Sleep” questionnaire, significant correct answers were observed in “Influence of light on sleep” and “Consequences of sleep deprivation,” but fewer in “Sleep duration.” In the ASKME, the domain with the highest number of correct answers was “Insomnia,” while “Sleep architecture” and “Circadian rhythm” showed significant errors. Conclusion: Although physicians recognize the relevance of sleep and apply it in practice, there is a discrepancy between self-perception and technical knowledge, highlighting the need to include this topic in undergraduate training and continuing education programs.

Keywords: Health Education. Sleep Disorders. Physicians. Education, Continuing

Introdução

O sono constitui um processo fisiológico caracterizado pela diminuição do nível de consciência, redução da atividade dos músculos esqueléticos e lentificação das funções metabólicas. Esse estado alterna-se ciclicamente com a vigília, ao qual é compreendida como a condição de alerta do organismo, proporcionando um controle consciente das atividades, do comportamento e das funções cognitivas. Dessa forma, a sucessão rítmica entre sono e vigília compõe o ciclo sono-vigília (CSV), cuja geração e regulação dependem de um sistema de temporização biológica, marcado por uma ritmicidade intrínseca ao corpo humano (Magalhães; Mataruna, 2007; Vetter, 2018).

O ciclo sono-vigília é um ritmo circadiano que em condições naturais apresenta sincronização com fatores ambientais e oscila com um período de 24 horas. Além dessa sincronização ambiental, esse ciclo é gerado e regulado endogenamente por uma estrutura neural localizada no hipotálamo que é o núcleo supraquiasmático (NSQ), considerado o relógio biológico para os mamíferos (Aschoff, 1979).

Somado a isso, a privação do sono acarreta alterações significativas no funcionamento físico, ocupacional, cognitivo e social do indivíduo, além de comprometer substancialmente a qualidade de vida (Jansen JM, et al., 2007). Distúrbios advindos do sono acontecem quando sua duração e qualidade são alterados, o que tem sido associado a doenças crônicas e à morbimortalidade, além de ser fator influenciador nas relações sociais (Tomfohr LM et al., 2015; Wu W et al., 2018).

A má qualidade de sono, na contemporaneidade, decorre de rápidas transformações econômicas e sociais, dentre elas: eventos de estresse, trabalhos em horários prolongados, refeição irregular, sedentarismo, hábitos de fumar, ingestão de bebida alcoólica e doenças crônicas (Luyster FS et al., 2012; Wang S et al., 2017).

Concomitantemente, apesar do sono ser frequentemente investigado na população (Youngstedt et al., 2016; Zomers et al., 2017; Luyster et al., 2012), as iniciativas dos serviços de saúde voltadas para sua promoção, prevenção e tratamento ainda são negligenciadas. No contexto brasileiro, a maior parte das demandas relacionadas à saúde, incluindo queixas sobre o sono, são acolhidas pela Atenção Primária à Saúde (APS), principal porta de entrada do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2017). No entanto, a produção científica que investiga o nível de conhecimento dos médicos da APS sobre os transtornos e alterações do sono é limitada, o que evidencia uma lacuna relevante a ser explorada.

Desse modo, é necessário enfatizar a importância da atualização dos conhecimentos dos profissionais de saúde de maneira constante, principalmente no tocante aos problemas e

distúrbios do sono (Basheti et al., 2021), visto que, a literatura tem apontado que ao longo de um período de 20 anos, metade dos adultos não apresentaram duração de sono satisfatória, e um sexto manifestou hipersonia (Zomers ML et al., 2017).

Diante desse contexto, o presente estudo possui como objetivo avaliar os conhecimentos sobre o ciclo sono/vigília e transtornos do sono e aplicação desses conhecimentos no campo de trabalho em médicos da atenção primária à saúde no contexto da 5ª URSAP.

Metodologia

Trata-se de um estudo exploratório-descritivo, desenvolvido nos municípios que fazem parte 5ª URSAP, sendo eles: Santa Cruz, Japi, Jaçanã, Sítio Novo, Coronel Ezequiel, Tangará, São Paulo do Potengi, Barcelona e São Tomé.

A população deste estudo foi composta por médicos atuantes na Atenção Primária à Saúde (APS), vinculados à 5ª Unidade Regional de Saúde Pública (URSAP) do Estado do Rio Grande do Norte. Nos municípios selecionados para esta análise, a população de profissionais da APS é composta por 72 indivíduos, aos quais 15 são profissionais médicos. Desse modo, a amostra do estudo corresponde à totalidade de médicos participantes, visto que, os dados estavam presentes no banco de pesquisa original e atendiam aos critérios para participação da pesquisa. Indivíduos que exerciam apenas funções administrativas ou de gestão foram excluídos, pois, não se enquadram no perfil de atuação clínica necessária a análise proposta.

Foram incluídos no presente estudo médicos da APS, atuantes nos municípios pertencentes à 5ª URSAP que participaram da coleta de dados, são eles: Santa Cruz, Japi, Jaçanã, Sítio Novo, Coronel Ezequiel, Tangará, São Paulo do Potengi, Barcelona e São Tomé. Os participantes deveriam ter idade mínima de 18 anos, estar em atividade profissional durante o período que foi realizado a coleta de dados e ter consentido com a participação na pesquisa original por meio do Registro de Consentimento Livre e Esclarecido (RCLE) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foi adotado como critério de exclusão os médicos que não completaram integralmente o preenchimento dos instrumentos de pesquisa.

O presente estudo configura-se como uma análise secundária de dados, caracterizando-se como uma continuidade vinculada à dissertação de mestrado em Saúde Coletiva intitulada “Avaliação de Conhecimentos e Práticas dos Profissionais da Atenção Primária à Saúde Sobre Sono”, desenvolvida por Amanda Samara dos Santos Araújo, finalizada no ano de 2024. A pesquisa original teve aprovação do Comitê de Ética sob parecer nº 5.817.668, e todos os dados foram coletados conforme os princípios éticos vigentes.

A coleta do referido estudo foi realizada por meio da aplicação de um formulário semiestruturado, composto por dois módulos. O primeiro módulo abordava os dados pessoais e profissionais dos participantes como: idade, sexo, tempo de atuação na APS, formação, município de trabalho e outros (APÊNDICE A). O segundo módulo investigava os conhecimentos sobre o sono, incluindo itens extraídos e adaptados dos instrumentos intitulados “A Saúde e o Sono” (APÊNDICE B) e ASKME (Assessment of Sleep Knowledge in Medical Education) (APÊNDICE C).

A aplicação desses itens ocorreu de duas formas: visitas presenciais às Unidades Básicas de Saúde (UBS) dos municípios incluídos no estudo e com entrevistas remotas via chamada de vídeo pela plataforma digital Google Meet, de acordo com as disponibilidades dos

profissionais. O convite para participar da pesquisa foi articulado com os coordenadores das UBS, secretários municipais de saúde das respectivas cidades e com o apoio da gerência da 5ª URSAP, que autorizou e reforçou a divulgação da pesquisa nos municípios da região. O tempo médio de preenchimento do formulário foi de aproximadamente de 20 a 30 minutos.

A análise dos dados foi realizada inicialmente por meio da organização das informações em planilha eletrônica no software Microsoft Excel, a partir do banco de dados original. As variáveis foram classificadas em sociodemográficas (sexo e raça/cor), formação acadêmica e profissional (nível de escolaridade e tempo de atuação na APS) e variáveis específicas relacionadas ao conhecimento sobre sono. Para as variáveis categóricas, aplicou-se estatística descritiva por meio de distribuição absoluta e relativa de frequências, expressas em números absolutos e percentuais. As variáveis numéricas foram analisadas por meio de medidas de tendência central e dispersão. Os resultados foram organizados em tabelas, de forma a facilitar a interpretação e visualização dos achados. Ressalta-se que, por se tratar de análise secundária, não houve aplicação de testes inferenciais, limitando-se a exploração descritiva dos dados.

A utilização dos dados nesta análise secundária não implicou em riscos adicionais aos participantes, visto que os dados utilizados foram anonimizados e armazenados de forma segura, garantindo o sigilo e a confidencialidade das informações. Entre os benefícios da pesquisa, destaca-se a contribuição para o aprofundamento do conhecimento científico sobre a temática do sono na prática médica da Atenção Primária à Saúde, podendo subsidiar futuras ações de educação permanente e aprimoramento da qualidade do cuidado.

O estudo original foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi – FACISA/UFRN, sob o parecer nº 5.817.668 e CAAE nº 64869122.0.0000.5568, em conformidade com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos

Resultados e Discussões

A amostra foi composta por 15 médicos da Atenção Primária à Saúde (APS) atuantes na 5ª Unidade Regional de Saúde Pública (URSAP) do Rio Grande do Norte. Dentre os participantes, 60% são do sexo feminino e se autodeclararam de cor branca. O nível de maior escolaridade entre os profissionais é a graduação (60%), seguida pela pós-graduação (40%). A média de atuação desses profissionais na Unidade Básica de Saúde foi de $16,86 \pm 29,52$ meses.

Na autoavaliação do nível de conhecimento sobre o sono em uma escala de 0 a 10, cerca de 80% dos entrevistados atribuíram notas entre 5 e 7, enquanto 20% avaliaram seu conhecimento com a nota 8. A principal fonte de informação utilizada pelos médicos para adquirir conhecimento sobre o sono foi o curso de graduação, representando 35,14% das respostas. Em seguida, destacam-se os artigos científicos (21,62%) e as mídias digitais (16,22%). Apenas 2,70% mencionaram os cadernos de atenção básica do Ministério da Saúde como fonte de conhecimento.

Ao serem questionados sobre o conhecimento a respeito da higiene do sono, 80% dos médicos afirmaram ter conhecimento sobre o tema. Entre aqueles que possuem conhecimento sobre hábitos de sono saudáveis, 87% utilizam essas informações em sua própria rotina de

vida. Por conseguinte, 100% dos participantes afirmaram utilizar esse conhecimento para orientar os usuários da APS. Conquanto, nenhum dos médicos declarou lecionar palestras ou cursos de formação sobre o assunto.

Ao analisar a prática profissional, nota-se que 100% dos médicos questionam os pacientes sobre a duração do sono e a qualidade do sono. 93% dos médicos também questiona sobre sonolência diurna, com 36% fazendo isso sempre e 57% às vezes. Relacionado aos hábitos antes de dormir, todos os entrevistados realizam esse questionamento, dentre eles, 33% sempre perguntam sobre esses hábitos, enquanto 67% o fazem às vezes.

Quanto aos horários de dormir e acordar, 100% dos profissionais alegam realizar esse questionamento ao atender seus pacientes, sendo que 33% realiza sempre essa indagação e 67% só às vezes. Dos entrevistados, em suas consultas todos questionam sobre distúrbios do sono. Desses, 47% perguntam sempre e 53% o fazem às vezes. Por fim, 27% dos médicos afirmaram ter lido os cadernos do Ministério da Saúde sobre a importância de questionar os pacientes a respeito do sono.

Ao analisar as respostas dos entrevistados ao questionário “A Saúde e o Sono”, sendo este separado por 7 categorias, nota-se que na categoria 1, denominada “Consequências da Privação do sono”, composta pelas afirmativas K, M, O e Q, obteve o segundo melhor índice de acertos, possuindo um nível de 97% de acertos e uma média de 14,5. Essa categoria ficou abaixo da categoria 7, ao qual denomina-se “Influência da Luz sobre o horário de sono”, composta pela afirmativa S, atingindo 100% dos acertos (Figura 1).

Na categoria 4, nomeada “Importância do Cochilo” e que possui uma única afirmativa, sendo ela representada pela letra H, foi respondida corretamente por 73% dos participantes. Concomitantemente, a categoria 5, denominada “Substâncias e atividades que influenciam o sono” representada pelas afirmativas A, C, F, e J, foi respondida de forma correta por 90% dos participantes. Sendo a afirmativa “Comer muito antes de dormir nos faz acordar muitas vezes durante a noite” a que obteve mais erro por parte dos participantes, totalizando em 67% de erro (Figura 1).

Na sequência, a categoria 6 intitulada “Duração do sono” e composta pelas letras B, G, R, T e V, possuiu o menor percentual de acertos, totalizando em 52%, com uma média de 7,8. A afirmativa “Podemos compensar uma redução na quantidade de sono dormindo mais na noite seguinte” e “Adultos devem dormir cerca de 8 horas por noite” foram as que tiveram os índices significativos de erro, sendo 93% e 80%, respectivamente (Figura 1).

Outrossim, os médicos também responderam o questionário ASKME, composto por 8 domínios, sendo eles: “Princípios básicos”, “Arquitetura do sono”, “Insônia”, “Princípios do Ritmo Circadiano”, “Narcolepsia”, “Parassonia”, “Distúrbio Respiratório do Sono” e “Efeito das Drogas/Álcool sobre o sono”, respectivamente (Figura 2).

Com relação aos dados que chamam atenção, encontra-se no domínio 2, representado pelas afirmativas 3, 10 e 13, a questão “Sono de ondas lentas é mais proeminente na segunda metade da noite” com o segundo maior índice de erro do questionário, somando em 87%, ficando atrás para a afirmativa “Pré-adolescente, que tem problemas regulares para dormir durante a noite, deveria poder dormir até mais tarde pela manhã”, do domínio 4, totalizando em 93% de erro (Figura 2).

O domínio 3, composto pelas questões 6, 15 e 16, foi o que obteve a maior taxa de acerto entre os entrevistados, ganhando destaque a afirmativa “A hiperatividade em crianças pode ser exacerbada pelo sono inadequado”, ao qual teve 93% de acertos (Figura 2).

Outro domínio que chamou a atenção quanto aos seus índices foi o domínio 5, ao qual é formado pelas afirmativas 8 e 29, sendo ele o domínio com a segunda menor média de acertos (5,5). Ficando abaixo apenas do domínio 2, que obteve uma média de 5,3 de acertos (Figura 2).

Assim, os resultados evidenciam que os médicos da Atenção Primária apresentam conhecimento satisfatório em alguns aspectos relacionados ao sono e sua higiene, porém demonstram fragilidades em domínios específicos, principalmente naqueles relacionados à fisiologia do sono.

A análise dos resultados deste estudo releva uma dicotomia importante: enquanto os profissionais demonstram autoconfiança em seu conhecimento sobre o tema e o aplicam em suas rotinas e orientações, persistem lacunas significativas em áreas técnicas e específicas. Em geral, estes resultados podem representar uma deficiência no nível de conhecimento diante do esperado para profissionais da saúde, tendo em vista que os problemas e distúrbios de sono são cada vez mais comuns na população em geral (Garbarino et al., 2021).

A proporção de médicos que afirmam ter discernimento sobre higiene do sono e usam essas informações em sua vida pessoal e profissional é um achado positivo, ao qual reflete o reconhecimento da importância do sono para a saúde integral. Porém, essa percepção de conhecimento, que se traduz em uma nota de autoavaliação aceitável (uma média entre 5 e 7), não se alinha com o desempenho nos questionários de conhecimento técnico. Estudos sobre a formação em medicina do sono em currículos de graduação, como o de Falloon et al. (2024), corroboram que o tema recebe pouca atenção, resultando em deficiências no conhecimento dos estudantes e, conseqüentemente, dos profissionais.

Diante desse cenário, o estudo mostra que a principal fonte de informação citada pelos participantes foi o curso de graduação, o que pode explicar a confiança dos médicos, mas ressalta a necessidade de uma revisão e atualização contínua sobre o assunto.

Além disso, apenas 2,7% dos médicos utilizam os cadernos de atenção básica do Ministério da Saúde como fonte de conhecimento, o que sugere que materiais importantes de apoio podem não estar sendo devidamente disseminados ou utilizados, o que representa uma oportunidade de melhoria para políticas de educação continuada. E, por parte dos profissionais, acentuar a busca nos meios digitais, a fim de pesquisar informações sobre saúde, compreendê-las e avaliá-las diante de uma situação e, baseado nisso, aplicar o conhecimento para lidar ou resolver um problema de saúde (Van Der Vaart; Drossaert, 2017).

Com relação a prática profissional, os médicos questionam em 100% sobre a duração e qualidade do sono e 93% sonolência diurna, estando em consonância com as diretrizes da APS, que preconizam a abordagem de queixas e condições que afetam o bem-estar e a qualidade de vida como parte do cuidado integral (Brasil, 2017). Conquanto, a frequência com que esses questionamentos são feitos “sempre” é menor em comparação a “às vezes”, o que pode ser uma barreira para a identificação de problemas do ritmo circadiano.

Relacionado aos conhecimentos sobre o ciclo sono/vigília e distúrbios do sono, o instrumento “A Saúde e o Sono”, de maneira geral, obteve uma alta porcentagem de acertos das

categorias. As afirmativas que obtiveram maiores porcentagens de acertos são sobre temas mais comuns no dia a dia, como as consequências da privação de sono e importância dos horários de sono.

A categoria 1 “Consequências da Privação do Sono”, apresentou 97% de acertos, ficando atrás apenas da categoria 7 “Influência sobre o horário de sono”, com 100% de acerto, o que pode ser em decorrências de questões que abordam algo que é mais disseminado no senso comum e nas redes sociais. Porém, a categoria 6 “Duração do sono” foi a que obteve menor porcentagem de acertos, totalizando em 52%, podendo ocorrer devido a categoria apresentar crenças individuais, sendo elas respondidas com base no senso comum.

De toda forma, o instrumento “A Saúde e o Sono” não possui um nível de dificuldade elevado, visto que foi desenvolvido para a população em geral, não se limitando a pessoas com ensino superior (Mathias, Sanchez e Andrade; 2006).

Em relação ao ASKME, obteve-se outro panorama dos conhecimentos dos médicos, demonstrando maiores porcentagens de erros nas afirmativas e nos domínios como um todo, reforçando a necessidade de aprofundamento no assunto. As questões que tiveram maior percentual de acertos retratam sobre casos comuns no dia a dia desses profissionais. Como exemplo, tem-se a questão de recém-nascido dormir bastante, sendo isso trabalhado pelos médicos comumente em consultas de atendimento a crianças e bem como o fato de idosos terem mudanças na quantidade e qualidade do sono, fazendo relação direta ao uso de psicotrópicos para induzir o sono por pessoas nessa faixa etária.

No entanto, as questões que tiveram as maiores porcentagens de erros estão relacionadas à fisiologia do ritmo circadiano e do sono e a transtornos/distúrbios do sono, evidenciando um menor índice de acertos nos domínios “Arquitetura do Sono” e “Narcolepsia.”

Nessa perspectiva, no Brasil, é escasso informações relacionadas ao conhecimento sobre sono dos profissionais de saúde, o que emerge questionamentos pertinentes sobre como ocorre a educação, além da necessidade de formulação de políticas públicas sobre sono no Brasil (Bento et al., 2024).

Diante dessa análise, torna-se fundamental investir em programas de educação continuada e em uma maior integração da medicina do sono no currículo de graduação para capacitar esses profissionais e, assim, qualificar o cuidado de saúde da população. Tornando-se necessário especializar os médicos para incluir e disseminar conteúdos sobre sono na prática e não apenas questionar. Além disso, realizar educação sobre sono para a população em geral

Conclusão

Os resultados demonstram que, embora os médicos reconheçam a importância do sono e o abordem em sua prática diária, há uma lacuna significativa entre a autopercepção de conhecimento e o domínio técnico-científico do tema.

Relacionado a prática profissional, os participantes relatam questionar seus pacientes sobre a duração e qualidade do sono, sonolência diurna e hábitos de higiene do sono. Contudo, a frequência com que esses questionamentos são realizados e a baixa abordagem de outros aspectos, como os distúrbios do sono, indicam que a avaliação do tema deveria ser mais aprofundada.

A análise do conhecimento técnico comprova a existência dessas lacunas, visto que, por mais que os médicos demonstrem um bom entendimento em áreas básicas sobre sono, houve uma diminuição no desempenho em domínios mais complexos e essenciais para um diagnóstico preciso e manejo adequado.

Evidencia-se, portanto, a necessidade de inclusão e aprofundamento do tema medicina do sono no currículo de graduação e em programas de educação continuada para médicos da APS. Especializar esses profissionais é de suma importância para que possam identificar precocemente os distúrbios do sono, realizar orientações de maneira eficaz e, quando for necessário, fazer encaminhamentos adequados, melhorando a qualidade do cuidado em saúde e o bem-estar da população.

Referências

Aschoff, J. (1979). Circadian rhythms: general features and endocrinological aspects. In D. T. Krieger (Org.), *Endocrine rhythms* (pp. 1-29). Nova York: Raven Press.

AYAS NT, et al. A prospective study of sleep duration and coronary heart disease in women. *Arch intern med.* 2003; 163(2): 205-209.

BASHETI, Mariam M. et al. Sleep health management in community pharmacy: Where are we and where should we be heading? *Research in Social and Administrative Pharmacy*, fev. 2021.

BENTO, Marcos Vinícius da Silva et al. Políticas de saúde na atenção primária sobre o ciclo sono/vigília: revisão de escopo. *CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES*, v. 17, n. 4, p. e2950, 19 abr. 2024

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.436, de 21 de setembro de 2017. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes 58 para a organização da Atenção Básica, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2017

FALLOON, K., Campos, C., Nakatsuji, M., Moir, F., Wearn, A., & Bhoopatkar, H. (2024). Sleep education for medical students: A study exploring gaps and opportunities. *Sleep medicine*, 120, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2024.05.052>

GARBARINO, Sergio et al. Role of sleep deprivation in immune-related disease risk and outcomes. *Communications Biology*, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-17, 18 nov. 2021.

JANSEN JM, et al. Medicina da noite: da cronobiologia à prática clínica. *SciELO -Fiocruz*: Rio de Janeiro. 2007

LUYSTER FS, Strollo PJ Jr, Zee PC, Walsh JK; Boards of Directors of the American Academy of Sleep Medicine and the Sleep Research Society. Sleep: a health imperative. *Sleep (Basel)*. 2012;35(6):727–34.

MAGALHÃES, Flávio; MATARUNA, José. Sono. In: JANSEN, José Manoel et al. *Medicina da noite: da cronobiologia à prática clínica*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Cap. 7. p. 1-340.

MATHIAS, Augusto; SANCHEZ, Renata Palma; ANDRADE, Miriam Mendonça Morato. Incentivar hábitos de sono adequados: um desafio para os educadores. In: Pinho S, Saglietti J, editores. Núcleos de Ensino da Unesp. p. 718–31, 2006.

TOMFOHR LM, Edwards KM, Madsen JW, Mills PJ. Social support moderates the relationship between sleep and inflammation in a population at high risk for developing cardiovascular disease. *Psychophysiology*. 2015;52(12):1689–97.

VAN DER VAART, Rosalie; DROSSAERT, Constance. Development of the Digital Health Literacy Instrument: Measuring a Broad Spectrum of Health 1.0 and Health 2.0 Skills. *Journal of Medical Internet Research*, v. 19, n. 1, p. e27, 24 jan. 2017.

VETTER, Céline et al. Circadian disruption: what do we actually mean?. *European Journal Of Neuroscience*, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 531-550, 5 dez. 2018.

WANG S, Li B, Wu Y, Ungvari GS, Ng CH, Fu Y, et al. Relationship of Sleep Duration with Sociodemographic Characteristics, Lifestyle, Mental Health, and Chronic Diseases in a Large Chinese Adult Population. *J Clin Sleep Med*. 2017;13(3):377–84.

WALKER M. Dormir... In: Walker M. Por que nós dormimos: A nova ciência do sono e do sonho. 1 ed. Rio de Janeiro: Intrínseca, 2018; 15-24

WU W, Wang W, Dong Z, Xie Y, Gu Y, Zhang Y, et al. Sleep Quality and Its Associated Factors among Low-Income Adults in a Rural Area of China: A Population-Based Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(9):E2055.

YOUNGSTEDT SD, Goff EE, Reynolds AM, Kripke DF, Irwin MR, Bootzin RR, et al. Has adult sleep duration declined over the last 50+ years? *Sleep Med Rev*. 2016;28:69–85.

ZOMERS ML, Hulsegge G, van Oostrom SH, Proper KI, Verschuren WM, Picavet HS. Characterizing adult sleep behavior over 20 years – The populations - based doetinchem cohort study. *Sleep (Basel)*. 2017;40(7). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsx085>.

Anexos

APÊNDICES A – FORMULÁRIO SEMI ESTRUTURADO (1)

APÊNDICES A – FORMULÁRIO SEMI ESTRUTURADO (2)

APÊNDICES A – FORMULÁRIO SEMI ESTRUTURADO (3)

APÊNDICES A – FORMULÁRIO SEMI ESTRUTURADO (4)

APÊNDICES B - AFIRMATIVAS DO QUESTIONÁRIO “A SAÚDE E O SONO” (1)

APÊNDICES B - AFIRMATIVAS DO QUESTIONÁRIO “A SAÚDE E O SONO” (2)

APÊNDICES C – QUESTIONÁRIO ASKME (1)

APÊNDICES C – QUESTIONÁRIO ASKME (2)

Figura 1: Descrição dos conhecimentos sobre sono avaliado nas categorias do questionário “A Saúde e o sono”.

Figura 2: Descrição dos conhecimentos sobre sono avaliado nas categorias do questionário “ASKME.”

CÓDIGO: SB1345

AUTOR: LUKAS MIKAEL COUTO ARAÚJO

ORIENTADOR: GISLENE MARIA DA SILVA GANADE

TÍTULO: Facilitação ecológica em comunidades restauradas na Caatinga: efeitos cumulativos da facilitação sobre o crescimento estrutural de plantas-targets em ecossistemas semiáridos

Resumo

A degradação da Caatinga compromete não apenas sua biodiversidade, mas também serviços ecossistêmicos fundamentais. Estratégias de restauração ecológica que considerem interações positivas, como a facilitação, podem aumentar a resiliência dos ecossistemas. Este estudo avaliou se a facilitação apresenta efeito cumulativo sobre o desempenho de plantas-alvo em áreas de restauração na Caatinga, utilizando dados do projeto de restauração BrazilDry, composto por 155 parcelas e 6 níveis de diversidade. Foram ajustados Modelos Lineares Mistos (LMMs) para testar se a soma dos valores de facilitação das espécies vizinhas (tval) influencia altura, diâmetro de copa e número de folhas. Os resultados mostraram que altura e diâmetro de copa responderam positivamente à facilitação cumulativa, enquanto o número de folhas não apresentou relação significativa. Esses achados sugerem que a facilitação exerce efeito mais consistente sobre traços estruturais do crescimento do que sobre atributos foliares, o que pode refletir restrições ambientais e variações sazonais. Concluímos que efeitos positivos da facilitação podem ser cumulativos, reforçando a importância de considerar esse mecanismo no planejamento de estratégias de restauração da Caatinga.

Palavras-chave: Palavras-chave: Facilitação ecológica. Restauração da Caatinga.

TITLE: Ecological facilitation in restored communities in the Caatinga: cumulative effects of facilitation on the structural growth of target plants in semi-arid ecosystems

Abstract

The degradation of the Caatinga compromises not only its biodiversity but also fundamental ecosystem services. Ecological restoration strategies that consider positive interactions, such as facilitation, can increase ecosystem resilience. This study evaluated whether facilitation has a cumulative effect on the performance of target plants in restoration areas in the Caatinga, using data from the BrazilDry restoration project, comprising 155 plots and 6 levels of diversity. Linear mixed models (LMMs) were adjusted to test whether the sum of the facilitation values of neighboring species (tval) influences height, crown diameter, and number of leaves. The results showed that height and crown diameter responded positively to cumulative facilitation, while the number of leaves did not show a significant relationship. These findings suggest that facilitation has a more consistent effect on structural growth traits than on leaf attributes, which may reflect environmental constraints and seasonal variations. We conclude that positive facilitation effects can be cumulative, reinforcing the importance of considering this mechanism when planning restoration strategies for the Caatinga.

Keywords: Keywords: Ecological facilitation. Caatinga restoration.

Introdução

A crescente degradação dos biomas brasileiros ameaça não apenas a biodiversidade, mas também os serviços ecossistêmicos fundamentais à manutenção da qualidade de vida humana (IPBES, 2019; Chazdon et al., 2020). Estima-se que mais de 50% da Caatinga esteja degradada ou fragmentada (Antongiovanni et al., 2018; Silva et al., 2017). A desertificação avança rapidamente na região devido às pressões antrópicas e alterações climáticas (Salazar et al., 2007). Tal cenário demanda estratégias eficazes de restauração ecológica, capazes de acelerar a recuperação da estrutura e da funcionalidade dos ecossistemas (Armas et al., 2004; Bezerra et al., 2023; Bullock et al., 2011; Suding, 2011).

No contexto da restauração, compreender as interações entre espécies plantadas é essencial, visto que essas interações podem ser tanto negativas, pela competição, quanto positivas, pela facilitação (Bruno et al., 2003; Armas et al., 2004; Fagundes et al., 2018). A facilitação, por exemplo, pode reduzir o estresse hídrico e térmico, aumentar a retenção de nutrientes no solo e favorecer o estabelecimento de outras espécies vegetais (Fagundes et al., 2023; Paterno et al., 2016). Essa dinâmica é especialmente relevante em ecossistemas áridos e semiáridos, como a Caatinga, onde fatores abióticos limitantes impõem restrições severas ao crescimento das plantas (Soliveres et al., 2014; Violle et al., 2007).

Estudos recentes evidenciam que plantas facilitadoras desempenham papel crucial na estruturação das comunidades vegetais e na aceleração dos processos de restauração (Bullock et al., 2011; Fagundes et al., 2022). Contudo, permanece pouco explorado se esses efeitos positivos são cumulativos, ou seja, se a presença de múltiplas plantas facilitadoras na vizinhança amplifica os benefícios para as espécies alvo.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar se existe um efeito cumulativo da facilitação sobre o crescimento e o desempenho de plantas-alvo em áreas de restauração da Caatinga. Nossa hipótese é que, na presença de mais de uma espécie facilitadora na vizinhança, a planta-alvo (target) apresenta desempenho superior em comparação a situações com menor número de vizinhos facilitadores (Figura 1).

Metodologia

O estudo foi realizado em um experimento de restauração da Caatinga denominado BrazilDry, implementado em 2016, com área total de 3,3 ha, localizado na Floresta Nacional de Açu, município de Assú – RN, Brasil (5° 32' 20" S; 36° 57' 49" W). O experimento é composto por 155 parcelas de 8 × 13 m, com 32 indivíduos de espécies arbóreas nativas cada, distribuídas em cinco níveis de diversidade (monocultura, 2, 4, 8 e 16 espécies), além de oito parcelas controle onde não foi aplicado tratamento. As parcelas também foram organizadas em um gradiente de facilitação (de -1 a +1), totalizando 155 parcelas. (Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2018).

Neste trabalho, utilizamos a média ponderada dos valores de RII obtidos por Fagundes et al. (2018) em experimentos com 60 combinações de espécies arbóreas (20 espécies adultas × 3 espécies de mudas, repetidas cinco vezes). A performance das mudas (altura, número de folhas e diâmetro ao nível do solo) foi medida sob a copa das espécies enfermeiras e em áreas

abertas. A partir dessas médias, foi feito um ranking de espécies mais e menos facilitadoras no BrazilDry. Para calcular o potencial de facilitação em cada parcela (unidade amostral), utilizamos a média ponderada dos valores de RII das espécies presentes, considerando o número de indivíduos vivos em cada parcela (indivíduos mortos não foram incluídos).

O potencial de facilitação de cada uma das espécies estudadas foi previamente calculado por Fagundes et al. (2018), utilizando o Índice Relativo de Interação (RII) proposto por Armas et al. (2004). Esse índice mede a intensidade relativa da interação entre pares de plantas, variando de -1 (competição máxima) a +1 (facilitação máxima).

Cada parcela é espelhada no centro, o que gera duas metades equivalentes e permite definir duas plantas-alvo por parcela (indivíduos 11 e 22, seguindo o esquema de numeração do experimento). Para cada planta-alvo, foi definida uma vizinhança composta por seis indivíduos vizinhos próximos, que são (6, 7, 10, 12, 14, 15) para a planta 11 e (18, 19, 21, 23, 26, 27) para planta 22 (Figura 2). Como consequência do espelhamento, o número de plantas-alvo é dobrado, mas deve-se considerar que estas não são independentes, sendo tratadas como pseudoréplicas dentro da mesma parcela. Essa dependência foi controlada nos modelos estatísticos por meio da inclusão de parcela como efeito aleatório.

A intensidade da facilitação percebida por cada planta-alvo foi representada pelo índice de valor de facilitação (tval), obtido a partir da soma dos valores de efeito associados às espécies vizinhas de cada planta-alvo (Fagundes et al., 2022).

Para testar se há um efeito cumulativo da facilitação sobre o desempenho das plantas-alvo, utilizamos Modelos Lineares Mistos (LMMs), no qual as variáveis resposta (y) serão: altura, número de folhas e diâmetro de copa das plantas-alvo, e a variável preditora fixa (x): o índice de facilitação cumulativa (tval). O fator aleatório considerado foi a parcela. Os modelos foram ajustados no software R 4.4.2, utilizando os pacotes lme4, ggplot2 e lmerTest.

Resultados e Discussões

Os resultados indicam um efeito positivo e significativo da facilitação cumulativa sobre a altura e o diâmetro de copa das plantas-alvo (Tabela 1; Figura 3; Figura 4). No entanto, não foi observada relação significativa entre a facilitação cumulativa e o número de folhas (Figura 5).

Nossos resultados demonstram que a facilitação cumulativa exerce influência significativa sobre traços estruturais das plantas, altura e diâmetro de copa, mas não sobre atributos foliares. Esse padrão sugere que o crescimento em altura e a expansão da copa são processos mais diretamente beneficiados pela presença de múltiplos vizinhos facilitadores, possivelmente devido à maior proteção contra estresse térmico e hídrico, além da melhoria na disponibilidade de nutrientes (Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2018; Soliveres et al., 2014).

Por outro lado, a ausência de efeito sobre o número de folhas pode estar relacionada a fatores sazonal e fisiológicos. O número de folhas em espécies da Caatinga é altamente variável ao longo do ano, sendo influenciado por pulsos de chuva e estratégias de economia de água típicas de plantas xerofíticas (Ribeiro et al., 2016; Silva et al., 2017). Assim, enquanto altura e diâmetro da copa refletem um crescimento estrutural de médio e longo

prazo, a produção foliar pode responder de forma mais imediata a variações climáticas do que à facilitação cumulativa.

Esses resultados reforçam a importância da facilitação como mecanismo chave na restauração da Caatinga, indicando que efeitos positivos podem ser cumulativos e mais evidentes em características estruturais. Estudos semelhantes em florestas secas tropicais já destacaram a relevância das árvores facilitadoras para o sucesso de outras espécies (Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2022).

Conclusão

O presente estudo demonstra que a facilitação ecológica exerce efeitos positivos cumulativos sobre o crescimento estrutural das plantas em áreas de restauração da Caatinga, refletidos principalmente na altura e no diâmetro da copa. Esses resultados reforçam a importância da facilitação como um mecanismo-chave na restauração de ecossistemas semiáridos, indo além da constatação de que plantas facilitadoras beneficiam individualmente outras espécies. Mostramos que, quando múltiplas espécies facilitadoras estão presentes na vizinhança, seus efeitos podem se somar, intensificando o desempenho das plantas-alvo.

Essa evidência contribui para a literatura ao indicar que a facilitação não deve ser considerada apenas em nível individual, mas também em um contexto cumulativo, o que pode acelerar a recuperação estrutural da vegetação e aumentar a resiliência dos ecossistemas frente às pressões ambientais. Assim, incorporando os efeitos cumulativos da facilitação, projetos de restauração na Caatinga podem alcançar maior sucesso na reconstrução de comunidades vegetais e na manutenção de serviços ecossistêmicos.

Referências

ANTONGIOVANNI, M.; VENTICINQUE, E. M.; FONSECA, C. R. Fragmentation patterns of the Caatinga drylands. *Landscape Ecology*, v. 33, p. 1353–1367, 2018.

ARMAS, C.; ORDIALES, R.; PUGNAIRE, F. I. Measuring plant interactions: A new comparative index. *Journal of Ecology*, v. 92, p. 1121–1125, 2004.

BEZERRA, D. S. et al. Spatiotemporal patterns of deforestation in the Brazilian Caatinga from 1985 to 2021. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 58, e00832, 2023.

BRUNO, J. F. et al. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 18, n. 3, p. 119–125, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00045-9](https://doi.org/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.

CHAZDON, R. L. et al. Transforming tropical forest restoration. *Science*, v. 370, n. 6523, p. 660–661, 2020.

FAGUNDES, M. et al. Facilitation drives successional pathways in tropical dry forests under experimental restoration. *Journal of Applied Ecology*, v. 55, n. 6, p. 2878–2889, 2018.

FAGUNDES, M. et al. Facilitation and biodiversity jointly enhance ecosystem functioning and community assembly in a tropical dry forest restoration experiment. *Journal of Applied Ecology*, v. 59, n. 12, p. 3067–3080, 2022.

IPBES. Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services. Bonn: Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 2019. Disponível em: <https://ipbes.net/global-assessment>. Acesso em: 10 jul. 2025.

PATERNIO, G. B.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; GANADE, G. Nurse trees drive plant community assembly in semi-arid forest restoration. *Journal of Applied Ecology*, v. 53, n. 3, p. 715–724, 2016.

RIBEIRO, E. M. S. et al. Phylogenetic impoverishment of plant communities following chronic human disturbances in the Brazilian Caatinga. *Ecology*, v. 97, n. 6, p. 1583–1592, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1890/15-1122.1>.

SALAZAR, L. F.; NOBRE, C. A.; OYAMA, M. D. Climate change consequences on the biome distribution in tropical South America. *Geophysical Research Letters*, v. 34, L09708, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1029/2007GL029695>.

SILVA, J. M. C.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. Cham: Springer, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3>.

SOLIVERES, S. et al. Functional traits determine plant co-occurrence more than environment or evolutionary relatedness in global drylands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v. 16, n. 4, p. 164–173, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2014.05.001>.

Anexos

Figura 1. Gráfico ilustrativo da hipótese, relação entre a facilitação cumulativa (tval) e o desempenho da target.

Figura 2. Imagem ilustrativa da metodologia, o vermelho representa a vizinhança e o azul representa a planta-target.

Tabela 1. Resultados dos Modelos Lineares Mistos (LMMs). n.s. = não significativo.

Figura 3. Relação entre a facilitação cumulativa (tval) e a altura das plantas-alvo.

Figura 4. Relação entre a facilitação cumulativa (tval) e o diâmetro da copa das plantas-alvo.

Figura 5. Relação entre a facilitação cumulativa (tval) e o número de folhas das plantas-alvo.

CÓDIGO: SB1374

AUTOR: DANIELLE BORGES BENTO DE OLIVEIRA

COAUTOR: SILVANA MARIA ZUCOLOTTI LANGASSNER

COAUTOR: FABIANE FERREIRA MARTINS

COAUTOR: JOSE BRICIO ARAUJO LOPES

COAUTOR: GRAZIELE DOMINGOS SILVA

COAUTOR: EMANUELLA DE ARAGÃO TAVARES

ORIENTADOR: CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

TÍTULO: ANÁLISE DO REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO MARROM EM CAMUNDONGOS OBESOS TRATADOS COM O EXTRATO DA NOPALEA COCHENILLIFERA (L.)

Resumo

A obesidade é um atual problema de saúde pública que gera doenças cardiovasculares, diabetes e disfunções no tecido adiposo marrom (TAM). O extrato da *Opuntia cochenillifera* (EOC) apresenta propriedades anti-hiperglicemiante, antioxidante e anti-inflamatória, emergindo como um agente promissor para o tratamento da obesidade e de seus desfechos no TAM. Neste estudo foram utilizados 40 camundongos (C57BL/6) divididos em 2 grupos: Controle (C) (n=20, dieta normocalórica) e High-fat (HF) (n=20, dieta hiperlipídica). Após 12 semanas, os animais foram redistribuídos em 4 grupos (n=10) de acordo com os tratamentos: C, C+EOC (CP), HF e HF+EOC (HFP), os quais seguiram por mais 8 semanas. Foi realizada a termografia e os animais foram sacrificados, o TAM foi dissecado e seguiu para análises de microscopia de luz e de biologia molecular. O EOC apresentou efeito antiobesogênico e anorexígeno nos grupos tratados. A termografia indicou que o EOC recuperou a temperatura do TAM, revelando potencial termogênico. O EOC reverteu a hipertrofia e o whitening (embranquecimento), restaurando a citoarquitetura dos adipócitos. Os genes relacionados à integridade mitocondrial e à termogênese (Opa-1, Pgc1- α , β 3-Ar e Ucp-1) apresentaram expressão reduzida no grupo HF e foram restaurados no grupo HFP, enquanto o TNF- α aumentou no grupo HF e reduziu no grupo HFP. Assim, o tratamento com o EOC reverteu a obesidade, reduziu a inflamação, restaurou a função mitocondrial e a termogênese.

Palavras-chave: Obesidade. *Opuntia cochenillifera*. TAM. Termogênese.

TITLE: Evaluation of Brown Adipose Tissue Remodeling in Obese Mice Treated with *Opuntia cochenillifera* (L) Extract

Abstract

Obesity is a current public health problem that leads to cardiovascular disease, diabetes, and brown adipose tissue (BAT) dysfunction. *Opuntia cochenillifera* extract (EOC) exhibits antihyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory properties, emerging as a promising agent for the treatment of obesity and its outcomes in BAT. This study involved 40 mice (C57BL/6) divided into two groups: Control (C) (n=20, normocaloric diet) and High-fat (HF) (n=20, high-fat diet). After 12 weeks, the animals were redistributed into four groups (n=10) according to the treatments: C, C+EOC (CP), HF, and HF+EOC (HFP), which were followed for an additional 8 weeks. Thermography was performed, and the animals were sacrificed. The BAT was dissected and submitted for light microscopy and molecular biology analyses. EOC showed antiobesogenic and anorectic effects in the treated groups. Thermography indicated that EOC restored the temperature of the BAT, revealing thermogenic potential. EOC reversed hypertrophy and whitening, restoring adipocyte cytoarchitecture. Genes related to mitochondrial integrity and thermogenesis (Opa-1, Pgc1- α , β 3-Ar, and Ucp-1) showed reduced expression in the HF group and were restored in the HFP group, while TNF- α increased in the HF group and decreased in the HFP group. Thus, treatment with EOC reversed obesity, reduced inflammation, and restored mitochondrial function and thermogenesis.

Keywords: Obesity. *Opuntia cochenillifera*. BAT. Thermogenesis.

Introdução

1. Introdução

A prevalência crescente da obesidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento vem sendo considerada uma pandemia global, cuja patogênese envolve a instalação da síndrome metabólica (SM), caracterizada por doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e esteatose hepática (1, 2). Entre os múltiplos fatores etiológicos da obesidade, destacam-se as mudanças do comportamento alimentar e do estilo de vida, principalmente pelo maior consumo de alimentos ultraprocessados associado ao sedentarismo (3).

O ganho de peso excessivo gera hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos brancos, alterações no perfil de secreção das adipocinas, resistência à insulina, ativação das células imunes residentes no tecido adiposo, resultando em inflamação crônica de baixo grau (4, 5). A recente descoberta de que o tecido adiposo marrom (TAM) continua ativo em adultos saudáveis fez com que estudos experimentais que investigassem o papel de agentes indutores da termogênese adaptativa para o controle da obesidade ganhassem grande relevância científica (6, 7).

O TAM é composto por adipócitos multiloculares, cujo núcleo é esférico, centralizado e o citoplasma é preenchido por inúmeras mitocôndrias, o que confere a ele a cor amarronzada. O TAM é reconhecido pela sua capacidade de aumentar o gasto energético através da oxidação de ácidos graxos, processo conhecido como termogênese, o qual dissipa energia na forma de calor (8). Nesse contexto, a proteína desacopladora 1 (UCP1) é um alvo fundamental para a ativação e a manutenção da termogênese, além de ser o principal marcador dentro da assinatura molecular do TAM (9).

A UCP1 é localizada na membrana mitocondrial interna atuando como um canal de próton que descarrega o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante o ciclo de Krebs, desviando-os do complexo F1F0 (ATP sintase), impedindo a síntese de ATP e permitindo que a energia se dissipe sob a forma de calor (10). A termogênese é iniciada através de estímulos simpáticos a receptores adrenérgicos (especialmente dos receptores beta-3 e beta-1). Em seguida, inicia-se uma cascata de reações que se seguem com o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), ativação da proteína cinase A dependente de AMPc (PKA) e indução da lipólise. Os ácidos graxos livres (AGLs), por sua vez, ativam uma série de marcadores que levam à ativação da UCP1 com aumento na oxidação dos AGLs e liberação de calor (11).

Recentemente, estudos experimentais mostraram que a obesidade resulta em remodelamento adverso e hipóxia funcional do TAM, desencadeando o embranquecimento (whitening) dos adipócitos marrons com redução da termogênese e aumento no armazenamento de lipídios, fatores que colaboram para o agravamento da síndrome metabólica (12, 13).

No sentido de propor uma estratégia para conter as alterações do TAM na obesidade, o extrato da *Opuntia cochenillifera* (EOC) (*Nopalea cochenillifera*) emerge como uma abordagem terapêutica promissora. O EOC apresenta grande quantidade de compostos bioativos, entre eles, destacam-se os polifenóis, os quais apresentam efeitos benéficos no metabolismo e atividade anti-inflamatória (14). Em modelo de obesidade, o EOC reduziu a adiposidade, melhorou o perfil lipídico e recuperou a resistência à insulina. Em modelo de colite induzida, o EOC atenuou a expressão de citocinas inflamatórias e aliviou o estresse oxidativo (15). Apesar desses resultados, não há estudos que relatem a ação do EOC no remodelamento adverso do TAM dentro do cenário da obesidade.

Metodologia

2. Metodologia

Animais e dietas

Quarenta camundongos (C57BL/6J) machos de três meses de idade (CEUA nº 067/2023) foram obtidos do Biotério do Instituto do Cérebro da UFRN. Os camundongos permaneceram mantidos no Biotério da Farmacologia da UFRN em condições controladas de temperatura e umidade ($60 \pm 10\%$), com livre acesso à água e à dieta, em caixas “pathogen free”. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão para roedores (C, $n=20$, 10% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 76% sob a forma de carboidratos = 15 kJ/g de dieta), ou dieta rica em lipídeos (HF, $n=20$, 50% da energia sob a forma de lipídios, 14% sob a forma de proteínas e 36% sob a forma de carboidratos, = 21 kJ/g de dieta) por 12 semanas. Após, de acordo com os tratamentos, os grupos foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos por mais oito semanas:

- 1- Grupo controle (C, $n=10$), dieta controle ao longo de todo experimento, sem tratamento;
- 2- Grupo controle + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (CP, $n=10$), dieta controle acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal;
- 3- Grupo high-fat (HF, $n=10$), dieta HF (50% de lipídios) ao longo de todo experimento, sem tratamento;

4- Grupo high-fat + extrato da *O. cochenillifera* (EOC) (HFP, n=10), dieta HF (50% de lipídios) acrescida com EOC 200mg/kg de massa corporal.

O extrato da *O. cochenillifera* foi fornecido em parceria com o Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Bioativos da UFRN, o qual realizou o isolamento e a caracterização fitoquímica de acordo com protocolos já publicados pelo grupo (14, 15). A concentração de 200mg/kg de massa corporal foi usada com base em respostas anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato da *O. cochenillifera* em modelos experimentais (14, 15). Todos os procedimentos relacionados à experimentação animal abordados neste estudo foram realizados de acordo com as recomendações do “National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996) (16). As dietas experimentais (Tabela 1) foram elaboradas pela empresa PragSoluções Biociências (Jaú-SP) seguindo as diretrizes do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (17). A Figura 1 resume o delineamento experimental descrito acima.

Massa corporal, ingestão alimentar e energética

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente (segunda-feira, 14:00h pm) em balança de precisão 0,01 g (Shimadzu, BL-3200H). A ingestão alimentar foi avaliada diariamente (14:30h pm) através da subtração entre as quantidades de ração ofertada e ração não consumida após 24 horas (em gramas). A ingestão energética foi calculada através da ingestão em gramatura multiplicada pela energia expressa em quilocalorias da respectiva dieta, o valor obtido em quilocalorias foi convertido para quilojoules (kJ), medida universal de energia.

Termografia

A temperatura do TAM foi aferida na última semana experimental através de imagens termográficas obtidas da região subescapular dos animais (n=5) realizadas com uma câmera termográfica (FLIR C2, Oregon, EUA).

Sacrifício

Ao final do protocolo experimental, os camundongos foram mantidos em jejum por seis horas e logo após anestesiados profundamente com Cloridrato de Ketamina 5% (0,15ml/100g) e Xilazina 2% (0,15 ml/100g). Uma incisão transversa foi realizada no dorso, na região subescapular, e o TAM foi cuidadosamente dissecado, removido, pesado e fixado em formalina de Millonig 10% para documentação macroscópica, para técnicas de microscopia de luz (n=5) e congelado a -80°C para análises moleculares (n=5).

Análises Morfológicas

Após a dissecação, o TAM seguiu para a fixação por 48 horas em formalina de Millonig. Em seguida, foi realizada a desidratação em graduações crescentes de etanol, a diafanização em xilol, a impregnação em parafina e a inclusão em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, EUA). Dos blocos foram obtidos cortes de 5 µm que foram depositados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H.E). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Optika B383, Itália).

Análise estereológica (Densidade numérica de núcleos por área/Qa)

Imagens digitais do TAM (50 por grupo/n=5) foram obtidas em campos microscópicos aleatórios e não consecutivos. A fim de estimar indiretamente a densidade numérica de adipócito marrom por área, foi realizada a densidade numérica de núcleos por área (QA), uma vez que o adipócito marrom é uma célula mononucleada. O QA foi obtido pela divisão do número total de núcleos contados na área teste, à exceção dos que tocam a linha proibida, pela área teste (em μm^2), com o emprego do software STEPanizer (www.stepanizer.com), versão beta 0.28 (13).

PCR quantitativo em tempo real (expressão gênica)

O RNA total foi extraído do TAM (30 mg) utilizando 700 μl de trizol (Invitrogen,USA). A concentração de RNA foi determinada através de espectrometria utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences), 1 μg de RNA foi aliquoteado e a DNase I acrescentada. O cDNA foi sintetizado utilizando Oligo (dT) e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen,USA) para RNAm. Os primers foram produzidos utilizando o software online Primer3. A beta-actina foi utilizada como controle endógeno para normalizar a expressão dos genes selecionados. A razão de expressão relativa de mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ onde $-\Delta\text{CT}$ representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes-alvo e o controle endógeno.

Genes Alvo: $\beta 3\text{ar}$, Ucp1 , $\text{Pgc1-}\alpha$, Opa-1 (função mitocondrial e termogênese) e $\text{TNF-}\alpha$ (inflamação).

3. Análise estatística

As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA de uma via com teste de Brown-Forsythe e Welch e pós teste de Dunnett T3, pois não se assumiu a homocedasticidade entre os grupos. Em todos os casos foi utilizado o índice de significância com $p < 0,05$ (GraphPad Prism 9.5, EUA).

Resultados e Discussões

4. Resultados e Discussão

Durante o experimento, conforme esperado, a dieta hiperlipídica demonstrou ter significativo efeito obesogênico (18), levando o grupo HF a um aumento de 73% ($p < 0,0001$) na massa corporal quando comparado ao grupo controle (C). Em contrapartida, o tratamento com o extrato da *O. cochenillifera* foi altamente eficaz, resultando em uma redução de 24% ($p < 0,0001$) na massa corporal do grupo HFP em relação ao grupo HF. Além disso, o extrato também causou uma diminuição no peso do grupo CP, mesmo com a dieta padrão (-8,6%, $p < 0,001$) em relação ao grupo C. Esses resultados indicam que o extrato da *O. cochenillifera* possui propriedades antiobesogênicas que funcionam tanto em dietas hiperlipídicas quanto em dietas normocalóricas (Figura 2).

Em relação ao comportamento alimentar, considerando a ingestão alimentar, não foi observada diferença significativa entre os grupos HF e C (+2%; ns), sugerindo que o aumento de massa corporal no grupo high-fat não esteve associado ao volume de alimento consumido, mas sim à elevada densidade calórica da dieta (19). Esse achado pode ser comprovado ao observar que a ingestão energética foi 40% ($p < 0,0001$) maior no grupo HF em relação ao C. Em comparação ao grupo HF, o grupo HFP apresentou redução de 26% ($p < 0,0001$) na

ingestão alimentar e de 28% ($p < 0,0001$) na ingestão energética, mostrando, mais uma vez, que o extrato da *O. cochenillifera* exerceu efeito modulador sobre o consumo alimentar, contribuindo para a homeostase energética. No grupo CP, a ingestão alimentar e energética foram respectivamente: 7,4% ($p < 0,001$) e 14% ($p < 0,0001$) menores do que no grupo C, indicando o potencial anorexígeno da *O. cochenillifera* mesmo em indivíduos não obesos (Figura 3).

As análises termográficas mostram redução na temperatura do TAM dos animais obesos quando comparados ao grupo C (-12%, $p < 0,0001$) indicando falhas na termogênese. O grupo HFP apresentou recuperação da temperatura do TAM (+12%, $p < 0,001$) sugerindo potencial termogênico do extrato da *O. cochenillifera* (Figura 4).

Em paralelo, as análises macroscópicas revelaram que a dieta hiperlipídica gerou hipertrofia (+72%, $p < 0,0001$) e embranquecimento do TAM no grupo HF e que o extrato da *O. cochenillifera* reverteu esses efeitos (-28%, $p < 0,001$) (Figura 5).

No que se refere às características histológicas do TAM, os adipócitos apresentam reserva lipídica multilocular e maior quantidade de mitocôndrias em seu citoplasma, denotando maior capacidade termogênica. O grupo HF apresentou aumento pronunciado no acúmulo de gotículas de gordura quando comparado ao grupo C, de forma a dificultar a delimitação dos adipócitos marrons multiloculares que, frequentemente, passaram a lembrar um padrão de armazenamento lipídico de um adipócito branco, fenômeno denominado whitening (embranquecimento). Esse fenômeno ocorre em resposta à alta demanda energética da dieta hiperlipídica, ocasionando danos nas mitocôndrias, redução na beta-oxidação lipídica e declínio da termogênese. Como consequência, os lipídios não oxidados se acumulam e se fundem no citoplasma dos adipócitos (20, 21). Contrariamente, no grupo HFP foi observada redução expressiva no acúmulo de lipídios no interior dos adipócitos marrons, retomando o volume citoplasmático e a citoarquitetura semelhante a do grupo C, o que sugere aumento na atividade termogênica desses animais (Figura 6A).

As análises quantitativas da densidade numérica de núcleos por área (Qa) confirmam os achados histológicos. Quando comparado ao grupo C, o grupo HF exibiu redução significativa (-312%, $p < 0,0001$) no Qa, comprovando que o whitening aumenta o tamanho das gotículas lipídicas nos adipócitos marrons promovendo o distanciamento entre essas células. O grupo HFP mostrou recuperação do Qa (+241%, $p < 0,0001$) sinalizando que o tratamento com a *O. cochenillifera* foi capaz de reverter o whitening resgatando as características histológicas e termogênicas do TAM dos animais obesos (Figura 6B).

A expressão dos genes Opa-1 e do Pgc1- α foi comprometida no grupo HF (-66%, $p < 0,05$ e -60%, $p < 0,001$, respectivamente). Esses genes estão relacionados com a regulação da integridade, da saúde mitocondrial e com a beta-oxidação lipídica (22, 23). O extrato da *O. cochenillifera* recuperou a expressão desses genes (+220%, $p < 0,0001$ e +634%, $p < 0,0001$, respectivamente). Semelhantemente, a expressão dos genes envolvidos com a termogênese $\beta 3$ -Ar e Ucp-1 foi reduzida no grupo HF (-58%, $p < 0,05$ e -67%, $p < 0,001$) e aumentada no grupo HFP (+613%, $p < 0,001$ e +1043% $p < 0,001$). Esses resultados dialogam com os resultados das análises termográficas, macroscópicas e histológicas, convergindo na direção de que a dieta hiperlipídica causou o whitening com prejuízos mitocondriais e falhas na termogênese; e que o extrato da *O. cochenillifera* mitigou essas alterações e exerceu efeitos termogênicos. Adicionalmente, a expressão do gene inflamatório TNF- α foi elevada no TAM dos animais obesos (+243%, $p < 0,001$) e o tratamento com a *O. cochenillifera* exerceu ação anti-inflamatória (-190%, $p < 0,0001$) (Figura 7).

Essa modulação positiva que o extrato da *O. cochenillifera* promoveu no remodelamento do TAM dos camundongos obesos pode ser explicada devido a presença de moléculas bioativas em sua composição, dentre as quais se destacam a quercetina, o kampferol e a rutina (24). Estudos prévios mostram que essas moléculas exibem relevantes propriedades farmacológicas, incluindo ação anti-inflamatória, gastroprotetiva, antioxidante e anti-hiperglicêmica, com efeitos benéficos em vários mecanismos celulares e metabólicos (14, 15, 25).

Conclusão

5. Conclusões

A dieta hiperlipídica induziu o remodelamento adverso do TAM, gerando o whitening com falhas mitocondriais, perda de função termogênica e inflamação. Os resultados mostram que o extrato da *Opuntia cochenillifera* na concentração de 200mg/kg de massa corporal reverteu a obesidade e restaurou o metabolismo energético, o whitening, as disfunções mitocondriais, a termogênese e a inflamação no TAM dos camundongos obesos. Esses achados indicam que o extrato da *O. cochenillifera* é um agente terapêutico promissor para o tratamento da obesidade com relevante potencial termogênico. Ademais, esses resultados colocam a *O. cochenillifera* em evidência, valorizando essa planta nativa da biodiversidade do estado do Rio Grande do Norte.

É importante mencionar que os resultados aqui apresentados são parte de um projeto de mestrado em execução, e que as análises ultraestruturais do TAM e de expressão de proteínas relacionadas à inflamação e à termogênese estão em andamento a fim de consolidar esses achados iniciais.

Referências

6. Referências

1. Bluher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-98.
2. Speakman JR, Sorensen TIA, Hall KD, Allison DB. Unanswered questions about the causes of obesity. *Science*. 2023;381(6661):944-6.
3. Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health-Processing or Nutrient Content? *Curr Obes Rep*. 2017;6(4):420-31.
4. Sahu B, Bal NC. Adipokines from white adipose tissue in regulation of whole body energy homeostasis. *Biochimie*. 2023;204:92-107.
5. Tong X, Wei L, Wang T, Han R. Remodeling of Macrophages in White Adipose Tissue under the Conditions of Obesity as well as Lipolysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:9980877.
6. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444-52.

7. Trayhurn P. Brown Adipose Tissue-A Therapeutic Target in Obesity? *Front Physiol.* 2018;9:1672.
8. Martins FF, Martins BC, Teixeira AVS, Ajackson M, Souza-Mello V, Daleprane JB. Brown Adipose Tissue, Batokines, and Bioactive Compounds in Foods: An Update. *Mol Nutr Food Res.* 2024;68(6):e2300634.
9. Martins FF, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue as an endocrine organ: updates on the emerging role of batokines. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2023;44(2):219-27.
10. Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 2019;29(1):27-37.
11. Blondin DP, Nielsen S, Kuipers EN, Severinsen MC, Jensen VH, Miard S, et al. Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by beta2-AR Stimulation. *Cell Metab.* 2020;32(2):287-300 e7.
12. Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 2015;129(11):933-49.
13. Rangel-Azevedo C, Santana-Oliveira DA, Miranda CS, Martins FF, Mandarin-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. *J Nutr Biochem.* 2022;105:109002.
14. Tavares EA, Guerra GCB, da Costa Melo NM, Dantas-Medeiros R, da Silva ECS, Andrade AWL, et al. Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of Phenolic-Rich Extract from *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae): A Preclinical Study on the Prevention of Inflammatory Bowel Diseases. *Plants (Basel).* 2023;12(3).
15. da Silva ECS, Bernardo Guerra GC, de Araujo ERD, Schlamb J, da Silva VC, de Aragao Tavares E, et al. Phenolic-rich extract of *Nopalea cochenillifera* attenuates gastric lesions induced in experimental models through inhibiting oxidative stress, modulating inflammatory markers and a cytoprotective effect. *Food Funct.* 2023;14(7):3242-58.
16. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J.* 1997;38(1):41-8.
17. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):838S-41S.
18. Martins FF, Santos-Reis T, Marinho TS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Hypothalamic anorexigenic signaling pathways (leptin, amylin, and proopiomelanocortin) are semaglutide (GLP-1 analog) targets in obesity control in mice. *Life Sci.* 2023;313:121268.
19. Miranda CS, Silva-Veiga FM, Santana-Oliveira DA, Fernandes-da-Silva A, Brito GC, Martins FF, Souza-Mello V. Chronic Excessive Fructose Intake Maximizes Brown Adipocyte Whitening but Causes Similar White Adipocyte Hypertrophy Than a High-Fat Diet in C57BL/6 Mice. *J Am Nutr Assoc.* 2023;42(5):435-44.

20. Lopez-Vicchi F, De Winne C, Ornstein AM, Sorianello E, Toneatto J, Becu-Villalobos D. Severe Hyperprolactinemia Promotes Brown Adipose Tissue Whitening and Aggravates High Fat Diet Induced Metabolic Imbalance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:883092.
21. Ziqubu K, Dlodla PV, Mthembu SXH, Nkambule BB, Mabhida SE, Jack BU, et al. An insight into brown/beige adipose tissue whitening, a metabolic complication of obesity with the multifactorial origin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1114767.
22. Chen L, Liu T, Tran A, Lu X, Tomilov AA, Davies V, et al. OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(5):e003012.
23. Qian L, Zhu Y, Deng C, Liang Z, Chen J, Chen Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):50.
24. Nunes AAC. Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Prospection of *Nopalea cochenillifera*: A Scoping Review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2025.
25. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2005;99(3):325-48.

Anexos

Figura 1. Resumo gráfico do delineamento experimental do presente estudo. Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 2. Imagens representativas da massa corporal (A) e das diferenças estatísticas entre os grupos (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa

Figura 3. Ingestão alimentar (A) e ingestão energética (B). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 4. Análises termográficas do tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 5. Análises macroscópicas e de massa do tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 6. Análises histológicas e estereológicas do tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Figura 7. Análises da expressão de genes relacionados à função mitocondrial, à termogênese e à inflamação no tecido adiposo marrom (TAM). Grupos: C (controle), CP (controle+EOC), HF (high-fat), e HFP (High-fat+EOC). Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia co*

Figura 8. Resumo gráfico dos principais resultados encontrados neste estudo. Abreviatura: EOC (extrato da *Opuntia cochenillifera*, 200mg/kg de massa corporal).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

CÓDIGO: SB1381

AUTOR: DANIEL DA COSTA SILVA

ORIENTADOR: ADRIAN ANTONIO GARDA

TÍTULO: Girino do sapo de chifre da Caatinga, *Ceratophrys joazeirensis* Mercadal de Barrio, 1986 (Anura: Ceratophryidae): uma espécie pouco conhecida do nordeste do Brasil

Resumo

A família Ceratophryidae compreende anfíbios do gênero *Ceratophrys*, conhecidos como sapos-de-chifre, caracterizados por hábitos carnívoros e reprodução explosiva. *Ceratophrys joazeirensis*, espécie endêmica do bioma Caatinga, possui registros restritos e informações limitadas sobre sua biologia, especialmente no que se refere à fase larval. Neste estudo, descrevemos a morfologia externa dos girinos de *C. joazeirensis* coletados no município de São Gonçalo do Amarante, Rio Grande do Norte, ampliando o conhecimento sobre a variabilidade morfológica da espécie em relação à população previamente descrita na Bahia. Foram analisados 14 girinos nos estágios 29–41 de Gosner, com base em medidas morfométricas, coloração, estruturas orais. Os girinos apresentam corpo oval, olhos dorsolaterais, espiráculo sinistro com paredes fundidas, disco oral com papilas marginais simples e bico córneo serrilhado. A comparação com girinos de outras espécies congênicas, como *C. aurita*, evidenciou semelhanças gerais, mas também diferenças no formato do focinho e no número de fileiras dentárias labiais. Observações de campo indicaram comportamento predatório entre girinos e atividade reprodutiva associada a chuvas intensas, com vocalizações noturnas e postura de ovos em poças temporárias. Esses resultados contribuem para a compreensão da história natural e da diversidade morfológica de *C. joazeirensis*, reforçando a importância da descrição larval para estudos taxonômicos, ecológicos e de conservação.

Palavras-chave: Ceratophryidae, *Ceratophrys joazeirensis*, girino, morfologia, caatinga

TITLE: Tadpole of the Caatinga horned frog, *Ceratophrys joazeirensis* Mercadal de Barrio, 1986 (Anura: Ceratophryidae): a poorly known species from northeastern Brazil

Abstract

The family Ceratophryidae comprises amphibians of the genus *Ceratophrys*, commonly known as horned frogs, characterized by carnivorous habits and explosive breeding. *Ceratophrys joazeirensis*, an endemic species of the Caatinga biome, has restricted records and limited information about its biology, especially regarding the larval stage. In this study, we describe the external morphology of *C. joazeirensis* tadpoles collected in the municipality of São Gonçalo do Amarante, Rio Grande do Norte, expanding knowledge about the morphological variability of the species in relation to the population previously described in

Bahia. Fourteen tadpoles at Gosner stages 29–41 were analyzed based on morphometric measurements, coloration, and oral structures. The tadpoles exhibit an oval body, dorsolateral eyes, a sinistral spiracle with fused walls, an oral disc with simple marginal papillae, and a serrated keratinized beak. Comparison with tadpoles of other congeneric species, such as *C. aurita*, revealed general similarities but also differences in snout shape and the number of labial tooth rows. Field observations indicated predatory behavior among tadpoles and reproductive activity associated with heavy rainfall, with nocturnal vocalizations and egg laying in temporary ponds. These results contribute to the understanding of the natural history and morphological diversity of *C. joazeirensis*, reinforcing the importance of larval description for taxonomic, ecological, and conservation studies

Keywords: Ceratophryidae, *Ceratophrys joazeirensis*, tadpole, morphology, Caatinga

Introdução

A família Ceratophryidae compreende doze espécies em três gêneros, *Chacophrys*, *Lepidobatrachus* e *Ceratophrys*, distribuídas em vários ambientes da América do Sul (Faivovich et al., 2014). O gênero *Ceratophrys* atualmente inclui oito espécies, comumente conhecidas como sapos-de-chifre (Faivovich et al., 2014). *Ceratophrys joazeirensis* Marcadal (1986) foi descrita no município de Juazeiro, no estado da Bahia, Nordeste do Brasil, onde predomina o bioma Caatinga. Até então, *Ceratophrys joazeirensis* era o único representante do gênero *Ceratophrys* no bioma. Recentemente, a distribuição de *Ceratophrys aurita* (Raddi, 1823) foi expandida para a Caatinga (Mira-Mendes et al., 2020). *Ceratophrys joazeirensis* e *C. aurita* são espécies irmãs com baixa divergência genética (Faivovich et al., 2014; Mira-Mendes et al., 2022). No Rio Grande do Norte, *Ceratophrys joazeirensis* é uma espécie de reprodução explosiva e foi observada vocalizando em poças temporárias e permanentes durante a estação chuvosa, com uma dieta onde anuros foram o principal componente (Jorge et al., 2015). Seu canto de anúncio difere do de outras espécies em termos de frequência das notas, ritmo e número de pulsos (Zaidan & Leite, 2012). No entanto, o girino permanecia desconhecido até pouco tempo, quando a morfologia de girinos de Jussara, Bahia, Brazil, foi descrita (Protázio et al., 2025). O estudo da morfologia dos girinos é importante pois eles desempenham um papel chave nos ecossistemas aquáticos e podem ser usados como bioindicadores da qualidade ambiental (Peltzer et al., 2013, FICKEN; BYRNE, 2013). Além disso, os girinos são muito úteis para a identificação das espécies e, dessa forma, a identificação das larvas é chave para trabalhos de inventários de fauna, especialmente para a identificação de espécies de reprodução explosiva e de difícil registro em campo, como *C. joazeirensis* (Jorge et al., 2015). Apesar disso, poucas espécies possuem suas larvas descritas, e a grande maioria é conhecida de apenas uma única localidade, limitando a compreensão da variabilidade geográfica na morfologia, história natural e ecologia das espécies. Neste trabalho, descrevemos a morfologia externa do girino de *Ceratophrys joazeirensis* do município de São Gonçalo do Amarante, no Rio Grande do Norte, Brasil, 926 km nordeste da localidade da recente descrição (Protázio et al., 2025). Nós comparamos a morfologia observada com a descrição recente e com o reportado para outras espécies relacionadas. Por fim, descrevemos também, pela primeira vez, o condrocânio do girino de *C. joazeirensis*, comparando-o com os de outras espécies descritas na literatura.

Metodologia

Nós coletamos girinos, espécimes adultos e observamos o comportamento de *Ceratophrys joazeirensis* em fevereiro de 2020, abril de 2023 e maio de 2024 no Poço de Pedra, município

de São Gonçalo do Amarante (5° 47' 36" Sul, 35° 19' 44" Oeste), estado do Rio Grande do Norte, Brasil, em cinco poças diferentes. Foram feitas medidas de chuva na região nos anos de 2022, 2023 e 2024, tivemos a média de 888,33 mm por ano, porém no ano de 2022 as medidas começaram a ser coletadas no mês de maio. Na poça 1 (5°48'6.06"S, 35°26'11.89"W, aproximadamente 42 m acima do nível do mar; datum WGS-84) e na poça 4 (5°47'42.00"S, 35°27'5.02"W, aproximadamente 41 m acima do nível do mar; datum WGS-84), não coletamos girinos ou adultos; apenas observamos comportamento reprodutivo. Na poça 5 (5°47'8.36"S, 35°27'9.67"W, aproximadamente 61 m acima do nível do mar; datum WGS-84), coletamos 5 espécimes adultos. Na poça 2 (5°48'0.04"S, 35°26'44.33"W, aproximadamente 46 m acima do nível do mar; datum WGS-84), coletamos doze girinos e 1 espécime adulto. Na poça 3 (5°47'48.59"S, 35°26'30.58"W, aproximadamente 45 m acima do nível do mar; datum WGS-84), coletamos apenas dois girinos. Posteriormente, os espécimes foram levados para o Laboratório de Anfíbios e Répteis da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Para a análise morfométrica, utilizamos um paquímetro eletrônico e uma lupa para observar características morfológicas e estimar o estágio de desenvolvimento dos girinos. As medições morfométricas foram baseadas em Pezzuti (2021). Os girinos do gênero *Ceratophrys* possuem características marcantes relacionadas ao hábito carnívoro de suas larvas, incluindo comunicação vocal, possivelmente associada à diminuição do canibalismo, lábios protuberantes e papilas marginais simples que formam uma estrutura serrilhada (NATALE et al., 2011; PROTÁZIO et al., 2025; MIRA-MENDES et al., 2022). Com base nessas características, nas descritas por Protázio et al. 2025, e na ocorrência da espécie em municípios vizinhos (Jorge et al., 2015) e na nossa localidade de estudo, nós inequivocamente identificamos as larvas como girinos da população local de *C. joazeirensis*. As medições morfométricas (em milímetros) e descrições foram baseadas em 14 indivíduos nos estágios 29-41 (Gosner 1960): 29 (n = 3), 30 (n = 1), 31 (n = 3), 32 (n = 2), 33 (n = 1), 34 (n = 3) e 41 (n = 1), a terminologia e a fórmula das fileiras de dentes labiais seguem Altig & McDiarmid. Nós fotografamos os girinos imersos em água utilizando uma plataforma ajustável para apoiar os espécimes em vistas lateral, dorsal e ventral. Nós medimos as seguintes estruturas em milímetros (mínimo–máximo, média $\pm$ desvio padrão): comprimento total (TL; 26,87–97,56, 40,965 $\pm$ 17,06); comprimento do corpo (BL; 11,32–24,35, 15,84 $\pm$ 3,30); altura máxima do corpo na altura do espiráculo (BH; 5,14–13,14, 7,19 $\pm$ 2,06); largura do corpo após o espiráculo (BW; 6,25–15,54, 8,995 $\pm$ 2,37); largura do corpo na altura dos olhos (BWE; 6,1–14,35, 8,68 $\pm$ 2,10); comprimento da cauda (TAL; 12,54–73,21, 25,175 $\pm$ 14,22); altura máxima da nadadeira dorsal (DFH; 2,11–6,19, 2,89 $\pm$ 1,09); altura máxima da nadadeira ventral (VFH; 1,81–5,8, 2,715 $\pm$ 1,02); altura máxima da cauda (MTH; 6,01–15,76, 8,22 $\pm$ 2,64); altura máxima do músculo caudal (TMH; 2,97–7,66, 4,34 $\pm$ 1,24); largura máxima do músculo caudal (TMW; 2,06–5,32, 3,255 $\pm$ 0,90); diâmetro do olho (ED; 1,62–3,14, 2,18 $\pm$ 0,41); distância interorbital (IOD; 3,48–7,36, 4,715 $\pm$ 1,01); distância olho-focinho (ESD; 4,04–7,92, 5,565 $\pm$ 1,12); distância entre as narinas (IND; 1,68–3,45, 2,215 $\pm$ 0,44); distância olho-nariz (END; 1,41–3,88, 2,045 $\pm$ 0,64); distância nariz-espiráculo (NSD; 2,02–5,05, 2,95 $\pm$ 0,77); distância focinho-espiráculo (SSD; 7,35–17,74, 10,195 $\pm$ 2,53). Morfologia externa: Corpo comprimido, oval em vista dorsal e globoso em vista lateral. Focinho oval em vista dorsal e arredondado em vista lateral. Olhos posicionados dorsalmente na direção dorsolateral, assim como as narinas arredondadas, que também estão posicionadas dorsalmente e sem projeções. Espiráculo sinistro, com paredes internas fundidas e localizado abaixo do plano medial. Na maioria dos indivíduos, a inserção da nadadeira dorsal ocorre no terço posterior do corpo e a nadadeira ventral na junção do corpo com a cauda. Nadadeira dorsal levemente arqueada, ventral mais paralela ao eixo corporal. Na maioria dos indivíduos analisados, a ponta da cauda é arredondada ou levemente arredondada, sem constrição; em

um indivíduo, a ponta da cauda estava ausente. O tubo cloacal não foi observado apenas no indivíduo no estágio 41. Boca posicionada anteroventralmente, disco oral possui uma fileira de papilas marginais simples. Papilas submarginais, lacuna na papila marginal e constrição do disco oral ausentes. O bico é córneo e finamente serrilhado. Coloração: Em vida, a região dorsal é marrom-claro, coberta por pontos dourados (FIGURA 2) A região dorsal também possui manchas escuras, mais visíveis na parte dorso-lateral, começando na base da cauda e se estendendo até a região das narinas. A cauda, na visão dorsal, é coberta por manchas escuras, que vão da base até a ponta da cauda. Lateralmente, o corpo mantém a coloração marrom-claro, com poucos pontos dourados e manchas escuras. A musculatura da cauda é marrom-claro, com manchas escuras na porção acima da linha medial, que vai da inserção até a parte terminal da cauda. Pontos dourados são encontrados na musculatura da cauda, tanto abaixo quanto acima da linha medial, com maior concentração no terço posterior da cauda. Notas de história natural Girinos de *Ceratophrys joazeirensis* foram encontrados em poças temporárias formadas após as chuvas, algumas com água mais transparente e outras com água barrenta de coloração amarronzada. As lagoas onde os girinos foram encontrados têm gramíneas como vegetação predominante nas margens, pois são áreas utilizadas por pequenos produtores para criação de animais. Os girinos foram observados em profundidades

Resultados e Discussões

Os girinos de *Ceratophrys joazeirensis* da região de São Gonçalo do Amarante apresentam semelhanças morfológicas com os espécimes coletados na Bahia, especialmente no que se refere à presença de disco oral anterior, espiráculo sinistral com parede fundida, olhos em posição dorsolateral e tubo cloacal medial. Essas características também são compartilhadas com outras espécies do gênero, como *C. aurita* (Raddi), *C. calcarata* (Boulenger), *C. ornata* (bell) *C. cranwelli* (Barrio). A forma do focinho difere entre as populações: em São Gonçalo do Amarante, o focinho é oval em vista dorsal e arredondado em vista lateral, enquanto na população da Bahia é pontudo em vista dorsal e também arredondado lateralmente. Apesar dessa diferença, ambas as populações mantêm semelhança com *C. aurita*, *C. calcarata*, *C. ornata* e *C. cranwelli*. O comprimento total médio dos girinos de *C. joazeirensis* de São Gonçalo do Amarante foi de 40,965 mm, valor inferior ao registrado para os girinos da Bahia (53,59 mm), mas superior ao de *C. aurita*, cuja média é de 32,69 mm. Em relação à fórmula da fileira dentária labial (LTRF), os girinos de São Gonçalo do Amarante apresentam de 7/8 fileiras na região anterior e 7/10 na posterior. Já os girinos da Bahia exibem fórmulas mais complexas, com 9/14 anteriores e 10–14 posteriores. Dados semelhantes foram observados em outras espécies congêneras: *C. calcarata* possui 10 fileiras no lábio posterior, enquanto *C. cornuta* (Linnaeus) apresenta 13 fileiras no lábio anterior. Considerando o número total de fileiras, os girinos de *C. joazeirensis* de São Gonçalo do Amarante variam de 15 a 17, valor próximo ao observado em *C. aurita* (17), mas inferior ao registrado na população baiana da mesma espécie (22 a 28) e em *C. cornuta* (21).

Conclusão

Os girinos de *Ceratophrys joazeirensis* de São Gonçalo do Amarante compartilham várias características morfológicas com a população previamente descrita na Bahia e com espécies congêneras, mas também apresentam diferenças marcantes, especialmente no formato do focinho, no comprimento total médio e na complexidade da fórmula das fileiras dentárias labiais. Esses resultados reforçam a existência de variação intraespecífica e sugerem que

fatores ambientais ou populacionais possam influenciar a morfologia larval. Estudos futuros que incorporem análises moleculares, abordagens de morfometria geométrica e observações em diferentes localidades da Caatinga poderão contribuir para compreender melhor a variabilidade geográfica e o papel ecológico das larvas de *C. joazeirensis*, além de fornecer subsídios importantes para sua conservação.

Referências

- FICKEN, K. L. G.; BYRNE, P. G. Heavy metal pollution negatively correlates with anuran species richness and distribution in south-eastern Australia. *Austral Ecology*, v. 38, p. 523–533, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aec.12000>. Acesso em: 27 maio 2025.
- FAIVOVICH, J., Nicoli, L., Blotto, B.L., Pereyra, M.O., Baldo, D., Barrionuevo, J.S., Fabrezi, M., Wild, E.R. & Haddad, C.F.B. Big, bad, and beautiful: Phylogenetic relationships of the horned frogs (Anura: Ceratophryidae). *South American Journal of Herpetology*, 9, 207–227, 2014. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-14-00032.1>
- JORGE, Jaqueiuto da Silva; SALES, Raul Fernandes Dantas; KOKUBUM, Marcelo Nogueira de Carvalho; FREIRE, Eliza Maria Xavier. On the natural history of the Caatinga Horned Frog, *Ceratophrys joazeirensis* (Anura: Ceratophryidae), a poorly known species of northeastern Brazil. *Phyllomedusa*, v. 14, n. 2, p. 147–156, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v14i2p147-156>.
- MIRA-MENDES, C.V., Dias, J.F., Costa, R.N., Costa, C.A., Silva Neto, E.M., Weber, L.N. & Zina, J. Redescription of the external and internal oral cavity morphology of the tadpole of *Ceratophrys aurita* (Raddi, 1823) (Anura: Ceratophryidae) from the Caatinga domain, Bahia, northeast Brazil. *Zootaxa*, 5124 (5), 594–600, 2022. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5124.5.8>
- NATALE, Guillermo S. et al. Underwater acoustic communication in the macrophagic carnivorous larvae of *Ceratophrys ornata* (Anura: Ceratophryidae). *Acta Zoologica*, v. 92, n. 1, p. 46–53, 2011.
- PELTZER, P. M. et al. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 98, p. 142–151, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651313001812>. Acesso em: 27 maio 2025.
- ZAIDAN, Bárbara Fernandes; LEITE, Felipe Sá Fortes. Advertisement call of the rare, explosive breeding caatinga horned frog *Ceratophrys joazeirensis* Mercadal de Barrio, 1986 (Anura, Ceratophryidae). *Zootaxa*, v. 3540, p. 65–66, 2012. ISSN 1175-5326. Disponível em: <www.mapress.com/zootaxa/>. Acesso em: 12 mar. 2025.

Anexos

Figura 1- Local de coleta dos girinos de *Ceratophrys joazeirensis*. (A) Local de coleta dos girinos de *C. joazeirensis* dentro do domínio da caatinga. (B) Distribuição de *C. joazeirensis* e novo registro (C) Lagoa temporária onde os girinos foram coletados

Figura 2 - Girino de *Ceratophrys joazeirensis*. Em vista dorsal (A) e em vista Lateral (B).

CÓDIGO: SB1392

AUTOR: MARIA LAURA NUNES ROCHA

ORIENTADOR: SIMONE ALMEIDA GAVILAN

TÍTULO: Proposição de protocolo de descalcificação de aparatos auditivos

Resumo

Cetáceos, incluindo golfinhos e baleias, apresentam grande dependência da audição para sobrevivência, utilizando-a para comunicação, ecolocalização e navegação. No entanto, a poluição sonora antrópica, como a proveniente de sondagens sísmicas e sonares, pode causar danos auditivos severos, influenciando inclusive episódios de encalhes. A análise histológica da cóclea é uma ferramenta importante para detectar possíveis lesões auditivas, mas enfrenta o desafio da descalcificação do osso periótico, uma das estruturas mais densas do corpo. Este trabalho tem como objetivo propor e avaliar protocolos de descalcificação de bulas timpânicas de odontocetos coletados em encalhes no litoral do Rio Grande do Norte, visando otimizar a preservação do órgão de Corti e da membrana tectória para análises em microscopia eletrônica de varredura. Serão testados diferentes agentes descalcificantes, como EDTA e RDO®, comparando tempo de processamento e qualidade tecidual. O estudo contribuirá para padronizar procedimentos aplicáveis à realidade brasileira, ampliando a capacidade diagnóstica de lesões auditivas induzidas por ruído em cetáceos e subsidiando ações de conservação.

Palavras-chave: Audição. Golfinhos. Morfologia coclear. Ruído subaquático

TITLE: Proposal of a decalcification protocol for auditory apparatuses

Abstract

Cetaceans, including dolphins and whales, rely heavily on hearing for survival, using it for communication, echolocation, and navigation. However, anthropogenic noise pollution, such as that produced by seismic surveys and sonars, can cause severe auditory damage, even contributing to stranding events. Histological analysis of the cochlea is an important tool to detect possible auditory lesions, but it faces the challenge of decalcifying the periotic bone, one of the densest structures in the body. This study aims to propose and evaluate decalcification protocols for tympanic bullae of odontocetes collected from strandings along the coast of Rio Grande do Norte, in order to optimize the preservation of the organ of Corti and the tectorial membrane for scanning electron microscopy analyses. Different decalcifying agents, such as EDTA and RDO®, will be tested, comparing processing time and tissue quality. The study will contribute to the standardization of procedures applicable to the Brazilian context, expanding the diagnostic capacity for noise-induced auditory lesions in cetaceans and supporting conservation efforts.

Keywords: Hearing; Dolphins; Cochlear morphology; Underwater noise

Introdução

Os cetáceos — grupo que reúne golfinhos (Odontocetis) e baleias (Mysticetis) — estão entre os exemplos mais impressionantes de adaptação ao ambiente aquático dentro dos mamíferos. No Brasil, já foram registradas oito espécies de baleias e 38 de odontocetos, totalizando 46 espécies (Silva Jr. & Silva, 2020). Apesar dessa diversidade, mais da metade das espécies viventes encontra-se ameaçada de extinção segundo a IUCN, sendo a poluição sonora um dos fatores que mais preocupam atualmente.

A audição é essencial para a vida desses animais, pois está diretamente ligada à ecolocalização, à comunicação, à orientação no espaço e às interações sociais (Tyack & Clark, 2000). O ouvido dos cetáceos possui adaptações únicas, como a captação de sons pela mandíbula inferior e a presença de um complexo tímpano-periótico altamente especializado (Thewissen, 2002). No entanto, essa mesma especialização torna o sistema auditivo particularmente sensível à exposição a ruídos intensos e prolongados, capazes de causar alterações morfológicas e funcionais.

Grande parte dessa poluição sonora tem origem em atividades humanas, como tráfego marítimo, prospecção sísmica, exploração de petróleo e gás, além do uso de sonares militares. Tais ruídos podem atingir níveis comparáveis aos de fenômenos naturais extremos, como terremotos ou erupções submarinas (Udoinyang & Igboekwe, 2012). Os canhões sísmicos, por exemplo, chegam a gerar sons de 235–263 dB re 1 μ Pa a 1 m (Vilardo, 2007), muito acima do limiar auditivo dos cetáceos, que varia entre 110 e 190 dB.

Pesquisas recentes mostram que esses sons podem desencadear respostas comportamentais e fisiológicas, como desorientação, alterações na comunicação, queda no sucesso reprodutivo e de forrageamento, além de danos diretos ao ouvido interno (Nowacek et al., 2007; Weilgart, 2020). Em um estudo com *Globicephala melas*, Morell et al. (2017) identificaram lesões no órgão de Corti compatíveis com perda auditiva induzida por ruído, associando esses danos a encalhes em massa. Contudo, tais alterações só podem ser confirmadas por análises histológicas detalhadas, já que ocorrem em nível celular e são altamente suscetíveis à degradação após a morte.

A investigação do sistema auditivo em cetáceos encalhados depende, portanto, de protocolos rigorosos que garantam a preservação da cóclea e das células sensoriais. O maior desafio é descalcificar o osso periótico, uma das estruturas mais densas do corpo desses animais. Assim, protocolos específicos de fixação e descalcificação são indispensáveis para análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV), permitindo identificar possíveis lesões associadas ao trauma acústico.

Diante disso, este projeto tem como objetivo propor e padronizar um protocolo de descalcificação das bulas timpânicas de odontocetos encontrados no litoral do Rio Grande do Norte. Os resultados irão compor um esforço mais amplo de caracterização da morfologia auditiva de cetáceos e de detecção de lesões relacionadas à poluição sonora marinha, contribuindo para estratégias de conservação da biodiversidade e para o desenvolvimento de políticas públicas voltadas à mitigação desse impacto nos oceanos.

Metodologia

O projeto foi desenvolvido analisando-se animais encalhados, mortos (códigos 2 e 3, conforme Geraci & Lounsbury, 1993) ou que vieram à óbito na reabilitação, registrados no litoral do Rio Grande do Norte. Essas amostras foram disponibilizado pelo Projeto Cetáceos da Costa Branca – UERN (PCCB-UERN) a partir de dados coletados no monitoramento de praias realizado na Bacia Potiguar (PMP-BP).

Necropsias e coleta dos aparatos auditivos

Durante as necropsias, as bulas timpânicas foram removidas conforme o protocolo descrito por Ketten (2007). Cada amostra foi devidamente identificada (lado direito e esquerdo), com registro da espécie, sexo, medidas biométricas e local do encalhe. Em seguida, foram acondicionadas em formalina tamponada a 10% para preservação inicial e início no protocolo de descalcificação.

Perfusão e fixação

Antes da imersão total no fixador, a cóclea foi perfundida com formalina tamponada a 10% pelas janelas redonda e oval, de acordo com Morell & André (2009). Essa técnica favorece a penetração do fixador e garante melhor preservação da estrutura do órgão de Corti.

Descalcificação

A etapa mais crítica é a descalcificação do osso periótico, que apresenta alta densidade e dificulta o acesso às estruturas internas. Para esse fim, utilizou-se o protocolo de Morell et al. (2017), com EDTA a 14% em pH 7,4, em temperatura ambiente, com trocas de solução a cada 7–9 dias. O tempo de descalcificação foi monitorado para cada amostra, variando conforme a espécie.

DESIDRATAÇÃO E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV):

Ao final do processo de descalcificação cada bula é dissecada – enquanto o outro lado permanece refrigerado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e paraformol caso seja necessário refazer o MEV – e desidratado por uma bateria de álcoois (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e 100%), seguido por secagem em aparelho de ponto crítico e metalização com ouro-paládio para realização da análise microscópica de varredura.

Resultados e Discussões

Foram analisadas bulas timpânicas de sete espécies de odontocetos coletados pelo Projeto de Monitoramento de Praia da Bacia Potiguar (PMP-BP). Os tempos de descalcificação variaram entre 57 e 84 dias, dependendo da espécie e do tamanho corporal (Tabela 1). Os menores tempos foram registrados para *Stenella longirostris*, *Stenella clymene* e *Globicephala macrorhynchus*, todas com cerca de 57 dias. Já os maiores tempos corresponderam a *Kogia* sp. (84 dias), *Sotalia guianensis* (70–81 dias) e *Peponocephala electra* (81 dias). O exemplar de *Tursiops truncatus* apresentou tempo intermediário, de 78 dias.

Esses resultados confirmam que o tempo de descalcificação não é uniforme entre espécies, refletindo diferenças de tamanho, espessura e densidade óssea do complexo timpano-periótico. Conclusões

Conclusão

O estabelecimento de protocolos de descalcificação por espécies de odontocetos foi definidos para 7 espécies, cujos indivíduos encalharam no litoral potiguar. Destaca-se a importância da definição dessas variações temporais interespecíficas para a descalcificação das bulas, de forma a promover um processo de dissecação adequado preservando a estrutura coclear. Tal investigação configura-se como uma importante medida em prol da conservação do grupo dos cetáceos e funcionamento saudável do ecossistema marinho.

Por fim, o tipo de avaliação de impacto, realizada pela equipe do Laboratório de Morfofisiologia da UFRN, tem um caráter pioneiro no Brasil e busca contribuir como uma alternativa para prover informações ao licenciamento ambiental e promoção de um desenvolvimento econômico mais sustentável, garantindo a conservação da biodiversidade e manutenção do equilíbrio dos ecossistemas.

Referências

- Morell, M. et al. Implementation of a method to visualize noise-induced hearing loss in mass stranded cetaceans. *Scientific Reports*, 7:41848, 2017.
- Callis, G.; Sterchi, D. Decalcification of bone: literature review and practical study of various decalcifying agents, methods, and their effects on bone histology. *J Histotechnol*, 21:49–58, 1998.
- Ketten, D. R. The marine mammal ear: specializations for aquatic audition and echolocation. In: *Sensory Systems of Aquatic Mammals*. 2007.
- Nowacek, D. P. et al. Behavioral responses of cetaceans to anthropogenic noise. *Mammal Rev.* 2007.
- Weilgart, L. The impacts of anthropogenic ocean noise on cetaceans and implications for management. *Can. J. Zool.*, 2020.
- Silva-Jr, J. M.; Silva, F. J. *Mamíferos aquáticos do Brasil*. 2020.
- Udoinyang, I.; Igboekwe, M. *Environmental impacts of marine seismic surveys*. 2012.
- Vilardo, F. *Sismologia aplicada à exploração sísmica*. 2007.

Anexos

Tempo de descalcificação de cada espécie

CÓDIGO: SB1394

AUTOR: CECÍLIA LAIZ FARIAS TORRES

ORIENTADOR: VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI

TÍTULO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA EXPOSIÇÃO À N,N-DIMETILTRIPTAMINA DURANTE A GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO NAS MÃES

Resumo

A depressão pós-parto é associada a alterações hormonais e fisiológicas que podem evoluir para quadros graves, como a psicose. Estudos recentes indicam o potencial terapêutico da N,N-dimetiltriptamina (DMT) em depressão resistente ao tratamento, pela sua ação em receptores serotoninérgicos e indução de neuroplasticidade. No entanto, faltam evidências sobre sua eficácia e segurança no período gestacional e pós-parto. Este estudo avaliou os efeitos antidepressivos da administração intermitente de DMT (5 e 10 mg/kg) em ratas Wistar. As fases do ciclo estral foram monitoradas por esfregaços vaginais, e o comportamento foi analisado por testes de labirinto em cruz elevado, campo aberto e nado forçado. A análise estatística utilizada foi a estatística descritiva a fim de realizar os cálculos das médias, erro padrão e erro padrão da média para fazer comparações entre os grupos. Os resultados obtidos mostraram que os grupos sob tratamento apresentaram comportamentos mais ansiosos durante os testes do que o grupo controle, sugerindo que a dose utilizada teve um efeito ansiogênico. Entretanto, durante o teste de nado forçado os animais apresentaram menor média de imobilidade maior média de climbing. Portanto, são necessários mais estudos e uma adaptação da dose do psicodélico para chegar ao resultado esperado.

Palavras-chave: Depressão. Ansiedade. Pós-parto. Comportamento. DMT. Gestação. Ratos.

TITLE: EVALUATION OF THE BEHAVIORAL EFFECTS OF EXPOSURE TO N,N-DIMETHYLTRIPTAMINE DURING PREGNANCY AND LACTATION IN MOTHERS

Abstract

Postpartum depression is associated with hormonal and physiological changes that can progress to severe conditions, such as psychosis. Recent studies indicate the therapeutic potential of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in treatment-resistant depression due to its action on serotonergic receptors and induction of neuroplasticity. However, there is a lack of evidence regarding its efficacy and safety during the gestational and postpartum periods. This study evaluated the antidepressant effects of intermittent administration of DMT (5 and 10 mg/kg) in Wistar rats during gestation and lactation. The phases of the estrous cycle were monitored through vaginal smears, and behavior was analyzed using the elevated plus maze, open field, and forced swim tests. The statistical analysis used was descriptive statistics in order to calculate the means, standard error, and standard error of the mean for comparisons between groups. The results showed that the treated groups exhibited more anxious behaviors during the tests compared to the control group, suggesting that the administered dose had an anxiogenic effect. However, during the forced swim test, the animals showed a lower

immobility average and a higher climbing average. Therefore, further studies and dose adjustments of the psychedelic are necessary to achieve the expected outcome.

Keywords: Depression. Anxiety. Postpartum. DMT. Pregnancy. Behavior. Rats.

Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), apesar dos transtornos depressivos serem comuns tanto em homens quanto em mulheres, a taxa de incidência em mulheres se mostra mais alta do que em homens. Dentre esse grupo mais afetado, é fundamental citar a depressão pós parto, condição que causa profunda tristeza e falta de esperança, podendo também levar a complicações que podem evoluir para formas mais agressivas e extremas, como a psicose pós parto (Ministério da Saúde, s.d.). O período seguinte do parto é marcado por diversas alterações fisiológicas, incluindo grandes alterações hormonais, e essas mudanças abruptas podem estar relacionadas ao aumento da suscetibilidade do indivíduo a evolução para quadros de transtornos de humor devido ao papel crucial desses hormônios na neurobiologia durante o período pós-parto (PAYNE; MAGUIRE, 2019). De acordo com Gopalan et al. (2022), o diagnóstico e o tratamento para as mães que sofrem dessa condição é essencial, visto que, a depressão causa efeitos deletérios para a qualidade de vida da mãe e dos seus filhos.

Nesse viés, o uso dos psicodélicos como o N,N-dimetiltriptamina (DMT) vêm sendo um alvo de pesquisa para casos de depressão resistentes ao tratamento (KAMAL; JHA; RADHAKRISHNAN, 2023), o DMT é um composto psicodélico encontrado em plantas animais e humanos que possui propriedades que atuam na neuroplasticidade através da ativação de receptores intracelulares, na atividade e eficiência da monoamina oxidase (MAO), entre outras vias (SCHIMMELPFENNIG; JANKOWIAK-SIUDA, 2025). Essa triptamina atua principalmente nos receptores 5-TH1A e 5-TH2A e estudos mostram que uma única exposição ao DMT podem causar melhoras rápidas e sustentadas nos sintomas de depressão, ansiedade e estresse (RECKWEG; UTHAUG; SZABO et al., 2022). Entretanto, ainda não existem evidências o suficiente que garantam a eficácia do tratamento com DMT durante a gestação ou no período pós-parto, assim justificando a necessidade desse plano de pesquisa. Esse plano de trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que a DMT favoreça um efeito do tipo antidepressivo no período pós-parto. Para essa finalidade, foram avaliados os efeitos comportamentais da administração prolongada intermitente (17 doses, a cada 3 dias) de doses de DMT (de acordo com os dados que estavam sendo obtidos, as doses foram ajustadas para 5mg/Kg em um grupo tratamento e 10mg/Kg em outro grupo tratamento). Nesse trabalho inicial, o principal objetivo era entender o efeito do DMT nas ratas adultas.

Metodologia

2.1 Animais:

Ratas Wistar, com idade de 90 ± 10 dias, fornecidas pelo Departamento de Biofísica e Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), serão mantidas em pares em caixas de polipropileno ($41 \times 34 \times 18$ cm), sob ciclo claro-escuro de 12h, umidade relativa de 70–80% e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais terão acesso ad libitum à ração

padrão e água. O projeto terá início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN.

2.2 Esfregaços vaginais:

Esfregaços vaginais serão realizados seguindo a técnica citológica descrita por Marcondes et al. (2002). O canal vaginal será lavado com uma pipeta de Pasteur embebida em solução salina (NaCl 0,9%), introduzida suavemente. O fluido coletado será depositado em lâmina de vidro e corado com Azul de Metileno (0,004%) para análise em microscópio óptico (objetiva 10×). Com base na proporção de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos, as fases do ciclo estral serão classificadas como proestro, estro, metaestro e diestro.

2.3 Droga:

O fumarato de dimetiltriptamina (DMT) sólido (2:1) será preparado conforme protocolo anterior e armazenado no escuro a -20°C. Antes da administração, a DMT será solubilizada em solução salina 0,9%, usada como veículo no grupo controle. A dose administrada será de 1mg/kg via intraperitoneal, inicialmente com volume de 1 mL/kg, seguindo Cameron et al. (2019). Porém, as doses foram ajustadas de acordo com os resultados que foram sendo obtidos, sendo um grupo com volume de 5mg/kg e outro grupo com 10mg/kg.

2. 4 Testes comportamentais:

De acordo com as possibilidades de execução, os testes propostos e realizados foram: labirinto em cruz elevado, campo aberto, pré-teste de nado forçado, teste de nado forçado.

- Labirinto em cruz elevado: aparelho de madeira elevado a 50cm, com quatro braços (50 × 10 × 40 cm) e plataforma central (10 × 10cm), iluminação baixa (luz vermelha) e temperatura de 22±1°C. Cada animal será colocado na plataforma central por 5 minutos. Serão analisadas porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos (ansiedade) e número de entradas nos braços fechados (atividade locomotora). Limpeza após cada sessão com álcool 5% (Pellow et al., 1985).

- Campo aberto: quadrado de madeira (60 × 60 × 60cm) com piso preto e paredes brancas, luz amarela e 22±1°C. Cada animal explorará o aparato por 15 minutos. A gravação será feita para análise posterior com o software ANY-MAZE (Stoelting, USA), avaliando distância percorrida e velocidade média (Seibenhener; Wooten, 2015).

- Nado forçado: balde plástico com 20L de água a 20±1°C, profundidade 30 cm. Pré-teste de 15 minutos e teste principal de 5 minutos após 24h. Tempo de imobilidade e movimentos de escalada serão registrados manualmente (Porsolt; Le Pichon; Jalfre, 1977).

2.5 Análise estatística:

A análise foi feita através da estatística descritiva, a fim de comparar as médias, erro padrão e erro padrão das médias entre os grupos. O software utilizado foi o GraphPad Prism 08.

Resultados e Discussões

Alguns vídeos dos testes comportamentais foram perdidos durante a gravação devido a problemas técnicos. Isso fez com que esses animais não pudessem ser incluídos nos resultados. Em relação a análise estatística, foram feitos os cálculos da estatística descritiva, incluindo média, desvio padrão e erro padrão da média para comparação entre os grupos.

3.1 Labirinto em cruz elevado

No teste do Labirinto em Cruz Elevado, observou-se diferenças relevantes entre os grupos controle e os tratados com DMT (5 mg/kg e 10 mg/kg). O grupo controle apresentou média de $7,17 \pm 3,06$ entradas em braços fechados, $3,83 \pm 2,93$ entradas em braços abertos, $12,0 \pm 4,36$ passagens em braços abertos e tempo médio de $58 \pm 52,8$ s nos braços abertos. Esses valores indicam um comportamento intermediário em termos de exploração e ansiedade.

O grupo DMT 5 mg/kg apresentou $8,33 \pm 2,16$ entradas em braços fechados, porém uma média de apenas $0,83 \pm 0,98$ entradas em braços abertos, $7,0 \pm 2,16$ passagens em braços abertos e $13,3 \pm 14,6$ s de permanência nos braços abertos. Esses resultados sugerem redução marcante da exploração dos braços abertos, possivelmente refletindo maior comportamento ansioso em relação ao controle. Já o grupo DMT 10 mg/kg apresentou $6,8 \pm 1,92$ entradas em braços fechados, $1,2 \pm 0,83$ entradas em braços abertos, $7,0$ passagens em braços abertos (sem desvio padrão calculado, devido a valores ausentes) e $19,4 \pm 16,2$ s de permanência nos braços abertos. Em comparação com o grupo de 5 mg/kg, houve discreto aumento no tempo em braços abertos, mas ainda inferior ao grupo controle.

De forma geral, os resultados do LCE sugerem que o DMT, especialmente na dose de 5 mg/kg, reduziu a exploração dos braços abertos, indicando um aumento do comportamento ansioso em relação ao grupo controle.

3.2 Nado forçado

No grupo Controle, a imobilidade média foi de $153,75 \pm 61,45$ s (erro padrão 21,73), enquanto o tempo médio gasto em climbing foi de $145 \pm 67,24$ s (erro padrão 23,77). O grupo DMT 5 mg/kg apresentou aumento da imobilidade média ($195,14 \pm 70,80$ s, erro padrão 26,76) em relação ao controle, enquanto o tempo de climbing diminuiu ($102,43 \pm 72,22$ s, erro padrão 27,30). Essa alteração sugere que a dose de 5 mg/kg promove um aumento na passividade e redução do comportamento ativo no teste, indicando possível efeito depressor em situações de estresse.

O grupo DMT 10 mg/kg apresentou comportamento intermediário, com imobilidade média de $121,25 \pm 30,15$ s (erro padrão 15,08) e climbing de $178,75 \pm 30,11$ s (erro padrão 15,06). Comparado ao controle e ao grupo de 5 mg/kg, os animais tratados com a dose maior demonstraram menor imobilidade e maior atividade de climbing, sugerindo que a dose mais elevada poderia modular o comportamento de enfrentamento, possivelmente atualmente como uma dose com maior efeito antidepressivo do que a 5mg/kg

A dose de 5mg/kg parece aumentar a imobilidade e reduzir a atividade de enfrentamento, enquanto a dose de 10 mg/kg diminui a imobilidade e aumenta o comportamento ativo, aproximando os resultados do controle. Essa tendência sugere que o DMT pode exercer efeitos moduladores sobre o comportamento de estresse, com intensidade variável de acordo com a dose administrada.

3.3 Campo aberto

Os resultados do teste de campo aberto foram avaliados em termos de distância total percorrida e velocidade média, comparando o grupo controle com os animais tratados com DMT em doses de 5mg/kg e 10mg/kg. No grupo controle, a distância total média percorrida foi de $42,57 \pm 20,91$ cm (erro padrão 8,54), enquanto a velocidade média foi de $0,142 \pm 0,070$ cm/s (erro padrão 0,028).

O tratamento com DMT a 5mg/kg resultou em redução da distância total percorrida (média $34,18 \pm 7,20$ cm, erro padrão 2,72) e da velocidade média ($0,114 \pm 0,024$ cm/s, erro padrão 0,009), em comparação com o grupo controle. No grupo DMT 10 mg/kg, a distância total média foi de $32,82 \pm 7,02$ cm (erro padrão 4,96) e a velocidade média de $0,110 \pm 0,023$ cm/s (erro padrão 0,0165). Os valores foram semelhantes aos observados na dose de 5 mg/kg, sugerindo que o aumento da dose não causou alterações adicionais significativas na locomoção. Os dados coletados sugerem que o tratamento com DMT reduziu a atividade locomotora espontânea em comparação ao grupo controle.

3.4 Discussão dos resultados

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que, durante esse estudo, o N,N-dimetiltriptamina teve o resultado oposto ao esperado, visto que, durante os testes realizados, os animais tratados tiveram comportamentos relacionados à ansiedade de forma mais notória do que o grupo controle nos três testes realizados.

O teste labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para observar alterações comportamentais relacionadas à ansiedade em roedores. A ansiedade nesse é avaliada por comportamentos aversivos para os braços abertos do labirinto, são utilizados como parâmetros principalmente o número de entradas no aberto e o tempo passado no aberto (DANDUGA; KOLA, 2024). No teste realizado nesse estudo, os animais dos grupos tratados apresentaram menor tempo no aberto e menor número de entradas no aberto, sugerindo assim que o tratamento gerou um comportamento ansiogênico. Evidências adicionais na literatura corroboram esses achados, sugerindo que doses elevadas de DMT podem induzir comportamento ansioso em roedores

A partir do paper "Effects of N,N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression" de Cameron et al. (2018), foi observado que doses de DMT 10mg/Kg podem, inicialmente, ter um efeito ansiogênico nos animais tratados incluindo em testes como o labirinto cruz elevado, em que os ratos tratados com DMT a 10mg/kg tiveram o tempo de passagem no braço aberto reduzido em relação ao grupo controle

Durante o teste do campo aberto, os animais sob tratamento apresentaram um comportamento exploratório reduzido, no qual os grupos tratados tiveram médias significativamente menores em relação à distância total, sugerindo assim um aumento do comportamento ansioso do animal.

Segundo MARTINS et al. (2025), o teste de nado forçado avalia o comportamento através dos parâmetros imobilidade e "climbing" depressivo em roedores, substâncias com capacidade antidepressiva tendem a reduzir significativamente a imobilidade nesses animais. Durante o teste de nado forçado, os roedores sob dose 10mg/kg apresentaram menor média de imobilidade e média de climbing, assim sugerindo um comportamento dose-dependente sobre o comportamento de enfrentamento ao estresse e que indica que a dose utilizada gerou a redução dos comportamentos relacionados a depressão nas ratas.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que o DMT modula comportamentos locomotores e de enfrentamento ao estresse em ratos de forma dose-dependente. No labirinto em cruz elevado e no campo aberto, os grupos tratados apresentaram menor exploração e atividade locomotora, sugerindo efeitos ansiogênicos. Entretanto, no nado forçado, a dose de 5 mg/kg aumentou a imobilidade, enquanto 10 mg/kg reduziu a imobilidade e aumentou o climbing, evidenciando uma redução da passividade e comportamento de enfrentamento mais ativo. Esses achados corroboram os resultados de Cameron et al. (2018), que mostraram que o DMT pode reduzir comportamentos associados à ansiedade e depressão em modelos animais. Assim, o estudo reforça o potencial do DMT como modulador de respostas emocionais e comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão.

Os dados coletados neste trabalho sugerem que as doses utilizadas nesse trabalho causaram um efeito oposto ao esperado durante o teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado, porém causaram um efeito considerado antidepressivo durante o teste do nado forçado. Outros dados da literatura corroboram com esses achados, sugerindo que a depender da dose e do teste utilizado, o DMT pode apresentar efeitos ansiogênicos inicialmente e ansiolíticos e antidepressivos posteriormente, também a depender do teste proposto.

Para uma reestruturação desse trabalho e para a análise durante a gestação e lactação serão necessários mais estudos e um ajuste da dose a fim de encontrar os resultados esperados.

Referências

- CAMERON, L. P.; BENSON, C. J.; DUNLAP, L. E.; OLSON, D. E. Effects of N, N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 9, n. 7, p. 1582–1590, jul. 2018. DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00134. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196340/>. Acesso em: 20 ago. 2025.
- DANDUGA, Ravi Chandra Sekhara Reddy; KOLA, Phani Kumar. Elevated Plus Maze for Assessment of Anxiety and Memory in Rodents. In: RAY, Swapan K. (Ed.). *Neuroprotection. Methods in Molecular Biology*, v. 2761, p. 93–96. New York, NY: Humana, 2024. DOI: 10.1007/978-1-0716-3662-6_8.
- GOPALAN, P.; SPADA, M. L.; SHENAI, N.; et al. Postpartum depression—Identifying risk and access to intervention. *Current Psychiatry Reports*, v. 24, n. 12, p. 889–896, dez. 2022. DOI: 10.1007/s11920-022-01392-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36422834/>. Acesso em: 23 ago. 2025.
- KAMAL, Shubham; JHA, Manish Kumar; RADHAKRISHNAN, Rajiv. Role of Psychedelics in Treatment-Resistant Depression. *Psychiatric Clinics of North America*, v. 46, n. 2, p. 291–305, jun. 2023. Epub March 25, 2023. DOI: 10.1016/j.psc.2023.02.004

LUAN, L. X.; et al. Psychological and physiological effects of extended DMT. *Journal of Psychopharmacology*, v. 38, n. 1, p. 56–67, jan. 2024. DOI: 10.1177/02698811231196877. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37897244/>

. Acesso em: 20 ago. 2025.

MARTINS, T.; RAMOS-HRYB, A. B.; DA SILVA, M. A. B.; et al. Antidepressant effect or bias? Systematic review and meta-analysis of studies using the forced swimming test. *Behavioural Pharmacology*, v. 36, n. 6, p. 347–363, set. 2025. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000844.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Depressão pós-parto. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/saude-de-a-z/depressao-pos-parto>

. Acesso em: 26 ago. 2025.

NUTT, D. J.; PEILL, J. M.; WEISS, B.; GODFREY, K.; CARHART-HARRIS, R. L.; ERRITZOE, D. Psilocibina e outros psicodélicos clássicos na depressão. In: BROWNING, M.; COWEN, P. J.; SHARP, T. (orgs.) *Neurobiologia emergente de tratamentos antidepressivos. Tópicos atuais em neurociências comportamentais*, vol. 66. Cham: Springer, 2023. DOI: 10.1007/7854_2023_451.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Depressive disorder (depression). 29 ago. 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>

. Acesso em: 20 ago. 2025.

PAYNE, J. L.; MAGUIRE, J. Pathophysiological mechanisms implicated in postpartum depression. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 52, p. 165–180, jan. 2019. DOI: 10.1016/j.yfrne.2018.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30552910/>

. Acesso em: 20 ago. 2025.

RECKWEG, J. T.; UTHAUG, M. V.; SZABO, Á.; DAVIS, A. K.; LANCELOTTA, R.; MASON, N. L.; RAMAEKERS, J. G. The clinical pharmacology and potential therapeutic applications of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT). *Journal of Neurochemistry*, v. 162, n. 1, p. 128–146, jul. 2022. DOI: 10.1111/jnc.15587. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35149998/>

. Acesso em: 21 ago. 2025.

SCHIMMELPFENNIG, Jakub; JANKOWIAK-SIUDA, Kamila. Exploring DMT: Endogenous role and therapeutic potential. *Neuropharmacology*, v. 268, art. 110314, Jan. 18 2025. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2025.110314.

Anexos

Figura 1 - Média e erro padrão da média de entradas no aberto no labirinto em cruz elevado

Figura 2 - média e erro padrão da média do tempo no aberto (labirinto em cruz elevado)

Figura 3 - Média e EPM da distância total (campo aberto)

Figura 4 - Média e EPM da velocidade média (campo aberto)

Figura 5 - Média e EPM da imobilidade (nado forçado)

Figura 6 - Média e EPM do climbing (nado forçado)

CÓDIGO: SB1400

AUTOR: ALICE CRISTINE BEZERRA DE SOUZA

COAUTOR: HILDA RAIANNE SILVA DE MELO

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Efeito da estrutura da paisagem na comunidade de aves nos ambientes tropicais úmidos e secos na América do Sul

Resumo

A perda e a fragmentação de habitats ameaçam fortemente a biodiversidade, sobretudo em ecossistemas tropicais, onde o desmatamento compromete serviços essenciais como regulação climática, qualidade do ar e disponibilidade de água. Apesar disso, há escassez de estudos em florestas tropicais secas, enquanto pesquisas em regiões temperadas e úmidas predominam, dificultando a generalização dos impactos ecológicos. Este estudo sintetiza o conhecimento sobre como a estrutura da paisagem influencia comunidades de aves em florestas tropicais da América do Sul. Foi realizada uma revisão sistemática em bases científicas, analisando métricas ecológicas da paisagem e seus efeitos sobre aves. Dos 625 estudos encontrados, apenas 19 atenderam aos critérios, sendo 16 em florestas úmidas e 3 em secas, evidenciando forte desigualdade no esforço de pesquisa. Os resultados mostram que, em florestas úmidas, a cobertura e a qualidade da paisagem exercem efeitos geralmente positivos sobre diversidade e uso de habitat, enquanto em florestas secas as respostas foram mais limitadas, inconsistentes ou negativas, sugerindo lacunas no entendimento desses ecossistemas. Assim, a síntese evidencia o desequilíbrio entre ambientes e a necessidade urgente de ampliar pesquisas em florestas tropicais secas para orientar estratégias de conservação mais eficazes na América do Sul.

Palavras-chave: Ecologia da paisagem; aves neotropicais; fragmentação florestal;

TITLE: Effect of landscape composition on bird communities in tropical wet and dry forest environments in South America.

Abstract

Habitat loss and fragmentation seriously threaten biodiversity, especially in tropical ecosystems, where deforestation compromises essential services such as climate regulation, air quality, and water availability. Despite this, studies in dry tropical forests are scarce, while research in temperate and humid regions predominates, making it difficult to generalize ecological impacts. This study synthesizes knowledge on how landscape structure influences bird communities in South American tropical forests. A systematic review was conducted based on scientific evidence, analyzing landscape ecological metrics and their effects on birds. Of the 625 studies found, only 19 met the criteria, 16 in humid forests and 3 in dry forests, highlighting a significant imbalance in research effort. The results show that, in humid forests, landscape cover and quality have generally positive effects on diversity and habitat use, while in dry forests, the responses were more limited, inconsistent, or negative, suggesting gaps in understanding these ecosystems. Thus, the synthesis highlights the

imbalance between environments and the urgent need to expand research in dry tropical forests to guide more effective conservation strategies in South America.

Keywords: Landscape ecology; neotropical birds; forest fragmentation.

Introdução

A perda e a fragmentação de habitat estão entre as principais causas de declínio da biodiversidade em escala global, representando uma ameaça direta à manutenção de espécies e processos ecológicos fundamentais (Hansen, 2013; Pimm & Raven, 2000). Esses processos decorrem, sobretudo, da expansão agrícola, da urbanização e de outros usos antrópicos do solo, levando à substituição de florestas contínuas por mosaicos heterogêneos de fragmentos florestais e matrizes de diferentes qualidades. O resultado é a alteração da conectividade entre habitats, a redução da disponibilidade de recursos e a intensificação de efeitos de borda, que em conjunto comprometem a persistência das espécies em médio e longo prazo.

Nas regiões tropicais, tais impactos adquirem maior relevância. Esses ambientes concentram uma elevada proporção da biodiversidade mundial e prestam serviços ecossistêmicos essenciais, como o sequestro de carbono, a regulação climática e a manutenção da qualidade hídrica (IPBES, 2019). A Amazônia, por exemplo, desempenha um papel vital no regime de chuvas da América do Sul, mas encontra-se sob crescente ameaça do desmatamento e da degradação florestal. Estima-se que sua resiliência esteja próxima de um ponto de inflexão, no qual a perda de cobertura vegetal pode desencadear alterações irreversíveis no equilíbrio ambiental (Lovejoy & Nobre, 2018).

Embora os estudos sobre paisagens tropicais tenham avançado, observa-se uma lacuna significativa entre os diferentes tipos de florestas. As florestas tropicais úmidas, como a Amazônia e a Mata Atlântica, têm sido amplamente investigadas, enquanto as florestas tropicais secas permanecem menos estudadas, apesar de sua importância ecológica e vulnerabilidade (Dirzo et al., 2014; Malhi et al., 2014). Essas florestas secas, que incluem formações como a Caatinga brasileira, são caracterizadas por forte sazonalidade hídrica, baixa resiliência frente à degradação e elevada dependência das comunidades humanas locais. O contraste entre a densidade estrutural e a complexidade da vegetação de florestas úmidas, em comparação com a menor heterogeneidade e resiliência das florestas secas, sugere que as respostas ecológicas à fragmentação podem variar substancialmente entre esses ambientes.

Nesse contexto, a ecologia de paisagem oferece ferramentas poderosas para compreender como a estrutura espacial dos habitats influencia os padrões de diversidade biológica. Métricas de composição, como cobertura florestal e proporção de diferentes usos da terra, e métricas de configuração, como conectividade e forma dos fragmentos, permitem avaliar de forma quantitativa os efeitos da fragmentação e orientar estratégias de conservação (Arroyo-Rodríguez et al., 2019). Entre os diferentes grupos biológicos, as aves têm se destacado como excelentes bioindicadores por apresentarem alta mobilidade, respostas rápidas às alterações ambientais e funções ecológicas essenciais, incluindo polinização, dispersão de sementes e controle de populações de insetos (Alves et al., 2020).

No entanto, ainda existem limitações relevantes. Muitos estudos apresentam vieses geográficos e taxonômicos, concentrando-se em ambientes temperados e em poucas famílias de aves, o que dificulta a generalização dos padrões encontrados. Em ambientes de florestas tropicais secas, por exemplo, são escassos os trabalhos que analisam de maneira sistemática as interações entre composição da paisagem e resposta das comunidades de aves. Esse

cenário evidencia a necessidade de ampliar os esforços de pesquisa em regiões tropicais, considerando tanto a diversidade estrutural quanto a heterogeneidade espacial dessas florestas.

Diante disso, este estudo tem como objetivo investigar como a composição da paisagem influencia as comunidades de aves em florestas tropicais úmidas e secas da América do Sul, a partir de uma revisão sistemática da literatura científica. Busca-se identificar padrões de resposta das aves frente às mudanças na cobertura e fragmentação.

Metodologia

Área de estudo
A América do Sul possui cerca de 17.814.000 km² de extensão, sendo o quarto maior continente do mundo em área territorial, formada por 12 países independentes: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (Ramos et al., 1999; WORLD BANK, 2023). Localiza-se majoritariamente no hemisfério sul, atravessada pela Linha do Equador e pelo Trópico de Capricórnio, o que resulta em grande diversidade de climas e ecossistemas (Antonelli & Sanmartín, 2011).

No presente estudo, foram consideradas duas formações florestais: as florestas tropicais úmidas (FTU) e as florestas tropicais sazonais secas (FTSS). As FTU abrangem regiões como a Amazônia, a Mata Atlântica e florestas montanas andinas, caracterizando-se por clima quente e úmido, com precipitação anual superior a 2.000 mm, dossel contínuo e alta diversidade biológica (Ramos et al., 1999). As FTSS ocorrem em áreas como o Chaco, a Caatinga e zonas sazonais dos Andes, apresentando clima tropical sazonal, longos períodos de estiagem e precipitação anual entre 500 e 1.500 mm, além de estrutura ecológica mais simplificada (Menino et al., 2015).

Coleta de dados

A partir dos resultados das buscas bibliográficas, foram registradas informações relevantes em planilhas eletrônicas (Excel), incluindo título, autor(es), ano de publicação, periódico. Em seguida, os artigos foram classificados manualmente quanto à adequação ao tema, garantindo que apenas aqueles alinhados aos objetivos da revisão sejam incluídos na análise. Foram extraídos dados específicos, como tipos de abordagem (espécie, família, população, comunidade, grupos funcionais), variável resposta (abundância, riqueza), tipo de método utilizado para a captura e registro das aves, país, escala de estudo, métricas de paisagem utilizadas e bem como o efeito (positivo, negativo e nulo) das métricas de composição da paisagem nas aves, ano, país, tipo de ambiente (FTU, FTSS).

Sintetizamos os resultados, registrando se houve efeito ou não, e a direção dos efeitos significativos (positivos ou negativo). Não realizamos uma meta-análise formal porque não estamos tentando estimar o efeito do tamanho de cada variável da composição da paisagem em cada resposta, mas apenas resumir o número (e direção) de efeitos significativos documentados até o momento.

Resultados e Discussões

Encontramos 625 artigos, destes selecionamos 19 artigos e excluímos 606 estudos que não utilizavam uma abordagem paisagística sobre as aves. Dos 19 estudos encontrados, 16 foram realizados em ambiente de floresta tropical úmida e 3 em ambientes de floresta tropical seca. O ano de publicação dos estudos, variou de 2008 a 2024, com maior publicação para o ano de 2024 (n=4) (fig. 1).
Figura 1. Distribuição temporal das publicações sobre aves com abordagem paisagística no período de 2008 a 2024.

Nos 19 estudos analisados, foram identificadas 107 respostas sobre o efeito da estrutura da paisagem nas aves, das quais 94 correspondem a florestas tropicais úmidas e 13 a espécies de florestas tropicais secas. Esses dados indicam uma predominância de investigações em ambientes úmidos, possivelmente refletindo tanto a maior disponibilidade de dados quanto o histórico de priorização de pesquisa nesses ecossistemas.

A análise de estudos realizados em florestas tropicais úmidas revelou que as métricas de composição da paisagem influenciam de maneira diferenciada as respostas das aves (fig. 2). A cobertura florestal (fig. 2A) apresentou, em geral, efeito positivo sobre variáveis relacionadas à diversidade (funcional e taxonômica), eventos de dispersão, riqueza de espécies, similaridade e uso do habitat, sugerindo que a manutenção e ampliação de áreas florestadas favorecem a integridade ecológica das comunidades de aves. Resultados semelhantes foram observados por Tinoco et al. (2018), que demonstraram como a variação da cobertura florestal na região tropical andina influencia fortemente a composição e a persistência de comunidades de beija-flores, reforçando que a qualidade e a extensão dos remanescentes florestais são determinantes para a manutenção de processos ecológicos nesses ambientes.

Por outro lado, respostas negativas e nulas foram mais recorrentes para abundância, área de vida e densidade populacional, possivelmente refletindo a sensibilidade de algumas espécies a alterações estruturais e à qualidade do habitat mesmo em paisagens florestadas (Anjos et al., 2009).

O índice de qualidade da matriz (fig. 2B) mostrou-se predominantemente associado a efeitos negativos sobre a ocupação, provavelmente devido à redução de conectividade ou aumento da exposição a ambientes hostis (Silva et al., 2023). Para a cobertura da matriz (fig. 2C), observou-se um padrão mais equilibrado entre respostas positivas e negativas: variáveis como diversidade beta, riqueza de espécies e similaridade responderam positivamente, sugerindo que certos elementos da matriz podem atuar como habitats complementares, enquanto a abundância e a diversidade funcional apresentaram respostas mais negativas (Arroyo-Rodríguez et al., 2016).

A matriz de urbanização (fig. 2D) foi consistentemente desfavorável para a diversidade funcional e taxonômica. Por fim, o índice de qualidade da paisagem (fig. 2E) apresentou efeito exclusivamente positivo sobre a riqueza de espécies, o que indica que paisagens de alta qualidade, mesmo em contextos fragmentados, podem sustentar elevada diversidade de aves (Corrêa e Moura, 2009; Arroyo-Rodríguez et al., 2016).

Figura 2. Proporção (e números em barras) de respostas positivas, negativas e nulas ao efeito de métricas de composição da paisagem sobre aves em florestas tropicais úmidas. (A–E) Proporção de respostas positivas e negativas do impacto da cobertura florestal (A), índices de

qualidade da matriz (B), cobertura da matriz (C), matriz de urbanização (D) e índices de qualidade da paisagem (E).

Em florestas tropicais secas, a cobertura florestal apresentou efeito positivo apenas sobre a diversidade funcional (fig. 3A). A variável abundância mostrou respostas mistas (positivas, negativas e nulas), o que indica que, nesse tipo de floresta, a quantidade de indivíduos pode ser fortemente modulada por variações sazonais na disponibilidade de recursos e pela heterogeneidade ambiental, não apenas pela quantidade de cobertura florestal. Os autores McLaren & McDonald (2003) demonstraram que, em florestas tropicais secas sazonais, a regeneração via sementes é altamente dependente da estação chuvosa, enquanto a rebrota (coppicing) oferece maior resiliência diante da sazonalidade e distúrbios humanos. Isso evidencia que as características sazonais das FTSS moldam profundamente seu funcionamento e deveriam ser consideradas ao avaliar respostas da avifauna à paisagem ao longo do tempo.

A cobertura da matriz (fig. 3B) não apresentou qualquer resposta positiva, com predominância de efeitos negativos e nulos para abundância, raridade e riqueza de espécies. Esse padrão sugere que, nas paisagens secas, a matriz, frequentemente composta por áreas abertas, degradadas ou de uso agropecuário, tende a atuar como barreira à movimentação e à persistência das aves, reduzindo a conectividade funcional e a disponibilidade de micro-habitats adequados (Portillo-Quintero & Sánchez-Azofeifa (2010). Por fim, a cobertura vegetal (fig. 3C) apresentou apenas respostas nulas para diversidade taxonômica e riqueza de espécies.

Figura 3. Proporção (e números em barras) de respostas positivas, negativas e nulas ao efeito de métricas de composição da paisagem sobre aves em florestas tropicais secas. (A–C) Proporção de respostas positivas, negativas e nulo da cobertura florestal (A), cobertura da matriz (B) e cobertura vegetal (C).

A comparação entre os dois tipos de ambientes evidencia diferenças marcantes tanto na quantidade de evidências disponíveis quanto nos padrões de resposta das aves às métricas de composição da paisagem. Nas florestas tropicais úmidas, a maior representatividade amostral (16 artigos e 94 variáveis resposta) revelou um espectro mais amplo de relações entre a estrutura da paisagem e as aves, com predominância de efeitos positivos da cobertura florestal e do índice de qualidade da paisagem sobre atributos de diversidade, funcionamento e uso do habitat. Esses resultados reforçam a importância da manutenção de áreas florestais extensas e bem conectadas para sustentar processos ecológicos e a integridade funcional das comunidades (Barbosa, 2024).

Por outro lado, em florestas tropicais secas, o número reduzido de estudos (3 artigos e 13 variáveis resposta) limita a robustez das conclusões, mas os padrões observados apontam para uma menor influência positiva das métricas avaliadas. A ausência de respostas positivas para a cobertura da matriz e a predominância de efeitos nulos para a cobertura vegetal sugerem que, nesses ambientes sazonalmente restritivos, a qualidade e a complexidade estrutural dos habitats são fatores determinantes, e que a matriz, muitas vezes degradada, pode funcionar mais como barreira do que como elemento de suporte para as aves (Shoffner et al., 2018).

Murphy & Lugo (1986) oferecem uma análise seminal das florestas tropicais secas, destacando sua forte sazonalidade climática, estrutura simplificada e dinâmica ecológica diferenciada em relação às florestas úmidas. Esses atributos são componentes críticos para

entender como a paisagem influencia comunidades de aves nessas florestas sazonais, especialmente diante de alterações antrópicas no clima, da vegetação e uso do solo. A consideração dessas especificidades pode esclarecer por que métricas tradicionais de cobertura vegetal ou matriz não se aplicam de forma equivalente nas FTSS, conforme mostram os resultados do nosso levantamento bibliográfico.

Conclusão

Conclui-se que a estrutura da paisagem é determinante para a ecologia das aves, embora sua compreensão ainda seja incompleta. A síntese evidencia que, enquanto florestas tropicais úmidas apresentam maior diversidade de métricas e respostas positivas, nas florestas tropicais secas as limitações estruturais e a menor heterogeneidade reduzem o potencial das métricas de composição como preditores consistentes da resposta das comunidades. Essa diferença reflete tanto particularidades ecológicas quanto a desigualdade no esforço de pesquisa entre os dois ambientes, destacando a necessidade de ampliar investigações em florestas tropicais secas. Tal avanço é essencial para subsidiar estratégias de conservação mais representativas, capazes de contemplar a diversidade de contextos nas regiões tropicais da América do Sul.

Referências

- Alves, T. S., Alvarado, F., Arroyo-Rodríguez, V., & Santos, B. A. (2020). Landscape-scale patterns and drivers of novel mammal communities in a human-modified protected area. *Landscape Ecology*, 35(7), 1619–1633. <https://doi.org/10.1007/s10980-020-01040-6>.
- Anjos, L. dos, Bochio, G. M., Campos, J. v., McCrate, G. B. & Palomino, F. Sobre o uso de níveis de sensibilidade de aves à fragmentação florestal na avaliação da Integridade Biótica: um estudo de caso no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia* 28–36 (2009).
- Antonelli, A., & Sanmartín, I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? *TAXON*, 60(2), 403–414. <https://doi.org/10.1002/tax.602010>.
- Arroyo-Rodríguez, V., Arasa-Gisbert, R., Arce-Peña, N., Cervantes-López, M. J., Cudney-Valenzuela, S. J., Galán-Acedo, C., Hernández-Ruedas, M. A., Rito, K. F., & San-José, M. (2019). Determinantes de la biodiversidad en paisajes antrópicos: Una revisión teórica. *La Biodiversidad En Un Mundo Cambiante: Fundamentos Teóricos y Metodológicos Para Su Estudio*, 4.
- Arroyo-Rodríguez, V., Rojas, C., Saldaña-Vázquez, R. A. & Stoner, K. E. Landscape composition is more important than landscape configuration for phyllostomid bat assemblages in a fragmented biodiversity hotspot. *Biological Conservation* 198, 84–92 (2016).
- Barbosa, E. S. S. Barreiras antropogênicas e conectividade do habitat. *Caderno Pedagógico* 21, e3508 (2024).

Corrêa, B. S. & Moura, A. S. Levantamento da comunidade de aves em um sistema de fragmentos florestais interconectados por corredores ecológicos no município de Lavras – Minas Gerais. *REVISTA AGROGEOAMBIENTAL* (2009).

Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J. B., & Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*, 345(6195), 401–406. <https://doi.org/10.1126/science.1251817>.

Hansen, M. C., Potapov, P. v., Moore, R., Hancher, M., Turubanova, S. A., Tyukavina, A., Thau, D., Stehman, S. v., Goetz, S. J., Loveland, T. R., Kommareddy, A., Egorov, A., Chini, L., Justice, C. O., & Townshend, J. R. G. (2013). High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. *Science*, 342(6160), 850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1244693>.

IPBES (2019): Relatório de avaliação global sobre biodiversidade e serviços ecossistêmicos da Plataforma Intergovernamental de Políticas Científicas sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. ES Brondizio, J. Settele, S. Díaz e HT Ngo (editores). Secretaria do IPBES, Bonn, Alemanha. 1148 páginas. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3831673>.

Lovejoy, T. E., & Nobre, C. (2018). Amazon Tipping Point. *Science Advances*, 4(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat2340>.

Malhi, Y., Gardner, T. A., Goldsmith, G. R., Silman, M. R., & Zelazowski, P. (2014). Tropical Forests in the Anthropocene. *Annual Review of Environment and Resources*, 39(1), 125–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-030713-155141>.

McLaren, K. P., & McDonald, M. A. (2003). Seedling dynamics after different intensities of human disturbance in a tropical dry limestone forest in Jamaica. *Journal of Tropical Ecology*, 19(5), 567–578. <https://doi.org/10.1017/S0266467403003626>.

Menino, G. C. de O., Santos, R. M. dos, Apgaua, D. M. G., Pires, G. G., Pereira, D. G. S., Fontes, M. A. L., & Almeida, H. de S. (2015). FLORÍSTICA E ESTRUTURA DE FLORESTAS TROPICAIS SAZONALMENTE SECAS. *CERNE*, 21(2), 277–291. <https://doi.org/10.1590/01047760201521021609>.

Murphy, P. G., & Lugo, A. E. (1986). ECOLOGY OF TROPICAL DRY FOREST. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17(1), 67–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.000435>.

Pimm, S. L., & Raven, P. (2000). Extinction by numbers. *Nature*, 403(6772), 843–845. <https://doi.org/10.1038/35002708>.

Portillo-Quintero, C. A. & Sánchez-Azofeifa, G. A. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biological Conservation* 143, 144–155 (2010).

Ramos, V. A., Griffin, E. C., Ávila, H. F., Germani, G., Minkel, C. W., Dorst, J. P., Gade, D. W., & Knapp, G. W. (1999). South America. In *Britannica*. <https://www.britannica.com/place/South-America>.

Shoffner, A., Wilson, A. M., Tang, W. & Gagné, S. A. The relative effects of forest amount, forest configuration, and urban matrix quality on forest breeding birds. *Scientific Reports* 8, 17140 (2018).

Silva, Dennys V. S., Souza, Nivaldo L., Silva, Janaína B., Torres, Maria F. A. (2023). Conectividade da paisagem na Floresta Atlântica: uma revisão bibliométrica. *Revista BIOMAS - biodiversidade, meio ambiente e sustentabilidade*, 1(2), 41–54. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8408524>.

Tinoco, B. A., Santillán, V. E., & Graham, C. H. (2018). Land use change has stronger effects on functional diversity than taxonomic diversity in tropical Andean hummingbirds. *Ecology and Evolution*, 8(6), 3478–3490. <https://doi.org/10.1002/ece3.3813>.

Trimble, M. J., & van Aarde, R. J. (2012). Geographical and taxonomic biases in research on biodiversity in human-modified landscapes. *Ecosphere*, 3(12), 1–16. <https://doi.org/10.1890/ES12-00299.1>.

WORLD BANK. Land area (sq. km) – South America. World Bank Data, 2023. Disponível em: <https://data.worldbank.org/>. Acesso em: 17 agosto 2025.

Anexos

Figura 1

Figura 2

Figura 3

CÓDIGO: SB1405

AUTOR: MATHEUS IURI BRASILIANO DA SILVA

COAUTOR: ALESSANDRA DANIELE DA SILVA

COAUTOR: DAVID HENRIQUE XAVIER BARBOSA

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Potencial cicatrizante in vitro do peptídeo XKXR derivado da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*

Resumo

A ruptura da integridade do tecido epitelial (feridas) favorece a ocorrência de processos infecciosos que podem resultar no atraso do reparo tecidual sobretudo em indivíduos com comorbidades como diabetes, pacientes oncológicos e imunossuprimidos, facilitando o surgimento de feridas crônicas e alto custo do tratamento. Por estas razões surge uma necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos eficientes para auxiliar na regeneração tecidual. O TsAP-2, um peptídeo extraído da glândula da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* possui uma ação cicatrizante, porém possui baixo espectro de ação contra bactérias gram-negativas e toxicidade *in vitro*. A partir do peptídeo nativo, foi desenvolvido o peptídeo análogo XKXR que demonstrou possuir um amplo espectro de ação antibacteriano e atividade antimicrobiana superior ao nativo. Neste estudo foi avaliado a citotoxicidade e a atividade cicatrizante do análogo XKXR *in vitro*. O peptídeo análogo não apresentou um perfil tóxico nas concentrações de 2 a 4 μM demonstrando uma possível ausência de efeitos tóxicos em fibroblastos murinos de linhagem L929 (ATCC CCL-1). No ensaio de migração celular, o XKXR promoveu uma considerável migração celular nas concentrações de 2 e 4 μM em comparação com o grupo controle, induzindo o fechamento da ranhura a partir das 12 horas. Sendo assim, o peptídeo análogo possui elevado potencial como futuro medicamento cicatrizante em concentrações que não apresentaram citotoxicidade.

Palavras-chave: Migração celular. Peptídeos antimicrobianos. peptídeos análogos.

TITLE: In vitro wound healing potential of the XKXR peptide derived from the venom of the scorpion *Tityus stigmurus*

Abstract

The rupture of the epithelial tissue integrity (wounds) favors the occurrence of infectious processes that may result in delayed tissue repair, especially in individuals with comorbidities such as diabetes, cancer patients, and immunosuppressed individuals, facilitating the development of chronic wounds and leading to high treatment costs. For these reasons, there is a need for the development of new and efficient treatments to support tissue regeneration. TsAP-2, a peptide extracted from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*, has great healing potential;

however, it shows a low spectrum of action against gram-negative bacteria and *in vitro* toxicity. From the native peptide, the analog peptide XKXR was developed, which demonstrated a broader spectrum of action and superior antimicrobial activity compared to the native one. In this study, the cytotoxicity and healing activity of the analog XKXR were evaluated *in vitro*. The analog peptide did not show a toxic profile at concentrations of 2 to 4 μM , suggesting a possible absence of toxic effects in murine fibroblasts of the L929 lineage (ATCC CCL-1). Finally, the cell migration tests with XKXR promoted considerable cell migration at concentrations of 2 to 4 μM compared to the control group, inducing significant wound closure from 12 hours onwards. Therefore, the analog peptide shows potential as a future healing drug at concentrations that did not present cytotoxicity.

Keywords: Cell migration. Antimicrobial peptides. Analog peptides.

Introdução

A exposição da pele devido ao rompimento da descontinuidade epitelial predispõe o organismo a infecções por microrganismos que podem retardar o processo de retorno a homeostase (GOHARA *et al.*, 2025; PEÑA; MARTIN, 2024; RICHMOND; HARRIS, 2014; MUIRE; MANGUM; WENKE, 2020). Este retardo no reparo tecidual é agravado em pacientes que possuem comorbidades, como diabetes, pacientes oncológicos e imunossuprimidos que podem resultar em feridas persistentes, tratamento prolongados e de alto custo bem como uma reduzida eficácia do tratamento e redução da qualidade de vida dos indivíduos afetados (BOOTUN, 2013; DUFF *et al.*, 2015; MAMUN *et al.*, 2024; RITTIÉ, 2016; BEYENE; DERRYBERRY; BARBUL, 2020; LARSEN; COWLEY; FUCHS, 2020). Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos medicamentos eficientes no tratamento de feridas que possuem ação cicatrizante e que limitem a predisposição a infecções por microrganismos (MAMUN *et al.*, 2024). O TsAP-2 consiste em um peptídeo sem pontes dissulfeto presente na glândula de peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* que tem revelado ação cicatrizante e antibacteriana *in vitro* e *in vivo* (DANIELE-SILVA *et al.*, 2025). Contudo, este peptídeo não tem mostrado um amplo espectro de ação antibacteriano, com ausência de atividade sobre microrganismos gram-negativos, e efeito tóxico em fibroblastos murinos (DANIELE-SILVA *et al.*, 2025). A partir da molécula nativa, um peptídeo análogo denominado XKXR tem sido obtido a partir do desenho racional de fármacos (pedido de depósito de patente BR102020023857-4), que tem demonstrado um amplo espectro de ação antibacteriano (dados não publicados). Neste contexto, este estudo avaliou a citotoxicidade e a atividade cicatrizante do XKXR *in vitro* em linhagens de células de fibroblasto murinos com o intuito de ampliar o potencial terapêutico deste peptídeo bioativo como agente cicatrizante de feridas.

Metodologia

OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO

O peptídeo sintético liofilizado XKXR foi obtido comercialmente (empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo, Brasil), com amidação na posição carboxi-terminal e pureza maior que 90%. O peptídeo foi mantido refrigerado a -20 °C até o momento do uso. A massa molecular do peptídeo foi

avaliada por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e a pureza analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa

CITOTOXICIDADE CELULAR

A avaliação da toxicidade em cultura celular foi realizada pelo método colorimétrico de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Seguindo a metodologia descrita por Daniele-Silva (2016), as células não neoplásicas de fibroblasto murino (L-929, ATCC® CCL-1) na concentração de 5000 células/poço em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino foram incubadas com diferentes concentrações do peptídeo análogo por 24 h a 37 °C (atmosfera a 5% de CO₂). O meio foi substituído por 100 µL da solução de MTT 1 mg/mL (Sigma, St Louis, EUA) e incubado a 37 °C por 4h nas condições descritas anteriormente. Em seguida, o conteúdo dos poços foi substituído por 100 µL de álcool etílico a 96% (v/v) e a microplaca mantida a 25 °C sob agitação por 15 min. A absorbância foi mensurada no leitor de microplacas (EpochBiotek, Winooski, EUA) a 570 nm. Células incubadas com meio e suplementadas com 10% de soro fetal bovino na ausência do peptídeo foi utilizada como controle positivo de viabilidade celular (100% de redução do MTT) e o percentual de redução do MTT determinado comparando com o controle, sendo considerada proporcional a viabilidade celular (SILVA, 2009).

MIGRAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS *IN VITRO*

Fibroblastos murinos (L929, ATCC CCL-1) na concentração de 1 x 10⁶ células/poço em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% foram adicionados (1mL) aos poços de placa de 24 poços. A placa foi incubada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após a confluência das células, foi realizada a retirada das células na superfície medial dos poços com o auxílio de uma ponteira de 200 µL. Em seguida, os poços foram lavados com 1mL de tampão fosfato salino estéril (PBS - NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 10 mM) para remoção das células debridadas e adicionado meio de cultivo contendo o peptídeo na concentração de 2 e 4 µM. A extensão da ranhura foi mensurada nos tempos de 0, 12 e 24 horas, utilizando microscópio óptico (Software NIS Elements AR, Nikon, New York – EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da ranhura (%), comparando com o controle (células incubadas com meio de cultivo na ausência dos peptídeos) (BALEKAR *et al.*, 2012; TONIN *et al.*, 2016).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média + desvio padrão. A significância estatística foi obtida com o software GraphPad Prism8.0, sendo realizada a análise de variância ANOVA oneway, seguido do teste de Tukey (p<0,05).

Resultados e Discussões

Citotoxicidade celular

O XKXR (2 a 4 μM) não alterou a capacidade de redução do MTT sugerindo ausência de efeito tóxico sobre esta linhagem celular (L929) após 24 h de incubação. No entanto acima de 8 μM , revelou um efeito tóxico sobre esta linhagem celular, inibindo acima de 50 % o metabolismo celular.

Migração celular

O grupo controle (células incubadas apenas com meio de cultivo) revelou um tamanho de ranhura de 70% e 20,5% após 12 e 24 h comparando com o tempo inicial (tempo zero). A incubação com o XKXR induziu elevada migração celular quando comparado com o grupo controle (células incubadas apenas com meio de cultivo) após 12 h de incubação, mostrando uma extensão da ranhura de 42,1% (inibição da extensão da ranhura em 57,9 %) e 0% (inibição total da ranhura) nas concentrações de 2 μM e 4 μM , respectivamente. Após 24 h de incubação, todos os grupos analisados apresentaram efeito semelhante sobre a migração celular.

Discussões:

A exposição da pele devido ao rompimento da descontinuidade epitelial predispõe o organismo a infecções por microrganismos que podem retardar o processo de retorno a homeostase e assim podendo ocasionar o surgimento de feridas crônicas (GOHARA *et al.*, 2025; PEÑA; MARTIN, 2024; RICHMOND; HARRIS, 2014; MUIRE; MANGUM; WENKE, 2020). Pacientes que possuem comorbidades, como diabetes, pacientes oncológicos e imunossuprimidos têm a tendência a desenvolver feridas persistentes necessitando de tratamentos prolongados e de alto custo bem como uma reduzida eficácia do tratamento e redução da qualidade de vida dos indivíduos afetados (BOOTUN, 2013; DUFF *et al.*, 2015; MAMUN *et al.*, 2024; RITTIÉ, 2016; BEYENE; DERRYBERRY; BARBUL, 2020; LARSEN; COWLEY; FUCHS, 2020). O peptídeo análogo XKXR nas concentrações de 2 a 4 μM não revelou efeito tóxico sobre fibroblastos murinos comparado com o grupo controle. Contudo em concentrações acima de 8 μM demonstrou efeito tóxicos inibindo acima de 50% do metabolismo dessa linhagem celular. Comparado com o peptídeo stigA25, um peptídeo análogo da Stigmurina sem pontes dissulfeto, o peptídeo XKXR demonstrou resultados semelhantes em fibroblastos murinos nas concentrações iniciais, mas em concentrações acima de 8 μM o peptídeo stigA25 demonstrou ser menos tóxico. Em relação a capacidade de promover migração celular o XKXR induziu elevada migração celular quando comparado com o grupo controle (células incubadas apenas com meio de cultivo) após 12 h de incubação demonstrou redução significativa na extensão das ranhuras nas concentrações de 2 μM e 4 μM sugerindo uma ação eficaz na migração celular. Em comparação com o peptídeo descrito na literatura, o peptídeo antimicrobiano Ba49 isolado de *Bacillus subtilis* demonstrou em fibroblastos murinos (L929) uma redução da extensão da ranhura de 50% em um período de 24 horas na concentração de 16 μM , enquanto o XKXR no período de 12 horas inibiu 57% da ranhura e 100% nas concentrações de 2 μM e 4 μM respectivamente. Em relação ao peptídeo Ba49 o XKXR induziu uma maior migração celular com uma menor concentração e tempo de incubação.

Conclusão

Em suma, o peptídeo XKXR demonstrou não ser citotóxico linhagem celular L929 em baixas concentrações. Em adição, este peptídeo induziu a migração celular em concentrações não tóxicas, sendo promissor como uma alternativa para auxiliar na cicatrização de feridas.

Referências

BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Journal of ethnopharmacology*, v. 141, n. 3, p. 817–824, jun. 2012.

BEYENE, R. T.; DERRYBERRY, S. L.; BARBUL, A. The Effect of Comorbidities on Wound Healing. *Surgical Clinics of North America*, v. 100, n.4, p. 695–705, jun. 2020.

BOOTUN, R. Effects of immunosuppressive therapy on wound healing. *International wound journal*, v. 10, n. 1, p. 98–104, fev. 2013.

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.

DANIELE-SILVA, Alessandra *et al.* *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of TsAP-2 from *Tityus stigmurus* scorpion venom in multidrug-resistant strains and its NMR three-dimensional structure. *Biochimie*, 2025.

GOHARA, Yuma et al. An S100A8/A9 Neutralizing Antibody Potently Ameliorates Contact Hypersensitivity and Atopic Dermatitis Symptoms. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 145, n. 8, p. 1930–1945.e3, ago. 2025.

LARSEN, S. B.; COWLEY, C. J.; FUCHS, E. Epithelial cells: liaisons of immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 62, p. 45–53, fev. 2020.

MAMUN, A. AL *et al.* Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. *Frontiers in immunology*, v. 15, p. 1395479, 2024.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MUIRE, P. J.; MANGUM, L. H.; WENKE, J. C. Time course of immune response and immunomodulation during normal and delayed healing of musculoskeletal wounds. *Frontiers in Immunology*, v. 11, jun. 2020.

PEÑA, O. A.; MARTIN, P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024.

RICHMOND, J. M.; HARRIS, J. E. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 12, p. a015339–a015339, 2014.

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.

SILVA, M. R. DA. Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade

biológica de substâncias sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2009.

TONIN, T. D. *et al.* *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract and pure compound niga-ichigoside F1: wound healing and anti-inflammatory effects. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 389, n. 11, p. 1235–1244, nov. 2016

Anexos

Figura 1- Ensaio de citotoxicidade

Figura 2 - Gráfico tamanho da ranhura

Figura 3 - Migração celular

CÓDIGO: SB1406

AUTOR: ANDERSON GABRIEL DO NASCIMENTO CRUZ

ORIENTADOR: BRUNO LOBAO SOARES

TÍTULO: IC em estudo em Peixes paulistinha (Zebrafish) na fase adulta com o uso de Harmina e DMT mais Harmina nos primeiros dias de desenvolvimento

Resumo

Este estudo investigou os efeitos da N,N-dimetiltriptamina (DMT), um alcaloide da Ayahuasca, no comportamento de peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos. Peixes foram expostos cronicamente a diferentes doses de DMT (0,0038-0,38 mg/L), isolado e combinado com Harmina, e avaliados na tarefa de Aversão Condicionada ao Local (CPA) para analisar memória, motilidade e medo. Os resultados não indicaram alterações significativas na memória de curto prazo aversiva. Contudo, o tratamento com DMT induziu um aumento significativo da atividade locomotora e uma redução proeminente do tempo de congelamento (freezing), um comportamento associado ao medo. Tais achados sugerem que, nas doses testadas, o DMT modula preferencialmente respostas de medo e ansiedade em vez da memória, possivelmente através de mecanismos serotoninérgicos em circuitos do tronco encefálico, corroborando a complexidade de seus efeitos neurocomportamentais e a relevância do zebrafish como modelo translacional para estudos psicofarmacológicos.

Palavras-chave: DMT; Zebrafish; Memória; Harmina; Comportamento

TITLE: Effects of Early-Life Exposure to Harmine and DMT on Adult Zebrafish (*Danio rerio*)

Abstract

This study investigated the effects of N,N-dimethyltryptamine (DMT), an Ayahuasca alkaloid, on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). Fish were chronically exposed to different doses of DMT (0.0038-0.38 mg/L), alone and combined with Harmine, and evaluated in the Conditioned Place Aversion (CPA) task to analyze memory, motility, and fear. The results indicated no significant alterations in aversive short-term memory. However, DMT treatment induced a significant increase in locomotor activity and a prominent reduction in freezing time, a fear-associated behavior. These findings suggest that, at the tested doses, DMT preferentially modulates fear and anxiety responses rather than memory, possibly through serotonergic mechanisms in brainstem circuits, corroborating the complexity of its neurobehavioral effects and the relevance of zebrafish as a translational model for psychopharmacological studies.

Keywords: DMT; Zebrafish; Memory; Harmine; Behavior

Introdução

Déficits de memória de curto prazo representam um problema clínico prevalente, frequentemente associado ao estresse crônico, cujas bases fisiopatológicas envolvem a

redução da neuroplasticidade e a disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Diante da eficácia limitada das terapias atuais, a busca por novos alvos terapêuticos é crucial. Nesse contexto, compostos psicodélicos com ação serotoninérgica, como a Ayahuasca, têm demonstrado potencial terapêutico. A Ayahuasca é uma infusão que combina N,N-dimetiltriptamina (DMT) com inibidores da monoamina oxidase (IMAO), como a Harmina. A Harmina, isoladamente, já demonstrou ter efeitos antidepressivos e ansiolíticos em estudos pré-clínicos. Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar os efeitos da Harmina administrada isoladamente com os efeitos da sua combinação com DMT em perfis comportamentais no modelo animal Zebrafish (*Danio rerio*). Especificamente, o presente estudo avaliou os efeitos da Harmina (0,02 mg/L) e DMT (0,0038 mg/L), em comparação a grupos controle (água e veículo DMSO). A avaliação dos efeitos sobre a memória de curto prazo e a ansiedade foi realizada através da tarefa de Aversão Condicionada ao Local (CPA), buscando elucidar os efeitos terapêuticos. Na análise das respostas comportamentais, foram analisados parâmetros locomotores e de comportamento, incluindo: velocidade média de natação, velocidade máxima, distância total percorrida, tempo de congelamento (freezing), permanência no fundo, latência para cruzar para o lado condicionado e o tempo gasto em cada lado do tanque.

Metodologia

A Harmina e o DMT foram adquiridos de fornecedores comerciais (e.g., Sigma-Aldrich) e diluídos em DMSO. Foram utilizados peixes-zebra adultos, de ambos os sexos, mantidos em tanques de alta densidade no biotério do Laboratório de Peixes da UFRN, sob condições controladas de temperatura (28°C), pH (7,0) e fotoperíodo (12L:12D), com aprovação do comitê de ética local. Após uma semana de aclimação, os peixes foram divididos em quatro grupos (n=15/grupo): Controle Água, Controle Veículo (DMSO + Água), Grupo Harmina (exposto a 0,02 mg/L de Harmina) e Grupo DMT (exposto a 0,0038 mg/L de DMT). O regime de exposição crônica consistiu em um total de 10 dias de tratamento, com sessões diárias de exposição realizadas aproximadamente às 14h00, intercaladas por dois dias de descanso entre cada sessão. Após o período de tratamento, os peixes foram submetidos à tarefa de Aversão Condicionada ao Local (CPA) em um aquário de dois compartimentos (branco vs. quadriculado) para avaliar a memória e a ansiedade. O condicionamento envolveu parear o compartimento quadriculado a um estímulo aversivo (substância de alarme). Na fase de teste, o comportamento dos peixes foi filmado por 10 minutos. As filmagens foram analisadas com o software Zebtrack (MatLab) para quantificar variáveis como tempo gasto em cada lado do tanque, latência para cruzar, velocidade de natação e tempo de congelamento (freezing), para avaliar os efeitos dos tratamentos.

Resultados e Discussões

A análise da atividade locomotora revelou que o grupo tratado com Harmina (0,02 mg/L) apresentou um perfil de hiperatividade, sugestivo de um aumento na exploração do ambiente. Estes animais percorreram uma distância total significativamente maior em comparação aos grupos controle H₂O e DMSO ($p < 0,001$), acompanhada por um aumento significativo tanto na velocidade média quanto na velocidade máxima ($p < 0,001$). Este achado sugere que a Harmina possui um potente efeito estimulante motor, que pode ser interpretado como um aumento no comportamento exploratório. Esta interpretação é sustentada pela análise do número de entradas no compartimento xadrez do aquário mostrou que o grupo Harmina

realizou um número significativamente maior de transições para esta área em comparação tanto com o grupo H₂O, quanto com o grupo DMSO, conforme o teste post-hoc de Dunn. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos controle, reforçando que o efeito é específico da Harmina. Em relação aos parâmetros de ansiedade, o tratamento com Harmina reduziu significativamente o tempo de congelamento (freezing) ($p < 0,01$ em relação aos controles), o que interpretamos como um efeito do tipo ansiolítico. Essa redução da ansiedade pode ser o mecanismo que facilita o aumento do comportamento exploratório, permitindo que os animais se movimentem mais livremente. Em contraste, o grupo tratado com a baixa dose de DMT (0,0038 mg/L) não apresentou qualquer alteração significativa na distância percorrida, na velocidade ou no tempo de congelamento quando comparado aos controles. No entanto, a análise da memória aversiva, avaliada pela latência para entrar no compartimento previamente associado ao estímulo negativo, revelou um efeito claro e específico do DMT. O grupo DMT apresentou um tempo de latência para cruzar significativamente maior em comparação ao grupo controle DMSO ($p = 0.0078$, teste U de Mann-Whitney), com uma diferença geral significativa entre os grupos ($p = 0.014$, teste de Kruskal-Wallis). Este aumento na latência sugere que, embora a dose de DMT não tenha alterado a atividade motora geral ou a ansiedade basal, ela foi eficaz em modular a memória de curto prazo. Os animais tratados com DMT pareceram reter melhor a memória da associação negativa com o compartimento, hesitando mais tempo antes de explorá-lo. Em conjunto, os resultados apontam para perfis de ação distintos entre os compostos na dose testada. A Harmina demonstrou um claro efeito estimulante motor e ansiolítico, promovendo um estado de maior exploração. Por outro lado, o DMT não produziu alterações motoras detectáveis, mas exibiu um efeito pró-mnemônico específico para a memória aversiva. Isso sugere que seus impactos comportamentais são domínio-específicos, modulando a cognição sem alterar a atividade geral.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a Harmina e o DMT, quando administrados isoladamente, promovem efeitos distintos sobre o comportamento de zebrafish adultos. Nossos resultados indicam que a Harmina (0,02 mg/L) possui um perfil estimulante motor e ansiolítico. Este perfil foi evidenciado pelo aumento significativo na distância percorrida, na velocidade e no número de entradas em novas áreas, acompanhado por uma redução no tempo de imobilidade (freezing), caracterizando um claro aumento no comportamento exploratório. Em contrapartida, a baixa dose de DMT (0,0038 mg/L), embora inerte sobre os parâmetros locomotores e de ansiedade, exerceu um efeito sobre a cognição. O tratamento com DMT aprimorou a memória aversiva de curto prazo, como demonstrado pelo aumento significativo na latência para entrar em um ambiente previamente aversivo, configurando um efeito pró-mnemônico. A principal contribuição deste trabalho é a demonstração de uma clara dissociação farmacológica entre estes dois alcaloides: a Harmina modulou a atividade motora e a exploração, enquanto o DMT atuou especificamente no domínio da memória, na dose testada. Estes achados reforçam a importância de se analisar individualmente os componentes da Ayahuasca para elucidar seus complexos mecanismos de ação e destacam a relevância do modelo zebrafish para investigações translacionais em neuropsicofarmacologia. O estudo abre caminho para futuras pesquisas que explorem outras doses e a interação sinérgica entre esses compostos.

Referências

Quinones Vargas, H.D. Pharmacological effects of ayahuasca's main active compounds on anxious behaviors and memory in zebrafish (*Danio rerio*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Paul, E. D., Johnson, P. L., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2014). The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 46, 379–396.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.010> OSÓRIO, F. DE L. et al. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Revista brasileira de psiquiatria* (Sao Paulo, Brazil: 1999), v. 37, n. 1, p. 13–20, 2015. FORTUNATO, J. J. et al. Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria), v. 117, n. 10, p. 1131–1137, 2010. CHANDROO, K. P., DUNCAN, I. J. H; MOCCIA, R. D. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behavior Science*, 86 (3-4): 225-250. 2004. Deakin JF and Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5: 305-315. RICO, E. P. et al. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 6, p. 608-617, dez. 2011. GUEST, F. L. et al. Os efeitos do estresse na função do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em indivíduos com esquizofrenia. *Revista de psiquiatria clinica*, v. 40, n. 1, p. 20–27, 2012. MCKENNA, D.J. et al. The scientific investigation of ayahuasca: a review of past and current research. *The Heffter Review of Psychodelic Research*, v.1, p.65-76, 1998. CALLAWAY, J.C et al. Pharmacokinetics of hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology*, v.65, p.243-56, 1999. RIBA, J. et al. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion and pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.306, p.73-83, 2003. SANTOS, G.R. Ayahuasca: neuroquímica e neurofarmacologia. *Revista*

CÓDIGO: SB1429

AUTOR: RENAN PORFÍRIO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: JUDNEY CLEY CAVALCANTE

TÍTULO: Variações no músculo palmar longo e sua importância clínica: um estudo cadavérico

Resumo

O músculo palmar longo (PL) destaca-se na anatomia pela sua elevada variabilidade. Localizado no compartimento anterior do antebraço, exerce papel acessório na flexão do punho e na tensão da aponeurose palmar (AP). Apesar de ser considerado dispensável em termos funcionais, possui importância clínica e cirúrgica significativa. Anatomicamente, origina-se no epicôndilo medial do úmero e insere-se na AP, podendo também fixar-se ao retináculo dos flexores. Estudos apontam que sua ausência ocorre em 14% a 25% da população, de forma unilateral ou bilateral, e, embora essa ausência não prejudique a função, pode interferir em exames físicos, diagnósticos diferenciais e procedimentos reconstrutivos. Entre as variações descritas encontram-se a ausência completa, a duplicação, o músculo invertido, a bifurcação ou inserções anômalas, inclusive no abductor curto do polegar. Do ponto de vista clínico, essas alterações podem ocasionar dor, compressões nervosas, massas confundidas com tumores e ainda impactar cirurgias que utilizam o PL como enxerto tendíneo. No presente estudo, foi identificado, durante dissecação anatômica realizada na UFRN, um músculo palmar longo acessório (PLA), com origem no flexor superficial dos dedos e inserção na AP, reforçando a relevância do conhecimento sobre variações anatômicas do PL e suas implicações diagnósticas e cirúrgicas.

O músculo palmar longo (PL) destaca-se na anatomia pela sua elevada variabilidade.

Localizado no compartimento anterior do ante

Palavras-chave: Anatomia. Dissecação. Variação anatômica. Antebraço. Cadáver. Clínica.

TITLE: Variations of the Palmaris Longus Muscle and Their Clinical Importance: A Cadaveric Study

Abstract

The palmaris longus muscle (PL) stands out in anatomy due to its high variability. Located in the anterior compartment of the forearm, it plays an accessory role in wrist flexion and in tensioning the palmar aponeurosis (PA). Although considered functionally dispensable, it

holds significant clinical and surgical importance. Anatomically, it originates from the medial epicondyle of the humerus and inserts into the PA, but it may also attach to the flexor retinaculum. Studies indicate that its absence occurs in 14% to 25% of the population, either unilaterally or bilaterally, and while this absence does not compromise function, it may interfere with physical examinations, differential diagnoses, and reconstructive procedures. Among the described variations are complete absence, duplication, inverted muscle, bifurcation, or anomalous insertions, including into the abductor pollicis brevis. From a clinical perspective, such variations may cause pain, nerve compressions, masses mistaken for tumors, and may also affect surgeries in which the PL is used as a tendon graft. In the present study, an accessory palmaris longus muscle (APL) was identified during an anatomical dissection performed at UFRN, originating from the flexor digitorum superficialis and inserting into the PA, reinforcing the relevance of understanding PL anatomical variations and their diagnostic and surgical implications.

Keywords: Anatomy. Dissection. Anatomical variation. Forearm. Cadaver. Clinical.

Introdução

Introdução: O músculo palmar longo (PL) encontra-se no compartimento anterior do antebraço e tem como função auxiliar os outros músculos flexores. Trata-se de um músculo altamente variável que normalmente se origina no tendão flexor comum no epicôndilo medial do úmero e se insere na aponeurose palmar (AP), estudos atuais relatam diversas variações do PL e um das revisões sistemáticas que o projeto tem como base abrange 33 artigos e desses 12 foram feitos através de estudos cadavéricos e 20 a partir de laudos médicos cujo os pacientes relatam sentir dor ou inchaço, ou seja, a partir dele observa-se que variações no PL traz implicações clínicas. Existem casos nos quais esse músculo pode passar profundamente ao retináculo dos flexores e se inserir no próprio retináculo, no abdutor curto do polegar ou se unir com o flexor superficial dos dedos (FSD). Também há casos com variações no tendão e no ventre, podendo ser um músculo invertido, com dois ventres ou com bifurcações na inserção. No presente trabalho, foi encontrada uma variação anatômica que consiste em um músculo palmar longo acessório (PLA), o qual tem origem no FSD e inserção na AP.

Metodologia

O estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) envolveu dissecações de rotina em antebraços de corpos não reclamados ou doados para estudo para a instituição. Foram realizadas 3 medições de cada variável por 2 avaliadores distintos. As variáveis utilizadas foram: comprimento, largura e espessura dos ventres e dos tendões e comprimento dos músculos completos.

Resultados e Discussões

Foi encontrado o comprimento médio dos músculos completos, sendo 216,3 mm para o PL e 179,1 para o PLA. A respeito dos preceitos éticos, o trabalho foi executado antes da exigência do Comitê de Ética para estudos em cadáver. Conclusão: A partir da dissecação de rotina pôde-se observar uma variação significativa do PL, demonstrando a presença de um músculo acessório com características singulares. Esses achados podem se relacionar com repercussões clínicas e contribuem para um melhor entendimento da musculatura do antebraço. Descritores: Anatomia. Dissecação. Variação anatômica. Antebraço. Cadáver.

Conclusão

Foi constatada uma variação em um membro superior esquerdo, apresentando um PLA com origem incomum do FSD e inserção na AP, enquanto o MPL possui normalidade em sua origem e inserção, e baseado em estudos clínicos, sim, variações no músculo tem implicações clínicas.

Referências

ZIELINSKA, N. et al. A very rare case of the accessory palmaris longus muscle and clinical significance. *Folia Morphologica*, 2023.

LONGHURST, G.; STONE, D.; MAHONY, N. Bilateral reversed palmaris longus muscle: a case report and systematic literature review. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 2019.

Olewnik, Ł. et al. Morphological variability of the palmaris longus muscle in human fetuses. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 2018.

KOWALCZYK, A.; TOPUZOV, N. Three in one - unusual palmaris longus muscle anatomical variation. *Folia Morphologica*, 2024.

CÓDIGO: SB1441

AUTOR: ALANA DE MEDEIROS DANTAS

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: Modelagem Molecular e Predição de Propriedades Físico-químicas, Farmacocinéticas e Toxicológicas de Substâncias Bioativas para o Combate de Doenças Crônicas

Resumo

O desenvolvimento de novos fármacos enfrenta elevadas taxas de insucesso em fases clínicas, em grande parte devido a falhas em parâmetros farmacocinéticos e a perfis toxicológicos adversos. A integração de métodos computacionais *in silico* voltados para a predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) representa uma estratégia fundamental para reduzir esses índices (CHENG et al., 2012; FU et al., 2024). Este trabalho descreve a metodologia de predição ADMET aplicada ao estudo de moléculas bioativas voltadas ao combate de doenças crônicas, utilizando plataformas de última geração como ADMETlab 3.0, Deep-PK, ProTox 3.0, PRED-HERG5 e admetSAR 3.0. O foco recai sobre a abordagem metodológica, que integra caracterização físico-química, filtros de drug-likeness, predições farmacocinéticas e avaliação toxicológica multissistêmica. São discutidas as potencialidades e limitações da abordagem, bem como exemplos de aplicação em moléculas aprovadas e em investigação, incluindo agentes respiratórios e metabólicos. Os resultados reforçam a relevância de pipelines computacionais robustos para apoiar a seleção e otimização de candidatos a fármacos, aumentando a racionalidade no desenvolvimento de terapias seguras e eficazes.

Palavras-chave: Desenvolvimento de fármacos; ADMET; Bioinformática;

TITLE: Molecular Modeling and Prediction of Physicochemical, Pharmacokinetic, and Toxicological Properties of Bioactive Substances for Combating Chronic Diseases

Abstract

The development of new drugs faces high failure rates in clinical phases, largely due to shortcomings in pharmacokinetic parameters and adverse toxicological profiles. The integration of *in silico* computational methods aimed at predicting absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties represents a fundamental strategy to reduce these rates (CHENG et al., 2012; FU et al., 2024). This work describes the ADMET prediction methodology applied to the study of bioactive molecules for combating chronic diseases, using state-of-the-art platforms such as ADMETlab 3.0, Deep-PK, ProTox 3.0, PRED-HERG5, and admetSAR 3.0. The focus lies on the methodological approach, which integrates physicochemical characterization, drug-likeness filters, pharmacokinetic

predictions, and multisystem toxicological evaluation. The potentialities and limitations of the approach are discussed, as well as examples of applications in approved and investigational molecules, including respiratory and metabolic agents. The results reinforce the relevance of robust computational pipelines to support the selection and optimization of drug candidates, increasing rationality in the development of safe and effective therapies.

Keywords: Drug Development; ADMET; Bioinformatics

Introdução

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) — como diabetes tipo 2, obesidade, doenças cardiovasculares e respiratórias — representam atualmente a principal causa de morbimortalidade global. A complexidade dessas condições exige terapias inovadoras que conciliem eficácia clínica com segurança prolongada. No entanto, estima-se que mais de 90% dos candidatos a fármacos falhem em fases avançadas de desenvolvimento, principalmente por limitações em parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), ou por manifestações de toxicidade não previstas (MYUNG; DE SÁ; ASCHER, 2024).

O conceito de ADMET emerge como eixo central para superar essas dificuldades, integrando propriedades farmacocinéticas fundamentais à caracterização toxicológica de compostos (CHENG et al., 2012). Tradicionalmente, essa análise dependia de estudos pré-clínicos in vitro e in vivo, de alto custo e longa duração. Avanços recentes em bioinformática e inteligência artificial tornaram possível realizar essa etapa de forma antecipada e mais acessível, por meio de metodologias in silico capazes de prever comportamentos moleculares complexos a partir de características estruturais (FU et al., 2024).

Entre as ferramentas mais relevantes atualmente estão ADMETlab 3.0, Deep-PK, ProTox 3.0, PRED-HERG5 e admetSAR 3.0 (BANERJEE et al., 2018; BRAGA et al., 2015). Essas plataformas utilizam abordagens estatísticas e de aprendizado profundo para estimar múltiplos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos. A consolidação dessas metodologias permitiu a criação de pipelines computacionais reprodutíveis, nos quais compostos candidatos podem ser avaliados de forma sistemática antes de avançar para fases experimentais. O presente trabalho descreve esse fluxo metodológico, enfatizando sua aplicabilidade a moléculas bioativas de interesse em doenças crônicas e demonstrando sua utilidade com exemplos pontuais.

Metodologia

A metodologia adotada baseia-se em um fluxo in silico estruturado em etapas contínuas de avaliação. O processo inicia-se pela padronização estrutural das moléculas em formatos SMILES ou InChI, seguida da determinação de propriedades físico-químicas fundamentais, como peso molecular, número de doadores e aceptadores de ligações de hidrogênio, lipofilicidade (logP/logD), solubilidade aquosa (logS) e área de superfície polar topológica (TPSA). Essas métricas, obtidas por ADMETlab 3.0 (FU et al., 2024) e admetSAR 3.0 (CHENG et al., 2012), fornecem a base para estimar permeabilidade, biodisponibilidade e adequação farmacológica inicial.

Na sequência, aplicam-se filtros de drug-likeness, que avaliam a semelhança de novos compostos com fármacos bem-sucedidos. Entre os principais, destacam-se a regra dos Cinco de Lipinski, a de Veber e a de Egan, que relacionam propriedades físico-químicas com absorção oral e biodisponibilidade. Regras adicionais, como a Pfizer (3/75), GSK (4/400),

BMS e a dos quelantes, permitem identificar riscos associados à toxicidade, solubilidade insuficiente, baixa permeabilidade ou interações indesejadas com metais (MYUNG; DE SÁ; ASCHER, 2024). A aplicação combinada desses filtros aumenta a capacidade de triagem precoce, evitando que compostos com múltiplas violações avancem para fases experimentais onerosas.

A predição de parâmetros ADME constitui a etapa seguinte. A absorção é avaliada a partir da permeabilidade intestinal prevista, do comportamento em modelos equivalentes a Caco-2 e da probabilidade de interações com transportadores como P-gp e BCRP (FU et al., 2024). A distribuição é caracterizada pela ligação a proteínas plasmáticas, fração livre, volume de distribuição em estado estacionário e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. O metabolismo é investigado considerando a suscetibilidade das moléculas às principais isoformas do citocromo P450, tanto como substratos quanto como inibidores, permitindo estimar interações medicamentosas potenciais (BANERJEE et al., 2018). A excreção é estimada por parâmetros como depuração total e meia-vida plasmática prevista.

A toxicidade é analisada em camadas complementares. O PRED-HERG5 avalia o risco de inibição do canal hERG, marcador crítico de cardiotoxicidade (BRAGA et al., 2015). O ProTox 3.0 fornece predições de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (BANERJEE et al., 2018). O Deep-PK acrescenta modelos baseados em aprendizado profundo capazes de integrar múltiplas variáveis farmacocinéticas e toxicológicas (MYUNG; DE SÁ; ASCHER, 2024). A integração desses resultados é organizada em matrizes de decisão, nas quais riscos elevados em múltiplos parâmetros configuram barreiras críticas, enquanto riscos moderados são interpretados em função da via de administração, da dose e do contexto clínico.

Resultados e Discussões

A aplicação dessa metodologia a moléculas bioativas de interesse em doenças crônicas permite identificar padrões de risco e oportunidades de otimização já nas fases iniciais de investigação. A análise de propriedades físico-químicas frequentemente revela o equilíbrio necessário entre lipofilicidade e solubilidade, essencial para garantir permeabilidade e evitar acúmulo em tecidos lipídicos (CHENG et al., 2012).

A integração com filtros de drug-likeness mostra-se eficaz para discriminar compostos com maior probabilidade de sucesso clínico. Compostos que respeitam os critérios de Lipinski, Veber e Egan tendem a apresentar melhor biodisponibilidade oral, enquanto violações múltiplas correlacionam-se com taxas de falha superiores em fases clínicas (FU et al., 2024). No campo da toxicidade, a convergência entre diferentes ferramentas confere maior confiabilidade às previsões. Alertas consistentes de inibição do canal hERG indicam risco de arritmias cardíacas, uma das principais causas de retirada de fármacos do mercado (BRAGA et al., 2015). A hepatotoxicidade, avaliada pelo ProTox 3.0, representa outra barreira crítica, responsável por descontinuações frequentes em ensaios clínicos (BANERJEE et al., 2018). A integração com o Deep-PK permite reconhecer padrões mais sutis de toxicidade, ampliando a capacidade de antecipar falhas (MYUNG; DE SÁ; ASCHER, 2024).

Exemplos práticos ilustram a aplicabilidade do pipeline. A Revefenacina, fármaco inalatório para DPOC, apresenta predições intrínsecas de cardiotoxicidade e hepatotoxicidade, mitigadas pela via respiratória que limita a exposição sistêmica. Entre os inibidores de SGLT2, a comparação entre Enavogliflozin e Empagliflozin evidencia diferenças sutis em hepatotoxicidade e metabolismo, apesar da eficácia similar em seu alvo. O uso off-label

desses agentes para emagrecimento reforça a necessidade de cautela, já que mudanças de contexto terapêutico podem amplificar riscos. A comparação conceitual com agonistas de GLP-1 ilustra que classes distintas podem convergir em indicação, mas sob passivos toxicológicos diferentes.

Conclusão

A adoção de pipelines computacionais baseados em predição ADMET constitui um avanço metodológico essencial no desenvolvimento racional de fármacos para doenças crônicas. A combinação de plataformas como ADMETlab 3.0, Deep-PK, ProTox 3.0, PRED-HERG5 e admetSAR 3.0 permite avaliar de forma abrangente propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas, antecipando riscos críticos e apoiando a seleção de candidatos mais promissores (FU et al., 2024; CHENG et al., 2012). A abordagem demonstra que, embora os alertas de risco sejam valiosos, sua interpretação deve considerar fatores adicionais como via de administração e perfil clínico. O resultado é um processo de triagem mais racional, capaz de reduzir custos, acelerar a inovação e aumentar a probabilidade de sucesso clínico.

Referências

- BANERJEE, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicities of small molecules. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2018.
- BRAGA, R. C. et al. Pred-hERG: a novel web-accessible computational tool for predicting cardiac toxicity. *Molecular Informatics*, v. 34, n. 10, p. 698-701, 2015.
- CHENG, F. et al. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, n. 11, p. 3099-3105, 2012.
- FU, L. 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 Research*, v. 52, p. W50-W56, 2024.
- MYUNG, Y.; DE SÁ, A. G. C.; ASCHER, D. B. Deep-PK: deep learning for small molecule pharmacokinetic and toxicity prediction. *Nucleic Acids Research*, v. 52, p. W20-W28, 2024.

CÓDIGO: SB1452

AUTOR: BIANCA POSTERLI FIRMINO

ORIENTADOR: LILIAN GIOTTO ZAROS DE MEDEIROS

TÍTULO: Prevalência de Parasitos Intestinais e a Influência de Fatores Socioeconômicos em Crianças Pré-Escolares de Natal, Rio Grande do Norte.

Resumo

O estudo investigou a prevalência de parasitos intestinais em 34 crianças em idade pré-escolar em um Centro Municipal de Ensino Infantil (CMEI) de Natal. A metodologia envolveu a aplicação de um questionário socioeconômico e a análise de amostras de fezes e do conteúdo perianal. Foi constatado que 32,5% das crianças estavam infectadas por pelo menos um parasito, sendo *Entamoeba coli* e *Enterobius vermiculares*, os mais frequentes (11,76%). Foram observados também *Entamoeba histolytica/dispar* (8,82%), *Giardia lamblia* (5,88%) e *Endolimax nana* (5,88%). O estudo também registrou três casos de coinfeção entre *E. histolytica/dispar* e *G. lamblia*. Foi observada relação entre as infecções e condições de saneamento e higiene. Crianças que vivem em residências com fossas sépticas apresentaram uma taxa de infecção de 42,1% em comparação com 26,7% daquelas com acesso à rede pública de esgoto. A falta do hábito de lavar as mãos após usar o banheiro foi associada a uma taxa de infecção de 80%. A frequência de banhos diários também se mostrou relevante, com 66,7% das crianças tomando apenas um banho por dia, apresentando resultado positivo. Curiosamente, a renda familiar não demonstrou uma associação direta com a prevalência de parasitoses neste estudo. Os resultados reforçam a necessidade de políticas públicas e ações de educação em saúde para a melhoria do saneamento básico e a promoção de práticas de higiene, visando o controle das parasitoses que afetam o desenvolvimento infantil.

Palavras-chave: Enteroparasitoses, higiene, saneamento básico

TITLE: Prevalence of Intestinal Parasites and Influence of Socioeconomic Factors in Preschool Children in Natal, Rio Grande do Norte.

Abstract

This study investigated the prevalence of intestinal parasites in 34 preschool-age children at a Municipal Early Childhood Education Center (CMEI) in Natal. The methodology involved administering a socioeconomic questionnaire and analyzing stool samples and perianal swabs. It was found that 32.5% of the children were infected with at least one parasite, with *Entamoeba coli* and *Enterobius vermicularis* being the most common (11.76%). *Entamoeba histolytica/dispar* (8.82%), *Giardia lamblia* (5.88%), and *Endolimax nana* (5.88%) were also observed. The study also recorded three cases of coinfection between *E. histolytica/dispar* and *G. lamblia*. A relationship between infections and sanitation and hygiene conditions was observed. Children living in homes with septic tanks had an infection rate of 42.1% compared to 26.7% for those with access to the public sewage system. Lack of handwashing after using the bathroom was associated with an 80% infection rate. The frequency of daily bathing was

also significant, with 66.7% of children bathing only once a day and testing positive. Interestingly, family income did not demonstrate a direct association with the prevalence of parasitic infections in this study. The results reinforce the need for public policies and health education initiatives to improve basic sanitation and promote hygiene practices, aiming to control parasitic infections that affect child development.

Keywords: Enteroparasitosis, hygiene, basic sanitation

Introdução

As infecções causadas por parasitos intestinais representam um problema de saúde pública mundial de difícil solução, tendo alta prevalência em território brasileiro e forte relação com as más condições de saneamento básico, higiene e educação.

Essas infecções são causadas por helmintos pertencentes aos gêneros *Ascaris*, *Ancylostoma* e *Necator*, *Enterobius*, *Hymenolepis*, *Schistosoma*, *Strongyloides*, *Taenia*, *Trichuris*, bem como por protozoários dos gêneros *Entamoeba*, *Cystoisospora*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, dentre outros (SILVA, 2018). Os principais meios de contaminação por esses parasitos são a via cutânea, oral e oral-fecal. Esses mecanismos, combinados com os hábitos comportamentais frequentemente vistos em indivíduos de 1 a 12 anos, como levar a mão a boca e andar descalço, tornam as crianças um grupo altamente vulnerável a essas infecções (AGUILAR-MARCELINO et al., 2017).

Entretanto, há um público cuja especificidades o torna ainda mais vulnerável às enteroparasitoses: as crianças em idade pré escolar, uma vez que seus hábitos de má higiene combinados com a fragilidade do sistema imunológico e a grande necessidade de nutrientes para seu desenvolvimento físico e cognitivo aumentam as morbidades causadas por essas infecções ao ocasionar quadros mais graves de desnutrição, ou até mesmo dificultar a concentração e disposição dos indivíduos, prejudicando sua formação escolar (JIA et al., 2019; BINEY et al., 2020). Quando se considera esse público (crianças de 0 a 6 anos, que ainda não tem idade para ingressar no ensino fundamental), os dados epidemiológicos relacionados à incidência parasitária são escassos, uma vez que a maioria dos estudos voltados a esse público têm uma abrangência etária maior, abordando crianças entre 6 a 12 anos (ARAÚJO et al., 2021).

Dentre esses poucos trabalhos, nossos estudos realizados em Natal-RN em um Centro Municipal de Ensino Infantil no ano de 2022/2023, foi constatada a presença de pelo menos um parasito em 51% das crianças, sendo identificados *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostomídeos*, *Entamoeba coli*, *Enterobius vermicularis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Endolimax nana*, *Strongyloides stercoralis*, *Hymenolepis sp.* e *Giardia lamblia* (CARVALHO et al., 2023). Relatórios da WHO referentes ao ano de 2023 mostraram a grande incidência de enteroparasitos em crianças em idade pré-escolar. Apesar da cobertura global, estes relatórios têm dados recentes

escassos referente a 30% dos países, incluindo o Brasil, o que torna a situação ainda mais preocupante (WHO, 2023b).

O impacto desses parasitos no desenvolvimento de crianças em idade pré-escolar é extremamente negativo, ocasionando menor desenvolvimento motor, menor desempenho cognitivo e maior risco de anemia. Além disso, as crianças podem ter dificuldade em aprender novas informações e conceitos, problemas de atenção, hiperatividade e impulsividade e atrasos no desenvolvimento social (JARDIM-BOTELHO et al., 2008;

ROCHA, 2022), que podem ser causados pela inflamação que ocorre no intestino, podendo levar a alterações no funcionamento cerebral, desnutrição, e acarretando anemia, afetando assim a capacidade de aprendizagem e concentração (ANSUYA et al., 2023). Em alguns casos, os impactos das parasitoses intestinais podem ser reversíveis após o tratamento, como no estudo supracitado. No entanto, em outros casos, os danos podem ser permanentes.

Nesse sentido, o presente plano de trabalho é parte do projeto de pesquisa "Estudo da frequência de parasitos intestinais em crianças em idade pré-escolar em Centros Municipais de Ensino Infantil de Natal - RN" (PIA22569-2024) e visa identificar a frequência de parasitos intestinais em crianças em idade pré-escolar do Centro Municipal de Ensino Infantil (CMEI) Moema Tinoco, tanto para fins epidemiológicos como para prevenção das parasitoses em áreas mais acometidas.

Metodologia

1- Tipo de estudo: Trata-se de um estudo transversal com finalidade aplicada, cuja forma de abordagem é quali-quantitativa, a fim de identificar os principais parasitos intestinais em crianças em idade escolar e associar essa frequência a fatores socioeconômicos e biológicos.

2- Boas práticas científicas:

O presente projeto de pesquisa engloba o envolvimento com seres humanos e por isso, fez-se necessário a elaboração de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Anexo I. Além disso, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte sob o CAAE 82212824.0.0000.5537, no qual os pesquisadores se comprometeram a honrar os princípios éticos e legais que regem a pesquisa ética e científica com seres humanos, bem como explicar detalhadamente o procedimento a ser realizado.

3- Local do estudo:

O estudo foi realizado no Centro Municipal de Ensino Infantil Moema Tinôco da Cunha Lima, localizado no Município de Natal Trata-se de uma instituição municipal pública, administrada pela Secretaria Municipal da Educação de Natal. A escola foi contactada e aceitou participar da pesquisa, conforme registrado na carta de anuência (Anexo II)

4- População de estudo e critério de inclusão:

A população do estudo foi composta por 34 crianças. Foram parte da amostra os alunos que apresentarem os seguintes critérios de inclusão: crianças devidamente matriculadas; crianças com idade entre 2 e 6 anos; crianças cujos pais ou responsáveis permitiram a participação e preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) disponibilizado no momento da apresentação da pesquisa.

6- Coleta dos dados socioeconômicos:

Para conhecer o perfil socioeconômico das crianças e associá-lo ao estudo, foi aplicado um questionário (Anexo III), composto por dados de identificação dos participantes e questões sobre alguns fatores de risco para ocorrência de parasitoses, como condições de moradia e saneamento básico, hábitos higiênicos, casos diagnosticados anteriormente na família e

alguma informação verbalizada que seja de valia para a pesquisa. Esse questionário foi previamente validado nas pesquisas realizadas entre os anos de 2020 a 2023.

7- Coleta das amostras biológicas (fezes e imprint da região perianal):

Aos responsáveis foram entregues um kit (Figura 1) devidamente identificado que continha três potes coletores e uma lâmina para Graham. Para realizar a coleta em dias alternados da maneira correta e segura, durante a entrega do material de coleta, os pais foram devidamente instruídos sobre os procedimentos a serem realizados, assim como acerca das datas de entrega.

8- Análises Parasitológicas:

Para a determinação da presença de parasitos nas fezes foram realizados os exames diagnósticos seguindo a metodologia de Hoffman, Pons & Janer (HOFFMAN, PONS e JANER, 1934), Willis-Mollay (WILLIS, 1921), Rugai, Mattos e Brizola (RUGAI, MATOS e BRISOLA, 1954) e Graham (GRAHAM, 1941). Os exames foram realizados em triplicata, com amostras de fezes frescas coletadas em dias alternados e cada amostra foi analisada em triplicata por três leitores diferentes.

9- Emissão dos resultados:

Os resultados foram visualizados em um laudo laboratorial (Anexo IV) assinado pela professora responsável e entregue aos responsáveis dos participantes. Para aqueles cujo resultado foi positivo, houve a prescrição de medicamento pela médica colaboradora, assim como orientações mais precisas sobre o tratamento.

Vale ressaltar que não houve divulgação de dados pessoais e que todo sigilo e confidencialidade foram preservados. Os resultados serão divulgados em eventos científicos e revistas científicas da área sem divulgar nomes ou imagens dos participantes ou de alguma informação que possa, de alguma forma, identificá-los.

10-Análise dos dados:

Os dados coletados foram digitados no programa Microsoft Excel e importados para o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (versão 22.0 for Windows), no qual foram tabulados e analisados a partir da estatística descritiva e inferencial, e apresentados sob a forma de tabelas e quadros.

Resultados e Discussões

As análises das amostras de fezes e do conteúdo perianal das 34 crianças revelaram uma prevalência significativa de enteroparasitos. Observou-se que quase um terço (32,5%) dos indivíduos apresentaram um resultado positivo para pelo menos um parasito, fator que evidencia a importância clínica e epidemiológica desse tipo de análise nessa população (Tabela 1).

Conforme detalhado na Tabela 1, os parasitos mais prevalentes foram protozoário comensal *Entamoeba coli* e o helminto *Enterobius vermiculares* ambos presentes em 11,76% das amostras. Embora *E.coli* seja um organismo não patogênico, sua presença indica que as crianças tiveram acesso a água contaminada por fezes humanas, facilitando a contaminação

por outros patógenos que também são de veiculação hídrica. Já o nematoide *E. vermiculares*, é um parasito cuja a contaminação é facilitada em crianças, uma vez que possuem hábitos como levar a mão suja à boca, principal meio de infecção, uma vez que o parasito não necessita de um hospedeiro intermediário.

A presença do complexo *Entamoeba histolytica/dispar* em 8,82% das amostras é preocupante. Embora as espécies *E. dispar* (não patogênica) e *E. histolytica* (patogênica) sejam morfolologicamente idênticas e tenham as mesmas formas de transmissão, sua detecção indica um risco considerável para o desenvolvimento de amebíase. Essa doença pode causar quadros disentéricos e, em casos graves, sangramentos e lesões hepáticas, caso haja migração para o fígado.

Com menor frequência, foi diagnosticada a presença dos protozoários *Giardia lamblia* e *Endolimax nana* em 5,88% das amostras. Apesar de possuir a mesma forma de transmissão, através da ingestão de água ou alimentos contaminados, diferente de *E. nana*, *G. lamblia* é um protozoário patogênico de grande importância médica, que apesar de estar presente em casos assintomáticos, em alguns casos pode gerar quadros diarreicos graves com sangramentos e, em infecções crônicas, podendo levar a síndrome da má absorção de nutrientes essenciais como gorduras e vitaminas lipossolúveis.

Foram observados três casos de biparasitismo, cada um correspondendo a 2,94% das amostras (Tabela 2), com destaque para a associação entre *E. histolytica/dispar* e *G. lamblia*, combinação que pode agravar as morbidades gastrointestinais, piorando o quadro de má absorção de nutrientes e consequentemente, aumentando o grau de anemia do indivíduo. Já a associação entre parasitos com diferentes ciclos de vida e meios de transmissão, como os enteroprotzoários e *E. vermiculares*, chama a atenção pois revela que o indivíduo está sendo exposto a mais de uma forma de contaminação, sugerindo hábitos precários de higiene e saneamento. De modo geral, a presença de coinfeções representa um obstáculo no tratamento das parasitoses, principalmente quando se trata de classe de organismos distintos, como protozoários e helmintos, uma vez que, para alguns parasitos a medicação e orientação pós tratamento é singular.

Com base na análise detalhada dos dados coletados através do questionário socioeconômico, é possível traçar um perfil abrangente das crianças e suas respectivas famílias, relacionando com fatores que podem influenciar a prevalência das enteroparasitoses no público estudado.

A análise da renda familiar (Gráfico 1) indica uma concentração na classe D/E. Embora a baixa renda seja comumente associada a casos de parasitoses, esse padrão não se manteve no presente estudo.

Observando o Gráfico 2, pode-se constatar que os casos positivos se mantiveram constantes em todas as faixas de renda analisadas, sendo cerca de $\frac{1}{3}$ para cada classe financeira.

As respostas sobre saneamento básico sugerem uma falta de compreensão adequada sobre seu conceito, uma vez que 73,5% das famílias dizem ter suas residências conectadas à rede de saneamento básico, mesmo que 55,9% disseram utilizar fossas como principal meio de descarte de dejetos, uma condição que foi diretamente associada a uma maior prevalência de parasitos, visto que 42,1% das crianças que vivem nessas residências estavam parasitadas. Já as crianças que moram em residências que possuem ligação com a rede pública, apenas 26,7% obtiveram um status positivo (Tabela 3). Esse número elevado pode ser explicado pela

contaminação do solo e/ou água com os dejetos humanos, favorecendo a continuação do ciclo dos parasitos, tanto os de veiculação hídrica quanto dos geohelmintos.

Considerando a higiene pessoal, a análise dos dados revelou relação com a prevalência de parasitos. A prática de lavar as mãos após o uso do banheiro (Gráfico 2) demonstrou ter alta influência na taxa de infecções, uma vez que 80% das crianças que não possui o hábito estavam parasitadas, as que o fazem “as vezes” apenas 37,5% e cai para 23,8% no grupo que sempre lavam as mãos. Esse dado é importante pois alguns parasitos como *E. vermiculares* possuem transmissão direta, ou seja, não necessitam passar uma parte do ciclo no solo para concluir o embrionamento e chegar a sua forma infectante, como é o caso de alguns geohelmintos.

A frequência de banhos (Gráfico 3) também demonstrou resultados significativos visto que 66,7% das crianças que tomam banho apenas uma vez por dia estavam parasitadas, já as que tomam mais de um, apenas 32,3% testaram positivo. A relevância deste dado não reside, provavelmente, no ato do banho como um mecanismo direto de eliminação de parasitos já instalados no intestino, mas sim no que a frequência de banhos pode representar como um indicador indireto de outras condições de exposição e higiene. É válido supor que uma maior frequência de banhos tenha ligação com um conjunto mais amplo de práticas de cuidado e a um ambiente doméstico com padrões de limpeza mais rigorosos.

Os estudos anteriores auxiliaram na percepção acerca da influência socioeconômica nos status parasitológicos. Em 2023, o estudo conduzido na Zona Norte de Natal, uma região caracterizada pela acentuada desigualdade social, revelou um cenário de alta prevalência de parasitoses, onde 61% das crianças analisadas apresentaram resultado positivo para pelo menos um parasito. A população dessa região enfrenta carência de acesso ao saneamento básico e à informação sobre profilaxia, além de maior contato com ruas não asfaltadas e consumo de alimentos de agricultura familiar, fatores que, somados, contribuem para a disseminação de parasitos.

O cenário observado em 2024, com os estudantes dos CMEIs Vilma Teixeira Dourado Dutra (Capim Macio) e Kátia Fagundes Garcia (Candelária), apresentou uma divergência considerável. A localização desses CMEIs em áreas com melhor infraestrutura de saneamento básico, maior acesso a ações de profissionais de saúde e vias predominantemente asfaltadas, foram fatores que possivelmente influenciaram a baixa prevalência de parasitos, especialmente de helmintos.

A pesquisa atual, realizada em 2025 no CMEI Moema Tinoco (Neópolis), apresenta um contexto intermediário. Embora seja um bairro com uma infraestrutura mais consolidada que a Zona Norte, o estudo ainda aponta uma prevalência significativa, na qual 32,5% dos indivíduos apresentaram um resultado positivo para pelo menos um parasito. A análise comparativa entre os três estudos reforça, portanto, a estreita relação entre as condições de vida da população e a prevalência de infecções parasitárias, destacando a necessidade de políticas públicas direcionadas para as áreas de maior vulnerabilidade.

Conclusão

O presente estudo revelou uma prevalência significativa de infecções por enteroparasitos acometendo 32,5% das crianças. Os agentes mais frequentes foram *Entamoeba coli* e

Enterobius vermiculares, ambos com 11,76% de prevalência, seguidos pelo complexo *Entamoeba histolytica/dispar* (8,82%), *Giardia lamblia* (5,88%) e *Endolimax nana* (5,88%). A presença de *E. coli* serve como um importante indicador de contaminação fecal da água, enquanto a infecção por *E. vermiculares* está diretamente ligada a hábitos de higiene, como levar as mãos à boca.

A análise dos fatores socioeconômicos demonstrou que as condições de saneamento e os hábitos de higiene pessoal foram determinantes para a infecção. Crianças residentes em lares com fossas apresentaram uma taxa de infecção maior (42,1%) em comparação com aquelas que residem em domicílios conectados à rede pública de esgoto (26,7%). Para além disso, a ausência do hábito de lavar as mãos após usar o banheiro foi associada a uma taxa de infecção de 80%, um valor superior aos 23,8% observados entre as crianças que sempre o fazem. De forma similar, tomar apenas um banho por dia teve relação com uma maior prevalência de parasitos (66,7%). Curiosamente, a renda familiar não apresentou uma associação direta com a ocorrência de parasitoses neste grupo específico.

Em um contexto mais amplo, a prevalência encontrada posiciona esta pesquisa em um cenário intermediário quando comparada a estudos anteriores na mesma cidade: superior aos índices de áreas com melhor infraestrutura (2024), mas inferior ao de regiões com maior vulnerabilidade social (61% em 2023).

Portanto, o estudo conclui que as infecções por parasitos intestinais permanecem um problema de saúde relevante entre crianças em idade pré-escolar em Natal-RN, sendo fortemente influenciadas por fatores socioambientais e de higiene. Os resultados reforçam a necessidade de implementação de políticas públicas e ações de educação em saúde focadas na melhoria do saneamento básico e na promoção de práticas de higiene para prevenir e controlar as parasitoses, que afetam negativamente o desenvolvimento e a saúde infantil.

Referências

AGUIAR, Kelly Cristina Genesio de et al. Fatores de risco para ocorrência de diarreia em crianças residentes na Ilha de Guaratiba (RJ). *Saúde em Debate*, v. 44, p. 205-220, 2020.

ANSUYA et al. Efeito da intervenção nutricional no desenvolvimento cognitivo de crianças pré-escolares desnutridas: ensaio clínico randomizado. *Relatórios Científicos*, v. 13, n. 1, pág. 10636, 2023.

ARAÚJO, Rubens Da Silva et al. Panorama da prevalência de enteroparasitos em crianças no Brasil: Uma revisão da literatura. In: *Congresso Internacional em Saúde*. 2021.

BINNEY, Richard J.; RAMSEY, Ricardo. Semântica Social: O papel do conhecimento conceitual e do controle cognitivo em um modelo neurobiológico do cérebro social. *Neurociências e Revisões Biocomportamentais*, v. 28-38, 2020.

CARVALHO, E.B. et al. Relationship between parasitic infections and body mass index in children from preschool age. *Anais do XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia*. Aracaju. 2023.

GRAHAM, C.F. A Device for the Diagnosis of *Enterobius* Infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21, 159-161.1941

HOFFMAN, William A. et al. The Sedimentation-Concentration Method In Schistosomiasis mansoni. Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine, v. 9, n. 3, 1934.

JARDIM-BOTELHO, Anne et al. Hookworm, Ascaris lumbricoides infection and polyparasitism associated with poor cognitive performance in Brazilian schoolchildren. Tropical Medicine & International Health, v. 13, n. 8, p. 994-1004, 2008.

ROCHA, A. S. Epidemiologia e políticas públicas de saúde: volume 1. São Paulo: Editora Atheneu, 2022. 638 p.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes-modificação do método de Baermann. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 14, n. 1, p. 5-8, 1954

SILVA, Maria Bernarda Magalhães. A Ocorrência de Parasitoses Intestinais em alunos do ensino fundamental na zona rural rede Municipal de São Luís-Maranhão e sua relação com os hábitos alimentares. 2018. Tese de Doutorado.

WILLIS, H. Hastings et al. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. Medical Journal of Australia, v. 2, n. 18, 1921.

World Health Organization. Control of Neglected Tropical Diseases 2023a. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview>>. Acesso em: 27/08/2025.

World Health Organization. Global Report On Neglected Tropical Diseases 2023b. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/global-report-on-neglected-tropical-diseases-2023>>. Acesso em: 27/08/2025.

Anexos

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

CÓDIGO: SB1457

AUTOR: PABLO VINICIUS CICERO MENDONÇA MARIANO

COAUTOR: RAIÇA DOMINIQUE MARIANA GOMES DA COSTA BRAZ

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Avaliação de atividade antibacteriana do TsAP-A41, um análogo sintético do peptídeo antimicrobiano TsAP-2

Resumo

A resistência antimicrobiana é um grave problema de saúde pública de escala mundial. Considerando a ameaça que representa para a qualidade e a expectativa de vida de milhões de pessoas ao redor do globo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. O estudo de peptídeos antimicrobianos (PAMs) é uma linha de pesquisa reconhecidamente promissora. O TsAP-2 é um PAM presente na peçonha dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus stigmurus*, o qual apresenta atividade antimicrobiana *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* contra bactérias Gram-positivas e leveduras do gênero *Candida*. Apesar do potencial do TsAP-2, este peptídeo não demonstra atividade contra espécies Gram-negativas, as quais constituem importantes agentes patogênicos. Buscando obter uma molécula com espectro de ação ampliado, realizou-se substituições de aminoácidos neutros da sequência primária do TsAP-2 por aminoácidos com carga positiva, originando o análogo sintético TsAP-A41. A realização de metodologias *in vitro* revelou que o TsAP-A41 apresentou capacidade inibitória e bactericida contra cepas Gram-positiva e Gram-negativa. Concentrações sub-inibitórias do TsAP-A41 demonstraram maior efeito sobre cepa Gram-negativa do que Gram-positiva na avaliação da cinética de crescimento microbiano. A ampliação de espectro do TsAP-A41 em relação ao TsAP-2 corrobora a utilidade do desenho racional de PAMs sintéticos a partir de peptídeos nativos da peçonha de escorpiões.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Peptídeos análogos. Atividade antibacteriana

TITLE: Evaluation of the antibacterial activity of TsAP-41, a synthetic analog of the antimicrobial peptide TsAP-2

Abstract

Antimicrobial resistance is a serious worldwide public health issue. Considering the threat it represents to the quality and life-expectancy of millions of people around the globe, it's necessary to develop new treatment alternatives. The study of antimicrobial peptides (AMPs) is a well-known and promising research line. TsAP-2 is an AMP present in the venom of the *Tityus stigmurus* and *Tityus serrulatus* scorpions that has show *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and yeasts of the *Candida* genus. Despite TsAP-2's potential, this peptide hasn't demonstrated activity against Gram-negative species, which constitute important pathogenic agents. Seeking a molecule with broadened action spectrum, substitutions in TsAP-2 primary sequence were performed, replacing neutral

amino acids for positively charged ones, originating the synthetic analog TsAP-A41. In vitro methodologies revealed that TsAP-A41 presented inhibitory and bactericidal activity against Gram-positive and Gram-negative strains. Sub-inhibitory concentrations of TsAP-A41 demonstrated greater effect over a Gram-negative strain than a Gram-positive one in the evaluation of microbial growth kinetics. TsAP-A41's broadened action spectrum in comparison to TsAP-2 corroborates the utility of rational design of synthetic AMPs based on native peptides from scorpion venom.

Keywords: Antimicrobial peptides. Analog peptides. Antibacterial activity.

Introdução

Microrganismos multirresistentes aos antibióticos habitualmente utilizados em recintos comunitário e hospitalar são um gravíssimo problema de saúde pública de escala global, com 4,95 milhões de mortes em 2019 associadas à resistência microbiana (Ghosh et al., 2019; Murray et al., 2022; OMS, 2023). Infecções por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* resultam em elevada mortalidade, dessa maneira se faz urgente a necessidade da busca por alternativas terapêuticas eficientes (OMS, 2017; Murray et al., 2022). Nesse contexto, emerge o estudo da peçonha de escorpiões; os estudos têm revelado uma fonte complexa de compostos ainda pouco explorados, com elevado potencial antimicrobiano. O TsAP-2 (FLGMIPGLIGGLISAFK-NH₂) é um peptídeo catiônico com 17 resíduos de aminoácidos, carga superficial +2, sem pontes dissulfeto, oriundo da peçonha dos escorpiões *Tityus stigmurus* e *Tityus serrulatus*. Estudos apontam a atuação promissora do TsAP-2 como agente antibacteriano, antifúngico, imunomodulador e antiproliferativo (Guo et al., 2013; Daniele-Silva et al., 2016). Apesar do potencial terapêutico, o TsAP-2 demonstrou in vitro ausência de efeito contra bactérias Gram-negativas (Guo et al., 2013). Com o intuito de potencializar a ação do peptídeo nativo e obter moléculas com baixa toxicidade, análogos do TsAP-2 foram obtidos por análises de bioinformática (40 peptídeos análogos com pedido de depósito de patente BR 102020023857-4). Estudos da literatura atestam que análogos sintéticos com carga superficial superior à do peptídeo nativo apresentam maior eficiência antimicrobiana por atuarem em menores concentrações bem como por possuir um amplo espectro de ação antibiótico em relação ao protótipo (Guo et al., 2013; Parente et al., 2018; Amorim-Carmo et al., 2019; Furtado et al., 2022). Neste estudo, um novo peptídeo análogo denominado de TsAP-A41 (FLKMIPRLIKRLISAFK-NH₂) foi avaliado em relação a seu efeito antibacteriano contra cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), bem como foi investigada a cinética de crescimento bacteriano na presença do peptídeo, indicando o desenho racional de moléculas a partir de componentes presentes na peçonha de escorpiões como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Metodologia

1. OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO: O peptídeo sintético liofilizado TsAP-A41 (FLKMIPRLIKRLISAFK-NH₂) foi obtido comercialmente da empresa AminoTech Pesquisa e Desenvolvimento (São Paulo, Brasil), com amidação C-terminal e pureza maior que 90%. O peptídeo foi mantido refrigerado a -20 °C até o momento do uso. **2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA:** A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Cockerill et al., 2012), com modificações. Foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Resumidamente, a suspensão de

microrganismo (1×10^6 UFC/mL) em caldo Mueller-Hinton (MH) foi incubada com diferentes concentrações do peptídeo análogo ($1,3 - 331,8 \mu\text{g/mL}$) por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a incubação, a absorbância foi mensurada a 595 nm em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA). Poços com apenas caldo MH na ausência do peptídeo foram utilizados como controle de esterilidade (controle negativo de crescimento) e poços com caldo MH e inóculo bacteriano como controle positivo de crescimento dos microrganismos. Gentamicina foi utilizada como controle do perfil de sensibilidade das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento visível após 24 h de incubação, revelando uma absorbância semelhante ao controle negativo a 595 nm (Cao et al., 2012).

3. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA: Após incubação por 24 h dos inóculos bacterianos com o TsAP-A41 nas condições descritas acima, foram recolhidas alíquotas de $5 \mu\text{L}$ para subcultivo em ágar Mueller-Hinton (MH). As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Foram consideradas bactericidas as concentrações do peptídeo TsAP-A41 que inibiram visivelmente o crescimento do microrganismo no ágar MH. A razão entre a concentração bactericida (CBM) e inibitória (CIM) mínima foi empregada para determinação da ação bacteriostática ou bactericida do peptídeo TsAP-A41. $\text{CBM/CIM} \leq 2$ indica ação bactericida, $4 \leq \text{CBM/CIM} < 32$ indica ação bacteriostática e $\text{CBM/CIM} \geq 32$ indica tolerância da bactéria em relação à molécula-teste (Al-Ani et al., 2015).

4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO: Para a avaliação da cinética de morte bacteriana foi realizada a incubação da suspensão bacteriana conforme descrito anteriormente com o peptídeo análogo nas concentrações de $2 \times \text{CIM}$, $1 \times \text{CIM}$ e $0,5 \times \text{CIM}$. A absorbância das amostras foi avaliada em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) a 595 nm, nos tempos de 0, 12, 16, 20 e 24 h. Foi utilizado como controle positivo o crescimento bacteriano na ausência do peptídeo. Para o controle de sensibilidade foi utilizada a Gentamicina para as bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (Cao et al., 2012; Daniele-Silva et al., 2016).

Resultados e Discussões

1. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA A análise das CIMs do TsAP-A41 revelou potencialização do efeito do análogo sintético em relação ao PAM nativo (Tabela 1). Guo et al. (2013) haviam encontrado CIM de $5 \mu\text{M}$ ($8,7 \mu\text{g/mL}$) para o TsAP-2 em cepa de *S. aureus* (NCTC 10788). Daniele-Silva et al. (2016) demonstraram atividade inibitória do TsAP-2 sobre cepa de *S. aureus* resistente à metilicina (ATCC 33591) em $17,3 \mu\text{g/mL}$, correspondendo a $9,98 \mu\text{M}$. O TsAP-A41 apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* (ATCC 25923) em $5,2 \mu\text{g/mL}$ ($2,5 \mu\text{M}$), representando maior eficiência em menor concentração. Ademais, também foi observada ampliação do espectro de ação em relação ao TsAP-2, pois o análogo foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*, cepa Gram-negativa, na concentração de $10,4 \mu\text{g/mL}$ ($5 \mu\text{M}$). Em estudo anterior, Guo et al. (2013) foram incapazes de observar inibição de *E. coli* (NCTC 10418) mesmo em altas concentrações de TsAP-2 (máximo de $320 \mu\text{M}$). Dados experimentais revelaram sensibilidade de *S. aureus* e *P. aeruginosa* à Gentamicina nas concentrações de 2 e $16 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

2. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA Ao realizar o cálculo CBM/CIM observou-se atividade bactericida por parte do peptídeo análogo sobre as cepas testadas. Anteriormente, Guo et al. (2013) e Daniele-Silva et al. (2016) haviam relatado ação bactericida por parte do TsAP-2 para cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, porém o peptídeo nativo demonstrou CBMs superiores aos valores encontrados para o peptídeo análogo. Guo et al. (2013), utilizando a cepa *S. aureus* (NCTC 10788),

observaram CBM de 17,3 $\mu\text{g/mL}$ (10 μM) para o TsAP-2; o TsAP-A41 (Tabela 2) demonstrou CBM de 5,2 $\mu\text{g/mL}$ (2,5 μM) para cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), representando uma queda de 75% em relação ao peptídeo nativo. Destaca-se a ação bactericida do análogo TsAP-A41 contra bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (Tabela 2) na concentração de 10,4 $\mu\text{g/mL}$ (5 μM) atividade fora da alçada do peptídeo nativo, conforme demonstrado por Guo et al. (2013). 3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO: A avaliação da cinética (Figura 1) revelou efeito inferior de concentrações sub-inibitórias do peptídeo TsAP-A41 sobre o crescimento bacteriano em comparação com as concentrações de 1x e 2x CIM para ambas as cepas testadas. Frente a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923), o TsAP-A41 apresentou pouca influência sobre a cinética bacteriana na concentração de 0,5x CIM, exibindo um perfil similar ao crescimento do controle positivo (inóculo não tratado). A concentração de 2x CIM do TsAP-A41 demonstrou perfil semelhante a todas as concentrações de Gentamicina testadas (0,5, 1 e 2x CIM) até às 16 h, divergindo a partir deste ponto. Comportamento similar foi observado diante da cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), com o TsAP-A41 na concentração de 2x CIM exibindo efeito inibitório comparável ao da Gentamicina em todas as concentrações testadas (0,5x 1 e 2x CIM) até às 16 h de incubação. As concentrações de 0,5x e 1x CIM do TsAP-A41 demonstraram capacidade inibitória similar para *P. aeruginosa*, atingindo efeito bactericida a partir das 20 h de incubação.

Conclusão

O peptídeo análogo TsAP-A41 apresentou concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus* de 5,2 $\mu\text{g/mL}$ e de 10,4 $\mu\text{g/mL}$ contra *P. aeruginosa*, assim demonstrando ação antimicrobiana. Ainda em relação à CIM, o TsAP-A41 mostrou ser mais potente do que o peptídeo nativo, já que inibiu *S. aureus* com metade concentração de TsAP-2 relatada em estudos da literatura, conseguindo também inibir a bactéria *P. aeruginosa*, demonstrando ampliação de espectro do análogo TsAP-A41 em comparação com o peptídeo nativo, o qual mostrou-se ineficaz contra cepas Gram-negativas em estudos anteriores. O peptídeo TsAP-A41 se mostrou bactericida contra ambas as bactérias testadas, inibindo *S. aureus* com concentração 75% menor do que a concentração necessária de TsAP-2 obter para um efeito similar. O TsAP-A41 também apresentou capacidade bactericida contra *P. aeruginosa*, atividade não relatada na literatura para o TsAP-2. Analisando as curvas de cinética de crescimento microbiano foi possível observar efeito antibacteriano concentração-dependente, com concentrações mais altas de TsAP-A41 apresentando efeito antibacteriano superior. Tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*, as concentrações correspondentes a 2x CIM apresentaram perfis de inibição semelhantes ao da Gentamicina, antibiótico de referência, até às 16 h de incubação. Esses resultados indicam que o TsAP-A41 é um candidato promissor como fármaco antimicrobiano.

Referências

AMORIM-CARMO, Bruno et al. Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide stigmurin. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 3, p. 623, 2019. ANTIMICROBIAL RESISTANCE. World Health Organization. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>. Acesso em 20 de junho de 2024. CAO, Luyang et al. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo. *PloS one*, v. 7, n. 7, p. e40135, 2012.

COCKERILL, F. R. et al. M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pensilvania, USA: [s.n.]. DANIELE-SILVA, Alessandra et al. Stigmurin and TsAP-2 from Tityus stigmurus scorpion venom: assessment of structure and therapeutic potential in experimental sepsis. Toxicon, v. 121, p. 10-21, 2016. FURTADO, Allanny Alves et al. In silico and in vitro structure-stability-function relationship of analog peptides of Stigmurin and its antibacterial and antibiofilm activities. Pharmacological Research, v. 181, p. 106245, 2022. 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. GUO, Xiaoxiao et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, Tityus serrulatus: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. Biochimie, v. 95, n. 9, p. 1784-1794, 2013. ISSAM, 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. MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The lancet, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. PARENTE, Adriana MS et al. Analogs of the scorpion venom peptide stigmurin: structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. Toxins, v. 10, n. 4, p. 161, 2018. WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics. World Health Organization. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections. World health organization, p. 25–82, 2017.

Anexos

Tabelas e gráfico

CÓDIGO: SB1458

AUTOR: FERNANDA KAROLINE OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Avaliação da participação dos $\alpha 1A$ -adrenoceptores sobre o comportamento relacionado à depressão em zebrafish

Resumo

A depressão é um transtorno neuropsicológico marcado por anedonia e prejuízos funcionais, com alta prevalência mundial e maior incidência em mulheres. Embora diferentes hipóteses fisiopatológicas tenham sido propostas, sua base ainda é desconhecida. Estudos recentes apontam a participação de receptores adrenérgicos, sobretudo os $\alpha 1$ e evidências demonstram redução da atividade dos $\alpha 1$ -AR em quadros depressivos e ansiosos em humanos e também em modelos animais, além de alterações na densidade desses receptores em pacientes que cometeram suicídio. Nosso grupo já demonstrou que a tansulosina, antagonista seletivo dos $\alpha 1A$ -AR, induz o comportamento do tipo depressivo em camundongos, levantando a hipótese de envolvimento desse subtipo no Transtorno Depressivo Maior (TDM). Por isso, neste estudo, avaliamos os efeitos da tansulosina no comportamento depressivo em zebrafish, modelo translacional com alta homologia genética e grande aplicabilidade farmacológica. Foram utilizados 120 indivíduos adultos, submetidos a testes comportamentais (Novel Tank Test e escape em hipóxia) após tratamento com tansulosina (0,001; 0,01; 0,1 mg/L), reserpina e diazepam. Os resultados indicaram efeitos paradoxais para o diazepam e consistência depressogênica da tansulosina, especialmente na dose 0,01 mg/L, que aumentou o tempo no fundo do aquário, sugerindo participação dos receptores $\alpha 1A$ na etiologia do TDM.

Palavras-chave: Anedonia, Receptores adrenérgicos, Tansulosina, Zebrafish.

TITLE: Evaluation of the involvement of $\alpha 1A$ -adrenoceptors in depression-related behavior in zebrafish

Abstract

Depression is a neuropsychological disorder characterized by anhedonia and functional impairment, with high prevalence worldwide and higher incidence in women. Although different pathophysiological hypotheses have been proposed, its basis is still unknown. Recent studies point to the involvement of adrenergic receptors, especially $\alpha 1$, and evidence shows reduced $\alpha 1$ -AR activity in depressive and anxious conditions in humans and also in animal models, as well as changes in the density of these receptors in patients who have committed suicide. Our group has already demonstrated that tamsulosin, a selective $\alpha 1A$ -AR antagonist, induces

depressive-like behavior in mice, raising the hypothesis of the involvement of this subtype in Major Depressive Disorder (MDD). Therefore, in this study, we evaluated the effects of tamsulosin on depressive behavior in zebrafish, a translational model with high genetic homology and great pharmacological applicability. We used 120 adult individuals, which underwent behavioral tests (Novel Tank Test and escape in hypoxia) after treatment with tamsulosin (0.001, 0.01, 0.1 mg/L), reserpine, and diazepam. The results indicated paradoxical effects for diazepam and depressogenic consistency for tamsulosin, especially at a dose of 0.01 mg/L, which increased the time spent at the bottom of the aquarium, suggesting the involvement of $\alpha 1A$ receptors in the etiology of MDD.

Keywords: Anhedonia, Adrenergic receptors, Tamsulosin, Zebrafish.

Introdução

A depressão pode ser entendida como um transtorno neuropsicológico que está relacionado a uma perda de interesse pela vida (anedonia) e suas atividades cotidianas. Conforme dados epidemiológicos apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 280 milhões de pessoas, incluindo cerca de 5% de todos os adultos, sofriam com a depressão no ano de 2019. Esses números sofreram um incremento com a pandemia da COVID-19, tendo em vista o isolamento e as baixas trocas sociais, implicando em um contexto de introspecção forçada e propiciando um aumento de quadros ansiosos e depressivos em parte da população mundial (CUI et al., 2024).

Do ponto de vista clínico, o Transtorno Depressivo Maior (TDM) é caracterizado por alterações físicas como cansaço, perda de apetite, insônia, irritabilidade, bem como mau humor. Sua incidência é maior entre mulheres, sendo aproximadamente o dobro da observada em homens. Essa prevalência está muito associada à pressão econômica e social, sobretudo ao estresse gerado pela conjuntura patriarcal e capitalista do mundo moderno (CHRISTENSEN et al., 2020; MARTINS, 2023).

Entretanto, da perspectiva biológica, a depressão está atrelada a um conjunto de fatores ainda não totalmente bem entrelaçados e compreendidos, tendo em vista a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos e das múltiplas hipóteses associadas ao desenvolvimento do quadro depressivo. Para esse trabalho, o foco se dará na hipótese das monoaminas. Essa é considerada a hipótese clássica para explicar a etiologia da base biológica da depressão e afirma que as deficiências de certos neurotransmissores, como dopamina (DA), serotonina (5-HT) e norepinefrina são a explicação para o quadro de depressão clínica (GOMES; GASPARG, 2018).

Por conseguinte, a família dos receptores adrenérgicos, em especial os $\alpha 1$ -AR, tem se demonstrado com atividade reduzida em humanos em quadro ansioso, bem como em modelos animais de depressão baseados no estresse crônico. É notório que o estresse e fatores como ACTH-corticosterona tem potencial de dessensibilizar os receptores $\alpha 1$ -AR no Sistema Nervoso Central (SNC) de roedores. Em humanos, por sua vez, alguns estudos apresentaram evidências da redução da densidade dos

receptores α 1-AR na cauda e no corpo do estriado de pacientes depressivos que cometeram suicídio (STONE et al., 2003).

O principal subtipo de receptor α 1-AR envolvido na depressão é o α 1B-AR (CHMIELARZ et al., 2021). No entanto, recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou a participação do receptor do tipo α 1A-AR quando antagonizados por tansulosina, pois induziram o comportamento do tipo depressivo em camundongos (HOLANDA et al., 2022). Diante do exposto, suspeitamos do potencial de participação desse subtipo de receptor adrenérgico no desenvolvimento de quadros depressivos.

Nessa instância, o nosso estudo teve como objetivo avaliar a participação dos adrenoceptores- α 1A (α 1A-AR), usando a tansulosina, um antagonista seletivo para estes receptores, sobre o comportamento relacionado à depressão em zebrafish. Utilizamos esse modelo animal em virtude de uma alta taxa de semelhança genética com humanos. Seu potencial farmacológico também é notório, haja vista absorverem substâncias diretamente pela água, permitindo a testabilidade de fármacos de forma rápida e em diferentes concentrações, além de apresentarem comportamentos mensuráveis como do tipo depressivo, ansioso, de aprendizagem e memória (MRINALINI et al., 2023, p. 97).

Estudos que avaliem esse receptor, utilizando ferramentas farmacológicas seletivas (agonistas/antagonistas), contribuem para o entendimento da fisiopatologia do Transtorno Depressivo Maior (TDM) e podem angariar suporte para a criação de novas estratégias terapêuticas. A busca multimodal por novas abordagens diagnósticas para TDM se faz cada vez mais necessária para dar suporte às subjetividades encontradas pelo diagnóstico clínico.

Metodologia

Este estudo utilizou 120 indivíduos adultos de Zebrafish (Dario rerio wild type – WT) do laboratório de peixes do Departamento de Fisiologia e Comportamento (DFS) da Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte (UFRN). Os peixes foram mantidos em tanques de acrílico (20L) e ficaram sob supervisão diária para aferição dos parâmetros da água: nitrito, pH e amônia. Esses parâmetros mantiveram-se dentro da faixa de normalidade durante o período do experimento, garantindo a saudabilidade dos peixes.

Foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas claro-escuro (luz acesa às 7:00h) e alimentados duas vezes ao dia com ração flocada e com náuplios de *Artêmia salina*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Lei nº 11.794 de 08/10/2008 (Lei Arouca) e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Todas as sessões experimentais foram realizadas na fase clara do ciclo (entre 07h e 13h). Ainda, ressaltamos que após o fim dos experimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados pelo uso de óleo de cravo (eugenol) na concentração de 40ml/L. (Figura 1)

Drogas e Tratamentos:

Tansulosina: antagonista seletivo dos adrenoreceptores- α 1A. Ela foi administrada em 3 doses diferentes: 0,001, 0,01, 0,1 mg/L.

Reserpina: alcalóide indólico, transportador vesicular de monoaminas (VMAT), administrado 1 hora antes dos ensaios comportamentais. A dosagem e via de administração é baseada em estudos prévios que avaliaram a ação da imipramina na depressão experimental produzida pela administração de dexametasona (WRÓBEL et al., 2014).

Diazepam: benzodiazepínico padrão-ouro, é um controle positivo para observar redução do comportamento do tipo ansioso em zebrafish. O efeito ansiolítico/sedativo se dá em função da potencialização do efeito do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), promovendo efeito inibitório no Sistema Nervoso Central (SNC). Foi usado em uma dose 5 mg/L, sendo administrada 60 min antes dos ensaios comportamentais.

A tansulosina, a reserpina e o diazepam foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). Todos os fármacos foram administrados em um volume de 10 ml/Kg. Destacamos que o grupo controle recebeu o veículo usado na diluição dos fármacos pela mesma via de administração, recebendo os mesmos volumes e respeitando os mesmos tempos de pré-tratamento.

Testes comportamentais realizados

Avaliação do comportamento tipo depressivo:

Foram testados 2 protocolos para comportamento tipo depressivo: Novel Tank Test (Teste do tanque novo) e escape em hipóxia

1. Novel Tank Test (NTT): esse teste objetiva observar e avaliar a capacidade motora e comportamento do tipo ansioso dos peixes. Os peixes foram individualmente transferidos para um tanque novo (onde nunca estiveram) nas dimensões de 20 cm x 12 cm x 15 cm e foram filmados individualmente por 5 minutos utilizando uma webcam da Logitech (Logitech c920 HD Pro) posicionada frontalmente ao tanque. Após as filmagens, os dados foram avaliados quanto a velocidade média de natação e distância total percorrida (parâmetros locomotores), tempo imóvel (freezing), distância do fundo, tempo nas áreas superior, média e inferior do aquário (parâmetros de ansiedade). Os parâmetros foram analisados no software de rastreamento Anymaze versão 7.1.

2. Escape em hipóxia: No protocolo de escape em hipóxia, propomos observar o número de tentativas de escape (pulos) executados pelo animal quando exposto a situação de hipóxia (fora da água). Este teste se baseia na ideia do teste de natação forçada feito em ratos, cujo resultado é indicador de desamparo (quando o animal desiste de nadar). Nesse teste, os peixes foram colocados fora da água, sobre uma superfície de vidro com círculos concêntricos desenhados abaixo para indicar a distância do ponto central. O teste foi feito individualmente, e cada peixe observado por um minuto. Durante esse período, os peixes foram filmados, e o número de tentativas de escape (pulos), assim como a distância do ponto central da arena foram analisados.

Resultados e Discussões

Resultados parciais do Novel Tank Test (NTT): Os resultados aqui apresentados são resultados parciais desse teste. Em virtude disso, é possível que haja alguns parâmetros que foram elucidados na metodologia que aqui não foram apresentados e também que alguns dados dos parâmetros apresentados ainda não foram mensurados.

1. Tempo no fundo do aquário: trata-se de um dos parâmetros clássicos avaliados no Novel Tank Diving Test. Ao ser introduzido em um ambiente novo, o zebrafish apresenta uma tendência inicial de se manter na porção inferior do aquário, uma resposta inata de defesa associada a estratégias anti-predatórias. Nesse contexto, a administração de fármacos ansiolíticos, como o diazepam, tende a reduzir esse comportamento, favorecendo a exploração progressiva das camadas superiores do aquário após o período inicial de habituação. Em contrapartida, compostos com potencial de induzir fenótipos semelhantes à depressão, como a reserpina e a tansulosina, podem prolongar a permanência na região inferior, refletindo maior imobilidade e manifestações comportamentais compatíveis com anedonia (CUETO-ESCOBEDO et al., 2022).

A análise estatística demonstrou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1). O tratamento com diazepam promoveu um aumento robusto no tempo de permanência no fundo do aquário ($***p < 0,001$), efeito divergente do esperado para um ansiolítico. A reserpina não aumentou o tempo no fundo, apresentando, ao contrário, uma redução significativa em relação ao controle ($***p < 0,001$). Ambas as doses de tansulosina (0,01 e 0,1) também induziram aumentos expressivos no tempo no fundo, com significância extremamente elevada ($****p < 0,0001$).

Os resultados revelam um perfil comportamental paradoxal para o diazepam, que, potencialmente, poderia reduzir os comportamentos do tipo depressivo mas, conforme os dados, aumentou o tempo de permanência no fundo. Esse dado sugere a possibilidade de efeitos contextuais, relacionados à dose ou ao tempo de exposição. A reserpina, por sua vez, não reproduziu o fenótipo depressivo clássico como esperado, já que os dados mostraram menor tempo no fundo do aquário. Esse resultado pode indicar que seu efeito depressogênico se manifesta mais fortemente em outros domínios comportamentais, como diminuição da atividade locomotora global, mas não necessariamente no parâmetro de permanência no fundo. A tansulosina, em ambas as doses, apresentou efeito semelhante ao do diazepam, aumentando significativamente o tempo de permanência no fundo, o que pode sugerir um potencial efeito depressogênico ou ansiogênico, associado ao receptor α_1 -AR (Gráfico 1).

2. Latência para o topo: Esse parâmetro se correlaciona com o parâmetro de tempo no fundo do aquário. A latência para o topo refere-se ao tempo que o peixe demora para subir até a zona superior do aquário após ser introduzido em um novo tanque. É um importante indicador de ansiedade, assim como o tempo de permanência no fundo do tanque após exposição inicial ao novo ambiente, pois permite diferenciar os animais que logo superam o estresse inicial do novo ambiente

daqueles que evitam subir para as outras zonas após um longo período de tempo. Esse comportamento é análogo ao observado em seres humanos quando ansiosos diante de um ambiente desconhecido. Em teoria, fármacos antidepressivos como o diazepam tenderiam a reduzir o tempo de latência para o topo, indicando uma superação mais rápida do medo inicial, enquanto substâncias depressogênicas tenderiam a aumentar a latência, retardando a exploração (SILVA et al., 2022).

A análise de latência para o topo revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais quando comparados ao controle (Tabela 2). O grupo tratado com reserpina apresentou uma redução significativa da latência em relação ao controle ($p = 0,0157$), indicando menor tempo para iniciar a exploração das camadas superiores. Já o diazepam não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,2723$), embora tenha mostrado tendência a aumento da latência. De forma semelhante, as três doses de tansulosina (0,001; 0,01 e 0,1) também não diferiram significativamente do controle ($p = 0,0642$; 0,0799 e 0,1573, respectivamente).

Esse parâmetro também é contrastante ao analisarmos a reserpina e o diazepam, pois ambos apresentaram um perfil de dado contrastante. O grupo tratado com reserpina apresentou redução significativa desse parâmetro em comparação ao controle. Esse resultado diverge do perfil clássico esperado para a reserpina, fármaco conhecido por sua ação depressogênica e ansiogênica via depleção de monoaminas centrais (serotonina, dopamina e noradrenalina). Pode-se levantar a hipótese de que essa discrepância tem relação com o tempo de exposição e a dose, podendo ter um efeito mais característico se observado em uma exposição crônica, contemplando uma maior janela temporal. O diazepam pode ter sofrido com essa mesma discrepância, pois o esperado era que o período de latência até o topo fosse menor, dado seu potencial antidepressivo (Gráfico 2).

3. Distância percorrida no fundo do aquário: Esse parâmetro é interessante pois é oposto ao parâmetro de latência para o topo e também um tanto complementar ao tempo de permanência no fundo. A distância percorrida no fundo nos dá uma ideia de como está a atividade locomotora do peixe e não somente onde ele permanece, como apresentado no parâmetro de tempo no fundo do aquário. É um parâmetro crucial para distinguir a imobilidade depressiva da exploração ansiosa. Em estados de maior hiperatividade e agitação, o animal pode explorar maiores distâncias sem necessariamente sair da zona em que está situado. De modo geral, em quadros de comportamento do tipo depressivo, pensando-se na anedonia, é esperado uma diminuição da exploração ativa do animal (GOLLA; ØSTBY; KERMEN, 2020).

A análise da distância percorrida no fundo do aquário revelou diferenças altamente significativas entre o grupo controle e todos os grupos tratados (Tabela 3). O grupo controle apresentou média de 8,235 cm, enquanto os grupos tratados percorreram distâncias substancialmente maiores: reserpina (30,21 cm), diazepam (32,94 cm), tansulosina 0,001 (32,28 cm) e tansulosina 0,01 (26,39 cm). Todas essas diferenças em relação ao controle foram estatisticamente significativas ($****p < 0,0001$).

Conforme observamos nos dados, os peixes do grupo controle percorreram a menor distância no fundo do aquário em comparação com os outros grupos tratados. Essa era uma resposta esperada, pois o peixe não tratado tenderia a superar com maior facilidade a ansiedade inicial ao ser alocado em um novo espaço. Em contraste, todos os outros grupos tratados percorreram uma maior distância no fundo do

aquário. A reserpina apresentou coerência com esse parâmetro, haja vista poder suscitar no peixe o fenótipo do tipo depressivo. Já o diazepam, novamente apresentou um dado paradoxal, coerentemente com os outros parâmetros já analisados. A tansulosina 0,01 foi a que apresentou menor dado referente à distância percorrida no fundo. Talvez seja uma dose que diminui a exploração ativa do animal e estabeleça algo semelhante a anedonia em humanos. Esse dado corrobora com os dados apresentados no tempo de permanência no fundo do aquário, sendo o grupo que permaneceu mais tempo no fundo. (Gráfico 3)

Resultados parciais do escape em hipóxia:

A análise da resposta comportamental em condição de hipóxia não revelou diferenças significativas para a maioria dos grupos testados quando comparados ao controle (Tabela 4). O grupo tansulosina 0,001 apresentou média de $3,13 \pm 4,55$, sem diferença estatística em relação ao controle ($p = 0,4249$). De forma semelhante, o grupo tansulosina 0,1 exibiu média de $5,20 \pm 5,48$, praticamente idêntica ao controle, sem significância ($p = 0,9985$).

Entretanto, a concentração de Tansulosina 0,01 foi a única que apresentou significância, pois houve redução significativa da quantidade de pulos em todos os 3 blocos temporais durante 1 minuto de avaliação. Isso sugere que essa dose interfere na resposta fisiológica necessária ao afugentamento na condição de hipóxia. Esse dado pode fortalecer essa dose como uma potencializadora do comportamento do tipo depressivo nos peixes, sobretudo por diminuir a perda da resposta adaptativa de enfrentamento. Isso reforça a hipótese de que os receptores alfa-adrenérgicos estão relacionados a comportamentos ligados à resiliência e resposta aos fatores estressantes. O esperado, sobretudo ao se observar o grupo controle, é que os animais sem tratamento pulem mais em direção à superfície na busca por oxigênio. Logo, a redução dessa resposta pode refletir apatia e menor motivação para contornar situações adversas. (Gráfico 4)

Conclusão

A partir do nosso estudo, ainda que com dados parciais, podemos concluir efeitos paradoxais para o diazepam e consistência depressogênica da tansulosina, especialmente na dose 0,01 mg/L, o que aumentou o tempo no fundo do aquário, sugerindo envolvimento dos receptores $\alpha 1A$ na etiologia do TDM. Entretanto, é válido salientar que os dados poderiam ter sido comparados com diferentes doses de reserpina e também de diazepam, com vistas a equiparar as 3 doses estudadas da tansulosina com, pelo menos, 3 doses de cada um desses tratamentos. Esses

efeitos “paradoxais” observados tanto em diazepam, como em tansulosina, evidenciam essa necessidade de adaptação metodológica.

No entanto, faz-se necessário a análises dos outros parâmetros comportamentais analisados nesse experimento para se garantir uma análise estatística segura sobre os comportamentos do tipo depressivo/ansioso, como tempo de imobilidade (freezing), além do tempo percorrido nas diferentes camadas do aquário.

Estudos farmacológicos como esse são imprescindíveis para entendermos a zona segura de ação dos fármacos analisados, promovendo farmacovigilância e nos permitindo avaliar quais são os possíveis efeitos colaterais suscitados a partir de possíveis depressogênicos. Uma das principais barreiras encontradas no diagnóstico clínico da depressão é separar o que é o transtorno depressivo de outros transtornos neurológicos relacionados. Por isso, faz-se cada vez mais importantes abordagens multivariadas e esforços interdisciplinares no sentido de entrar cada vez mais fundo na etiologia dessa doença.

Referências

CHMIELARZ, Piotr; KUŚMIERCZYK, Joanna; RAFA-ZABŁOCKA, Karolina et al. Antidepressants differentially regulate intracellular signaling from α_1 -adrenergic receptor subtypes in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 22, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/ijms22094817.

CHRISTENSEN, Michael Cronquist; WONG, Chiew Meng Johnny; BAUNE, Bernhard T. Symptoms of Major Depressive Disorder and Their Impact on Psychosocial Functioning in the Different Phases of the Disease: Do the Perspectives of Patients and Healthcare Providers Differ? *Frontiers in Psychiatry*, v. 11, p. 280, 24 abr. 2020. DOI: 10.3389/fpsy.2020.00280.

CUETO-ESCOBEDO, J.; MENDOZA-FERNÁNDEZ, V.; ÁLVAREZ-CRESPO, M.; FARFÁN-LABRADOR, J. L. Zebrafish as a Useful Tool in the Research of Natural Products with Anxiolytic Properties. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 15, p. 795285, 2022. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.795285.

CUI, L.; LI, S.; WANG, S. et al. Major depressive disorder: hypothesis, mechanism, prevention and treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, [s. l.], v. 9, p. 30, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01738-y>.

GOLLA, A.; ØSTBY, H.; KERMEN, F. Chronic unpredictable stress induces anxiety-like behaviors in young zebrafish. *Scientific Reports*, v. 10, n. 10339, p. 1-12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67182-4>.

GOMES, Joyce de Pontes; GASPAR, Danielle Macêdo. A origem da depressão: Teorias sobre o desconhecido. In: IV Simpósio de Pesquisa em Ciências Médicas, 2018, Fortaleza. A origem da depressão: Teorias sobre o desconhecido. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 6, nov. 2018.

HOLANDA, V. A. D. et al. Tamsulosin facilitates depressive-like behaviors in mice: Involvement of endogenous glucocorticoids. *Brain research bulletin*, v. 178, p. 29–36, 1 jan. 2022.

MARTINS, Jackeline Ribeiro. A depressão nas mulheres negras brasileiras: um estudo acerca do racismo estrutural e seu impacto psíquico. *Atas de Ciências da Saúde (ACiS)*, São Paulo, v. 11, n. 1, 2023. Publicado em 27 de março de 2023. Seção: Artigo Teórico. DOI: não disponível. Disponível em: <https://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ACiS/article/view/2735>. Acesso em: 16 ago. 2025.

MRINALINI, R.; TAMILANBAN, T.; NAVEEN KUMAR, V.; MANASA, K. Zebrafish – The Neurobehavioural Model in Trend. *Neuroscience*, v. 520, p. 95–118, 1 jun. 2023. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2022.12.016 onlinelibrary.wiley.com+10pubmed.ncbi.nlm.nih.gov+10researchgate.net+10.

STONE, Eric A.; LIN, Yan; ROSENGARTEN, Helen; KRAMER, H. K.; QUARTERMAIN, David. Emerging evidence for a central epinephrine-innervated α 1-adrenergic system that regulates behavioral activation and is impaired in depression. *Neuropsychopharmacology*, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1387–1399, ago. 2003. DOI: 10.1038/sj.npp.1300222. pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Depression and Other Common Mental Disorders*. Geneva: WHO, 2019. Disponível em: WHO.

Anexos

Figura 1- Delineamento Experimental

Gráfico 1

Tabela 1

Tabela 2

Gráfico 2

Tabela 3

Gráfico 3

Tabela 4

Gráfico 4

CÓDIGO: SB1464

AUTOR: VIVIANE COSTA MONTEIRO DA SILVA

COAUTOR: HELOYSA FARIAS DA SILVA

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: DIVERSIDADE DE HIFOMICETOS AQUÁTICOS EM ÁREA DA AMAZÔNIA MERIDIONAL, BRASIL

Resumo

Os Hifomicetos aquáticos são fungos que habitam ambientes aquáticos e são considerados os principais decompositores da matéria orgânica, participando da ciclagem de nutrientes, além de apresentarem importância ecológica como bioindicadores da qualidade ambiental. O objetivo deste estudo foi realizar um inventário de hifomicetos aquáticos do PEX (Parque Estadual do Xingu - Mato Grosso). Para isso, foram realizadas duas expedições de coletas no período de agosto de 2024 e julho de 2025. Durante cada expedição foram coletadas 10 folhas e 10 galhos ao longo do corpo d'água, contabilizando 100 substratos por coleta. Os substratos foram devidamente armazenados em sacos plásticos e encaminhadas para o Laboratório de Biologia de Micorrizas (LBM) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), para serem submetidos ao processo de câmara úmida. No total, foram encontrados 25 táxons de hifomicetos, distribuídos em 18 gêneros e três classes, com um novo registro para a Amazônia. Este estudo demonstra a diversidade e riqueza de táxons presentes na região e a necessidade de novos estudos sobre hifomicetos aquáticos no bioma amazônico.

Palavras-chave: fungos aquáticos, Ascomycota, assexuais, riqueza.

TITLE: AQUATIC HYPHOMYCETES: DIVERSITY AND NEW OCCURRENCES IN THE SOUTHERN AMAZON, BRAZIL

Abstract

Aquatic Hyphomycetes are fungi that inhabit aquatic environments and considered the main decomposers of organic matter. They participate in nutrient cycling and hold ecological importance as bioindicators of environmental quality. The objective of this study was to conduct an inventory of aquatic Hyphomycetes in the PEX (Parque Estadual do Xingu - Mato Grosso). Two collection expeditions were carried out between August 2024 and July 2025. During each expedition, 10 leaves and 10 branches were collected along the water body, totaling 100 substrates per collection. The substrates were properly stored in plastic bags and sent to the Mycorrhiza Biology Laboratory (LBM) at the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) to be subjected to the moist chamber method. A total of 25 Hyphomycetes taxa were found, distributed among 18 genera and three classes, including one new record for

the Amazon. This study demonstrates the diversity and richness of taxa present in the region and highlights the need for further research on hyphomycetes in the Amazon biome.

Keywords: Aquatic fungi, Ascomycota, asexual, richness.

Introdução

O bioma Amazônico é conhecido como o maior e mais complexo bioma tropical, e contém cerca de 20% da água doce líquida do mundo (WWF, 2025). Possui extensa dimensão, abrangendo mais de nove países, e no Brasil, ocupa uma área superior a 4 milhões de quilômetros quadrados, com aproximadamente 60% de sua área total concentrada na região Norte do país (Brasil, 2025). Além da sua grande diversidade, este bioma participa ativamente do sistema climático, principalmente na América do Sul, regulando os níveis de umidade devido a precipitação das suas grandes bacias hidrográficas (Lovejoy e Nobre, 2019).

Apesar da importância global e da variedade de ecossistemas, o bioma sofre com ameaças à sua diversidade, com altas taxas de desmatamento historicamente e numericamente observadas (INPE, 2024), além da destruição da cobertura vegetal para a agropecuária, causando a perda de ecossistemas e a degradação florestal deste bioma (Solar et al., 2016). Os ecossistemas aquáticos amazônicos também sofrem com o descarte incorreto de produtos químicos e a poluição pelo mercúrio utilizado pela extração de ouro, comprometendo a biodiversidade presente nestes locais (Fiocruz 2016; Vega et al., 2018).

Os fungos aquáticos possuem a maior parte de seus representantes posicionados no filo Ascomycota, sobrevivem em ambientes aquáticos, principalmente em sistemas lóticos (Shearer et al. 2007), e são considerados os principais decompositores da matéria orgânica alóctone (Pascoal et al., 2004; Franco-duarte et al., 2022). Também possuem papéis na ciclagem de nutrientes, facilitando o consumo de matéria orgânica pelos organismos invertebrados decompositores (Gulis & Barlocher, 2017; Tennakoon et al., 2021). Além disso, a sensibilidade desses fungos a fatores como temperatura, pH, concentração de oxigênio e nutrientes dissolvidos acrescentam um valor ecológico como bioindicadores da qualidade ambiental (Rajashekhar & Kaveriappa, 2000; Solé et al., 2007; Medeiros et al., 2009; Kominosk et al., 2015; Fiuza et al., 2019; Barreto et al., 2023).

Em 2011, o Ministério do Meio Ambiente reconheceu o mosaico da Amazônia Meridional, que abrange unidades de conservação dos Estados de Rondônia, Mato Grosso e Amazonas, de modo a otimizar a conservação dos ecossistemas e da biodiversidade presente nestes locais (WWF Brasil, 2011). Nos ecossistemas aquáticos, estudos realizados na Amazônia brasileira, apesar de escassos, relatam a presença e a alta diversidade de hifomicetos aquáticos nesses ambientes (Monteiro 2014; Fiuza et al., 2017; Krause et al., 2021; Fiuza et al., 2022). Diante disso, o presente estudo buscou realizar um inventário de hifomicetos aquáticos do PEX (Parque Estadual do Xingu - Mato Grosso) de modo a registrar a ocorrência de espécies deste grupo nesta região, e auxiliar o desenvolvimento de estratégias de preservação frente às mudanças climáticas e ambientais que esses ambientes têm enfrentado.

Metodologia

ÁREA DE ESTUDO:

O estudo foi realizado em um riacho localizado no Parque Estadual Xingu, município de Santa Cruz do Xingu - Mato Grosso (MT). O Parque compõe o conjunto de unidades de conservação do Mosaico da Terra do Meio, criado em 2001 (Unidades de Conservação do Mato Grosso 2002), fazendo parte do bioma amazônico, dentro da porção Legal, e apresentando 95.024 hectares (Córdova et al., 2021). As formações vegetais encontradas no parque são divididas em: Floresta Ombrófila Aberta/Submontana, Floresta Ombrófila Densa Aluvial, Campinarana, Savana e Cerrado, afloramentos areníticos e rochosos, Várzea arbustiva e lagoas, e Planície de inundação (Córdova et al., 2021). Apresenta clima tropical com inverno seco, e temperatura anual variando entre 24°C e 26°C (Alvares et al., 2013).

EXPEDIÇÕES DE COLETAS:

Foram realizadas duas expedições de coletas no período de agosto de 2024 e julho de 2025. No riacho foram delimitados cinco pontos, equidistantes a 200 metros de distância, nos quais foram coletadas 10 folhas e 10 galhos ao longo do corpo d'água, contabilizando 20 substratos por ponto e 100 por coleta. Os substratos foram devidamente armazenados em sacos plásticos, e em seguida, as amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microscopia do Acervo Biológico da Amazônia Meridional da Universidade Federal de Mato Grosso (ABAM-UFMT Sinop) para triagem inicial e preparo para o envio ao Laboratório de Biologia de Micorrizas (LBM) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

ESTUDO TAXONÔMICO:

Conforme a metodologia de Castañeda-Ruiz et al., (2016), os substratos foram submetidos à técnica de lavagem em água corrente por 30 minutos. Após a lavagem, as amostras foram armazenadas em câmara-úmida, e observadas após 72h. Com o uso de estereomicroscópios, foi realizada a confecção de lâminas permanentes dos espécimes coletados, utilizando a resina PVL (álcool polivinílico + ácido láctico + fenol). As amostras foram observadas em uma média de 30 dias. Posteriormente, as lâminas foram identificadas, com o uso de microscópio Olympus BX 43, a nível específico, utilizando bibliografia especializada (Matsushima 1975, 1993; Seifert & Gams, 2011; Fiuza et al., 2017).

Resultados e Discussões

Foram identificados 25 táxons de hifomicetos distribuídos em 18 gêneros e três classes (tabela 1). A maior quantidade de táxons pertencem à classe Sordariomycetes (15), seguida por Dothideomycetes (3), e Leotiomycetes (2) (figura 2). A quantidade obtida está proporcionalmente de acordo com os estudos já realizados, que trazem as classes Sordariomycetes e Dothideomycetes como as mais abundantes (Monteiro, 2014; Krause, 2021).

Dentre os táxons identificados, foi encontrado um novo gênero e espécie de hifomiceto aquático que será submetido para publicação, ea espécie *Atrosetaphiale flagelliformis* Matsushfoi considerada como um novo registro para a Amazônia. Com relação ao tipo de substrato, foram encontrados 17 táxons presentes somente em folhas, 13 táxons somente em galhos, e seis táxons em ambos os substratos estudados (figura 3). Este resultado diverge de alguns estudos anteriores (Goh & Hyde, 1996; Barbosa, 2021), no qual a abundância de

táxons encontrados foi maior em galhos. Esta diferença pode ser explicada por dois fatores: maior área de superfície de colonização das folhas e a menor concentração de compostos como lignina, sendo maior em galhos, o que dificulta a colonização e a decomposição destes substratos (Suberkropp, 2001).

Conclusão

Em ambientes aquáticos, a Amazônia abriga um reservatório importante de hifomicetos aquáticos, com uma vasta diversidade de espécies contribuindo para o inventário fúngico. Nesse ecossistema, as folhas submersas representam um substrato particularmente mais atrativo para a colonização destes fungos. Novas ocorrências de espécies evidenciam a região como um ecossistema rico, porém subexplorado. Além disso, os achados revelam a urgência na conservação da Funga e dos biomas amazônicos, sendo necessária a realização de novos estudos para melhor compreensão da diversidade e a composição das comunidades de hifomicetos aquáticos nesta região.

Referências

- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, p. 711–728, 2013.
- BARBOSA, F. R.; FIUZA, P. O.; MONTEIRO, J. S.; SILVA, A. P.; GUSMÃO, L. F. P.; CASTAÑEDA RUÍZ, R. F. *Parathozetella microsperma* gen. & sp. nov. from the Brazilian Amazon. *Mycotaxon*, v. 136, n. 2, p. 351-357, 2021.
- BARRETO, G. G.; HEPP, L. U.; REZENDE, R. S.; JUNIOR, J. F. G.; MORETTI, M. S.; MORETTO, Y.; LOUREIRO, R. C.; RESTELLO, R. M.; MEDEIROS, A. O. The cooler the better: Increased aquatic hyphomycete diversity in subtropical streams along a neotropical latitudinal gradient. *Fungal Ecology*, v. 62, p. 101–223, 2023.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. Amazônia. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-biomas/biomas-e-ecossistemas/biomas/amazonia>.
- CASTAÑEDA-RUIZ, R. F.; HEREDIA, G.; GUSMÃO, L. F. P.; LI, D. W. Fungal diversity of Central and South America. In: LI, D.-W. (ed.). *Biology of Microfungi*. Springer International Publishing, 2016. p. 197–218.
- CÓRDOVA, M. O.; GIACOPPINI, M.; PEREIRA, D. D.; SOUZA, A. C. A vegetação do PEX. In: PIRES, E. M. (ed.). *Vegetação e Plantas do Parque Estadual do Xingu*. Cuiabá: Unisselva, 2021. p. 21-67.
- FIOCRUZ. Avaliação da exposição ambiental ao mercúrio proveniente da atividade garimpeira de ouro na terra indígena Yanomami, Roraima, Amazônia, Brasil. 2016. Disponível em: https://illegalmining.amazoniasocioambiental.org/diagnostico_contaminacao_mercurio_terra_indigena_yanomami%20397ee76eae486029d21567ba8d543bd0.pdf?lang=en/.

FIUZA, P. O.; BARBOSA, F. R.; MEDEIROS, A. O.; GUSMÃO, L. F. P. Ingoldian fungal assemblages from Brazilian rainforests, shrubland and savanna. *New Zealand Journal of Botany*, v. 60, p. 297–313, 2022.

FIUZA, P. O.; CANTILLO-PÉREZ, T.; GULIS, V.; GUSMÃO, L. F. P. Ingoldian fungi of Brazil: some new records and a review including a checklist and a key. *Phytotaxa*, v. 306, n. 3, p. 171–200, 2017.

FIUZA, P. O.; COSTA, L. A.; MEDEIROS, A. O.; GULIS, V.; GUSMÃO, L. F. P. Diversity of freshwater hyphomycetes associated with leaf litter of *Calophyllum brasiliense* in streams of the semiarid region of Brazil. *Mycological Progress*, v. 18, n. 7, p. 907–92, 2019.

FRANCO-DUARTE, R.; FERNANDES, I.; GULIS, V.; CÁSSIO, F.; PASCOAL, C. ITS rDNA barcodes clarify molecular diversity of aquatic hyphomycetes. *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1569, 2022.

GOH, T. K.; HYDE, K. D. Biodiversity of freshwater fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 17, n. 5-6, p. 328-345, 1996.

GULIS, V.; BÄRLOCHER, F. Fungi: biomass, production, and community structure. In: *Methods in Stream Ecology, Volume 1*. Academic Press, 2017. p. 177-192.

INPE. Centro de Sensoriamento Remoto. Prodes. São José dos Campos, SP, 2025. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/OBT/assuntos/programas/amazonia/prodes>.

KOMINOSKI, J. S.; ROSEMOND, A. D.; BENSTEAD, J. P.; GULIS, V.; MAERZ, J. C.; MANNING, D. W. P. Low-to-moderate nitrogen and phosphorus concentrations accelerate microbially driven litter breakdown rates. *Ecological Applications*, v. 25, n. 3, p. 856-865, 2015.

KRAUSE, L. M. Hifomicetos associados a substratos vegetais submersos no sul da Amazônia, Mato Grosso, Brasil. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, 2021.

LOVEJOY, T. E.; NOBRE, C. Winds of will: Tipping change in the Amazon. *Science Advances*, v. 5, p. eaba2949, 2019.

MATO GROSSO. Governo do Estado. Unidades de Conservação do Mato Grosso. Parque Estadual do Xingu. Mato Grosso: FEMA/MT, 2002. Disponível em: <https://uc.socioambiental.org/arp/3458>.

MATSUSHIMA, T. *Icones Microfungorum a Matsushima lectorum*. Kobe (JP): Publ. by the author, 1975.

MATSUSHIMA, T. *Matsushima Mycological Memoirs*. Kobe: Publ. by the author, 1993.

MEDEIROS, A. O.; PASCOAL, C.; GRAÇA, M. A. S. Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. *Freshwater Biology*, v. 54, n. 1, p. 142-149, 2009.

MONTEIRO, J. S. *Fungos Conidiais Associados a Substratos Vegetais Submersos em Fragmentos Florestais do Bioma Amazônia*. 2014. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2014.

PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Contribution of fungi and bacteria to leaf litter decomposition in a polluted river. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 9, p. 5266-5273, 2004.

RAJASHEKHAR, M.; KAVERIAPPA, K. M. Effects of temperature and light on growth and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Hydrobiologia*, v. 441, p. 149-153, 2000.

SEIFERT, K. A.; GAMS, W. The genera of Hyphomycetes—2011 update. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 27, n. 1, p. 119-129, 2011.

SHEARER, Carol A.; DESCALS, Enric; KOHLMAYER, Brigitte; KOHLMAYER, Jan; MARVANOVÁ, Ludmila; PADGETT, Donald; PORTER, David; RAJA, Huzefa A.; SCHMIT, Joseph P.; THORTON, Heather A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.

SOLAR, Ricardo Ribeiro de Castro et al. Consequências da mudança no uso da terra e da perturbação florestal na Amazônia para a biodiversidade: uma avaliação multi escala usando comunidades de formigas. *Biological Conservation*, v. 197, p. 98-107, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.005>.

SOLÉ, M.; RIQUELME, C. G.; GUASCH, H.; ROMANÍ, A. M. Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for assessing anthropogenic stress. *Science of The Total Environment*, v. 389, n. 2-3, p. 557–565, 2008.

SUBERKROPP, K. The role of fungi in the processing of leaf litter in freshwater ecosystems. *Biological Reviews*, v. 76, n. 3, p. 359-382, 2001.

TENNAKOON, Danushka Sandaruwan; GENTEKAKI, Evangelia; JEEWON, Ruvishika; KUO, Chun Hung; PROMPUTTHA, Itthipon; HYDE, Kevin D. Life in leaf litter: fungal community succession during decomposition. *Mycosphere*, v. 12, n. 1, p. 406–429, 2021.

VEGA, Carolina Marcelain; FÉLIX, Daniel; ZANANDREA, Ítalo; PEREIRA, Daniel José Silva; AZEVEDO, Lúcia; CASTRO, Hugo Roberto da Rocha e; CASTRO, Marcos Felipe da Rocha e; MOREIRA, João C.; BASTOS, Wanderley Rodrigues; FACHIN-ESPINOZA, Luis. Human Mercury Exposure in Yanomami Indigenous Villages from the Brazilian Amazon. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 1051, p. 1–13, 2018.

WORLD WILDLIFE FUND. Amazon, 2025. Disponível em: <https://www.worldwildlife.org/places/amazon>.

WWF BRASIL. Mosaico da Amazônia Meridional facilitará a gestão de áreas protegidas. 5 set. 2011. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/?29689/Mosaico-da-Amazonia-Meridional-facilitara-gestao-de-areas-protegidas>.

Anexos

Tabela 1- Táxons encontrados nas coletas, por substrato: folha (F) e galho (G).

Tabela 1- Táxons encontrados nas coletas, por substrato: folha (F) e galho (G).

Figura 1. Mapa de localização da área de coleta, com destaque para os pontos no riacho amostrado. (Fonte: André Monte, 2024).

Figura 2. Gráfico demonstrando a distribuição de táxons por classes. (Fonte: Autor, 2025).

Figura 3- Diagrama de Venn demonstrando o número de táxons por substrato. (Fonte: Autor, 2025).

CÓDIGO: SB1469

AUTOR: JOAO VITTOR PERES DA SILVA

COAUTOR: HILDA RAIANNE SILVA DE MELO

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Padrões reprodutivos do sebinho-olho-de-ouro (*Hemitriccus margaritaceiventer*, Aves, Rhynchocyclidae) na Caatinga potiguar

Resumo

Este estudo documenta os padrões reprodutivos da espécie *Hemitriccus margaritaceiventer*, conhecida como sebinho-olho-de-ouro, na Floresta Nacional de Assú (FLONA de Assú), localizada na Caatinga potiguar do Rio Grande do Norte, Brasil. A pesquisa foi realizada entre dezembro de 2024 e julho de 2025, com a metodologia de busca de ninhos e monitoramento contínuo de ninhos com o auxílio de câmeras trap. Foram encontrados cinco ninhos da espécie entre janeiro e abril de 2025. Os ninhos observados eram estruturas em forma de bolsa alongada, feitos com grama e fibras vegetais, suspensas em plantas herbáceas, como a *Urtica dioica*. As dimensões dos ninhos estavam dentro da faixa esperada para a espécie, com médias de altura da entrada de $2,63 \pm 0,47$ cm, largura da entrada de $3,0 \pm 0,5$ cm, diâmetro de $5,3 \pm 0,43$ cm e comprimento de $24,75 \pm 7,45$ cm. Os ovos eram ovóides, brancos e sem marcas, com comprimento médio de $17,28 \pm 0,38$ mm, altura média de $12,35 \pm 0,17$ mm e peso médio de $1,27 \pm 0,17$ g, tamanhos semelhantes aos de outras espécies do gênero *Hemitriccus*. O tamanho da ninhada registrado variou entre um e dois ovos ($n = 3$). Foi registrado sucesso reprodutivo apenas para um dos ninhos acompanhados. Este estudo preenche lacunas significativas na biologia reprodutiva da espécie, incluindo fenologia, período reprodutivo local, capacidade da ninhada e características detalhadas dos ninhos, contribuindo para estratégias de conservação e futuros trabalhos de monitoramento na Caatinga.

Palavras-chave: Reprodução. Sebinho-olho-de-ouro. Caatinga. Ninhos. Conservação.

TITLE: Reproductive patterns of the Pearly-vented Tody-Tyrant (*Hemitriccus margaritaceiventer*, Aves, Rhynchocyclidae) in the Potiguar Caatinga.

Abstract

This study documents the reproductive patterns of the Pearly-vented Tody-Tyrant (*Hemitriccus margaritaceiventer*), in the Assú National Forest (FLONA de Assú), located in the Potiguar Caatinga of Rio Grande do Norte, Brazil. The research took place from December 2024 to July 2025, using a methodology of nest searching and continuous monitoring of active nests with the aid of camera traps. Five nests of the species were found between January and April 2025. The observed nests were elongated, pouch-shaped structures made of grass and plant fibers, suspended in herbaceous plants such as *Urtica*

dioica. The nest dimensions were within the expected range for the species, with average entrance height of 2.63 ± 0.47 cm, entrance width of 3.0 ± 0.5 cm, diameter of 5.3 ± 0.43 cm, and length of 24.75 ± 7.45 cm. The eggs were ovoid, white, and unmarked, with an average length of 17.28 ± 0.38 mm, average height of 12.35 ± 0.17 mm, and average weight of 1.27 ± 0.17 g, sizes similar to those of other species in the genus *Hemitriccus*. The recorded clutch size ranged from one to two eggs ($n = 3$). Reproductive success was recorded for only one of the monitored nests. This study fills significant gaps in the reproductive biology of the species, including phenology, local reproductive period, clutch size, and detailed nest characteristics, contributing to conservation strategies and future monitoring efforts in the Caatinga.

Keywords: Reproduction. Pearly-vented Tody-Tyrant. Caatinga. Nest. Conservation

Introdução

A biologia reprodutiva é um campo de estudo crucial para a compreensão e conservação das aves (Marini et al., 2009), fornecendo informações essenciais para a formulação de estratégias eficazes. A escassez de dados sobre a biologia reprodutiva das aves representa um fator limitante significativo para a compreensão das espécies, especialmente nas regiões tropicais e neotropicais (Lima et al., 2022). Globalmente, apenas cerca de 30% das espécies de aves possuem sua biologia reprodutiva bem documentada, com uma deficiência de informações para as espécies de florestas tropicais (Xiao et al., 2017). No Brasil e na região neotropical, o conhecimento é ainda muito limitado, com muitas aves sem descrições básicas de ovos ou ninhos (Marini et al., 2009). A ausência dessas informações fundamentais sobre parâmetros reprodutivos, incluindo tamanho da ninhada, fenologia e sobrevivência dos ninhos, prejudica severamente a compreensão da distribuição populacional e da viabilidade de espécies ameaçadas (Lima et al., 2010). Portanto, o investimento em pesquisas que detalham a biologia reprodutiva é crucial para a conservação da biodiversidade (Cruz, 2024). A reprodução impõe diversos custos e desafios às espécies. A construção dos ninhos, que varia amplamente em técnicas e materiais utilizados (Goodfellow, 2011), exige grande esforço e é decisiva para o sucesso reprodutivo (Sick, 1997), pois deve garantir a segurança dos pais e dos filhotes (Collias & Collias, 1984), proteção contra predadores (Quinn & Kokorev, 2002) e que a estrutura mantenha sua integridade e fixação durante o período de incubação e a criação dos filhotes (Sick, 1997). Atividades relacionadas ao cuidado parental são outros fatores importantes na biologia das aves relacionados com o cuidado parental que incluem a construção do ninho, a termorregulação e o fornecimento de alimento (Clutton-Brock, 1991). Para quantificar o esforço de cada adulto nessas ações, são necessárias observações detalhadas de todo o evento reprodutivo (Manica, 2010). Um dos maiores desafios e custos na reprodução é o risco de predação (Silva, 2002). O objetivo principal deste trabalho é documentar os padrões reprodutivos da espécie *Hemitriccus margaritaceiventer* (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837), conhecida popularmente como sebinho-olho-de-ouro. Esta ave passeriforme, pertencente à família *Rhynchocyclidae* e possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil. É comumente encontrada em ambientes que apresentam sazonalidade de chuvas marcantes, como a Caatinga, o Cerrado e o Pantanal (Sick, 1997). Sua dieta é predominantemente insetívora, com espécies do gênero *Hemitriccus* sendo especializadas em predar artrópodes. As espécies de *Hemitriccus* são geralmente territorialistas, monogâmicas e não migratórias, com capacidade de dispersão restrita (Cohn-Haft, 2000). Os ninhos do sebinho-olho-de-ouro são tipicamente estruturas em forma de bolsa

alongada, construídas com grama e fibras vegetais, e são suspensos em galhos ou plantas herbáceas a uma altura de 0,5 a 3 metros do solo (Clock, 2020). A espécie não apresenta dimorfismo sexual, e a incubação dos ovos é realizada exclusivamente pelas fêmeas (Sick, 1997). Apesar de os aspectos básicos da biologia reprodutiva da espécie serem parcialmente conhecidos, até o momento não possui dados de sua reprodução em ambientes de floresta tropical sazonalmente seca. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo apresentar os aspectos básicos da biologia reprodutiva na Caatinga potiguar.

Metodologia

Área de estudo

A Floresta Nacional de Assú (FLONA de Assú), localizada no município de Assú, na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, é caracterizada por um clima semiárido, com o período chuvoso ocorrendo entre março e abril (IDEMA, 2008). É situada entre as coordenadas 5,583°S e 36,945°W. A área possui um tamanho total de 225,02 hectares, e é caracterizada por um relevo suave e ondulado e por uma formação vegetal predominante de Caatinga, apresentando um aspecto fisionômico arbóreo-arbustivo denso (Nogueira et al., 2024).

A Flona de Assú representa uma área preservada com alto índice de cobertura vegetal no município e é considerada de extrema importância por seu papel na conservação da biodiversidade da Caatinga, no combate à desertificação, no incentivo à educação ambiental e no desenvolvimento da pesquisa científica (Nogueira et al., 2024). Pesquisas realizadas na Flona de Assú demonstram condições climáticas mais favoráveis, como temperaturas mais baixas ($\pm 34,9$ °C), maior umidade relativa do ar (41,4%) e menor concentração de CO₂ (448 ppm), em comparação com áreas urbanas e rurais degradadas na mesma localidade, evidenciando a influência direta da cobertura vegetal na regulação ambiental, evitando impactos ambientais e climáticos, como a desertificação e a erosão do solo, promovendo a infiltração da água da chuva e a recarga dos aquíferos locais. (Nogueira et al., 2024)

Coleta de dados

As buscas dos ninhos foram realizadas no período de dezembro de 2024 a julho de 2025, em 19 buffers com raio de 80m², cada buffer foi espaçado por no mínimo 500 metros. Para a localização dos ninhos dentro dos buffers, foi utilizada a metodologia de Martin e Geupel (1993) onde toda vegetação foi vasculhada, além disso o comportamento das aves adultas também foi observado, especialmente o transporte de material para construção de ninhos ou alimentação dos ninhegos (Marini et al., 2010).

Após a localização, cada ninho foi imediatamente inspecionado para determinar seu status (vazio, contendo ovo e/ou ninhego), sendo então classificado como ativo ou inativo. Todos os ninhos encontrados foram georreferenciados utilizando um GPS Garmin Oregon 650 e numerados sequencialmente. Durante o período em que os ninhos estavam ativos, foi realizado o monitoramento contínuo dos parâmetros reprodutivos. Estes parâmetros incluem o período reprodutivo, o tamanho da ninhada, o tempo de incubação e o sucesso reprodutivo. O monitoramento dos ninhos ativos foi realizado "sempre que possível". Nos ninhos ativos foram utilizadas câmeras trap posicionadas horizontalmente entre 1 e 3 metros de cada ninho,

de acordo com a disponibilidade de galhos adequados. As câmeras foram programadas para captar vídeos de 30 segundos. Independentemente das gravações dos equipamentos, a predação foi considerada quando os ovos ou os filhotes desapareceram do ninho. Apresentamos as medidas como média $\pm$ desvio padrão.

Arabic	Hebrew	Polish
Bulgarian	Hindi	Portuguese
Catalan	Hmong Daw	Romanian
Chinese Simplified	Hungarian	Russian
Chinese Traditional	Indonesian	Slovak
Czech	Italian	Slovenian
Danish	Japanese	Spanish
Dutch	Klingon	Swedish
English	Korean	Thai
Estonian	Latvian	Turkish
Finnish	Lithuanian	Ukrainian
French	Malay	Urdu
German	Maltese	Vietnamese
Greek	Norwegian	Welsh
Haitian Creole	Persian	

Resultados e Discussões

Foram encontrados cinco ninhos de *H. margaritaceiventer*, os ninhos foram localizados entre 28 de janeiro e 5 de abril de 2025 (janeiro n = 1, fevereiro n = 2, março n = 1 e abril n = 1).

Os ninhos do sebinho-de-olho-de-ouro possuíam forma de bolsa alongada, construída a partir de grama e fibras vegetais (Fig. 1). Essas estruturas foram encontradas suspensas utilizando

plantas herbáceas. Foi observado um padrão de construção em plantas da espécie *Urtica dioica* (conhecida popularmente como urtiga).

Os resultados encontrados para as medidas variáveis para o local escolhido para a construção dos ninhos apresentaram pouca diferença em relação aos dados apresentados em bibliografias existentes (Oliveira-Silva, 2024).

No que diz respeito às características e medidas dos ninhos encontrados, foi possível observar que a altura da entrada dos ninhos teve uma média de $2,63 \pm 0,47$ cm e a largura da entrada, $3,0 \pm 0,5$ cm. O diâmetro do ninho apresentou uma média de $5,3 \pm 0,43$ cm. O comprimento dos ninhos medidos teve uma média de $24,75 \pm 7,45$ cm.

Comparando com outras espécies do gênero *Hemitriccus*, os ninhos geralmente seguem um padrão. A maioria dos membros do gênero constrói ninhos pendentes em forma de bolsa (Fitzpatrick, 2004). São comumente descritos como bolsas fechadas, ovóides/globulares, com entrada lateral (Barnett et al., 2000). Essa arquitetura é comum se comparada com a observada para a espécie.

Em relação à arquitetura e aos materiais dos ninhos, em contraste, na província de Santiago del Estero, Argentina, os ninhos são caracterizados como uma bolsa globular muito elaborada e compacta, com entrada lateral e beiral. São construídos com fibras vegetais, folhas e cascas, ligadas por teias de aranha, e forrados internamente com penas e agrupamentos de flores (Quiroga & Cejas, 2023). Quanto à altura dos ninhos em relação ao solo, na Argentina, os ninhos são tipicamente localizados a baixas e médias alturas, entre 50 cm e 280 cm (Quiroga & Cejas, 2023). A observação de um ninho a 3 metros no estudo da Caatinga estende o limite superior da faixa comum na Argentina, mas ainda é consistente com a adaptabilidade da espécie.

Quanto às dimensões dos ninhos quando comparadas com as medidas obtidas em outros estudos também são equiparáveis, o diâmetro da entrada e a largura geral são comparáveis. Durante um estudo realizado na Argentina um ninho mediu 15 cm de altura, 3,4 cm de profundidade, diâmetro de entrada de 2,9 x 3,1 cm e largura de 5,8 cm (Quiroga & Cejas, 2023).

Em relação aos ovos, são ovóides, brancos e com pequenas marcas, apresentam o comprimento médio de $17,28 \pm 0,38$ mm, a altura média de $12,35 \pm 0,17$ mm e o peso médio de $1,27 \pm 0,17$ g. Os dados encontrados no presente estudo são semelhantes aos reportados para *H.granadensis* (18,13 x 12,9 mm, 1,55 g) (McCullough e Londoño, 2017) e *H.kaempferi* (18,69 x 13,97 mm, 2,0 g) (McCullough e Londoño, 2017). Em contraste, os estudos de nidificação na Argentina descrevem os ovos como de cor creme ou esbranquiçada, com pintas castanhas mais concentradas no pólo maior (Quiroga & Cejas, 2023).

Com relação à coloração dos ovos, para a espécie de *H. granadensis* foi observada uma variabilidade. Um ovo na Colômbia era castanho-amarelado e sem marcas, enquanto um no Peru era branco-brilhante com algumas manchas vermelhas dispersas (McCullough & Londoño, 2017). Para *H. kaempferi*, os ovos são descritos como de coloração creme com manchas castanhas bem distribuídas (Willrich, 2019). Essa descrição de coloração e pequenas manchas é um padrão que parece ser seguido no gênero, incluindo *H. nidipendulus* (de la Peña 2013, McCullough & Lodoño 2017).

Em relação ao tamanho da ninhada para os ninhos de *H. margaritaceiventer* encontrados neste estudo, foram observados registros de ninhadas contendo um ou dois ovos. Segundo Clock (2020) o tamanho da ninhada de *H. margaritaceiventer* é tipicamente de 2 a 3 ovos. Em geral, o tamanho da ninhada no gênero *Hemitriccus* pode variar de 1 a 2 ovos (Willrich, 2019). Para *H. granadensis*, foram encontrados ninhos com apenas um único ovo (McCullough & Londoño, 2017). Já para *H. kaempferi*, foram registradas ninhadas de um e dois ovos/filhotes.

O estudo registrou sucesso reprodutivo apenas para um ninho. A ausência de sucesso reprodutivo observada está presente em um padrão preocupante notado para o gênero *Hemitriccus* e, de forma mais ampla, para aves neotropicais (Skutch, 1985). A escassez de dados sobre os períodos de incubação e permanência de filhotes no ninho para o gênero *Hemitriccus* é atribuída à dificuldade em encontrar e monitorar os ninhos e às altas taxas de predação e mortalidade de filhotes, que parecem afetar as espécies deste gênero (Willrich, 2019).

Arabic	Hebrew	Polish
Bulgarian	Hindi	Portuguese
Catalan	Hmong Daw	Romanian
Chinese Simplified	Hungarian	Russian
Chinese Traditional	Indonesian	Slovak
Czech	Italian	Slovenian
Danish	Japanese	Spanish
Dutch	Klingon	Swedish
English	Korean	Thai
Estonian	Latvian	Turkish
Finnish	Lithuanian	Ukrainian
French	Malay	Urdu
German	Maltese	Vietnamese
Greek	Norwegian	Welsh
Haitian Creole	Persian	

Conclusão

Diante do que foi apresentado, este estudo sobre os padrões reprodutivos de *Hemitriccus margaritaceiventer* na Caatinga potiguar permitiu documentar aspectos importantes relacionados à construção dos ninhos e características dos ovos. Apesar do sucesso reprodutivo registrado para apenas um ninho, os dados obtidos fornecem informações novas para a região e complementam lacunas ainda existentes sobre a biologia reprodutiva do gênero *Hemitriccus*, especificamente para a espécie *Hemitriccus margaritaceiventer* na Caatinga potiguar. As principais lacunas preenchidas incluem fenologia e período reprodutivo local, capacidade da ninhada e características detalhadas dos ninhos. A relevância do estudo consiste na contribuição para a compreensão das estratégias adaptativas da espécie em um bioma marcado pela sazonalidade climática, além de abrir margem para ações de conservação voltadas tanto para a preservação de habitats quanto para o manejo de populações.

Arabic	Hebrew	Polish
Bulgarian	Hindi	Portuguese
Catalan	Hmong Daw	Romanian
Chinese Simplified	Hungarian	Russian
Chinese Traditional	Indonesian	Slovak
Czech	Italian	Slovenian
Danish	Japanese	Spanish
Dutch	Klingon	Swedish
English	Korean	Thai
Estonian	Latvian	Turkish
Finnish	Lithuanian	Ukrainian
French	Malay	Urdu
German	Maltese	Vietnamese
Greek	Norwegian	Welsh
Haitian Creole	Persian	

Referências

- BARNETT, J. M. et al. (2000). Rediscovery and observations of Kaempfer's Tody-tyrant. *Bird Conservation International*, 10, 371–379.
- BENCKE, G. A. et al. (2001). First description of the nest of the Brown-breasted Pygmy-tyrant. *Ornitologia Neotropical*, 12(1), 1-9.
- BROWN, J. H. (1984). On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist*, 124, 255–279.
- CABACINHA, C. D.; CASTRO, S. S. (2010). Estrutura diamétrica e conservação de fragmentos florestais. *Floresta e Ambiente*, 17(1), 51–62. DOI: 10.4322/floram.2011.001.
- CLOCK, B. (2020). Buff-breasted Tody-Tyrant (*Hemitriccus mirandae*). In: *Birds of the World*. Cornell Lab of Ornithology. Disponível em: <https://doi.org/10.2173/bow.bbtttyr2.01>. Acesso em: 17 ago. 2025.
- CLOCK, B. M. (2004). Genera *Atalotriccus* and *Hemitriccus*. In: *Handbook of the Birds of the World*. v. 9. Lynx Edicions. p. 315–328.
- COHN-HAFT, M. (2000). A case study in Amazonian biogeography. Tese (Doutorado) — Louisiana State University.
- CROZARIOL, M. A. (2016). Evolução da forma de nidificação da Superfamília Tyrannoidea. Tese (Doutorado) – UFRJ, Rio de Janeiro.
- CRUZ, T. B. (2024). Caracterização dos ninhos de aves do Brasil. TCC (Graduação) - UFAL, Maceió.

- DE LA PEÑA, M. R. (1987). Nidos y huevos de aves argentinas. Lux SRL.
- DE LA PEÑA, M. R. (2013). Nidos y reproducción de las aves argentinas. Ediciones Biologica.
- D'ORBIGNY, A.; LAFRESNAYE, F. (1837). Synopsis avium. Roret.
- FITZPATRICK, J. W. (2004). Family Tyrannidae. In: Handbook of the Birds of the World. v. 9. Lynx Edicions. p. 170–462.
- GOODFELLOW, P. (2011). Avian architecture. Princeton University Press.
- GUILHERME, W. (2019). Ecologia e conservação do tody-de-kaempfer. Tese (Doutorado) – UEL, Londrina.
- GUILHERME, W. (2024). Reproductive biology of the threatened Kaempfer's tody-tyrant. Ornithology Research. DOI: 10.1007/s43388-024-00194-0.
- HANSEN, M. C. et al. (2013). High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. Science, 342, 850-853.
- IDEMA. (2008). Perfil do seu município: Assú. IDEMA. Disponível em: [link suspeito removido]. Acesso em: 17 ago. 2025.
- IPBES. (2019). Relatório de Avaliação Global sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. secretaria IPBES.
- JONES, P. et al. (2011). Monitoring species abundance and distribution. Journal of Applied Ecology, 48(1), 1-8.
- KIRWAN, G. M.; WHITTAKER, A. (2009). The nest of the Striated-neck Tody-tyrant. Ornithologia Neotropical, 20(2), 299-304.
- LEITE, R. de A.; SANTOS, M. T. L. F. (2015). Incongruências na criação de unidades de conservação. Revista do Direito Público, 10(3), 141-154. DOI: 10.5433/1980-511X.2015v10n3p141.
- LELE, S. R. et al. (2013). Selection, use, choice and occupancy. Journal of Animal Ecology, 82, 1183–1191.
- LIMA, F. P.; MUNIZ, J. N.; DE MARCO JÚNIOR, P. (2010). Evaluating Brazilian Conservation Projects. Natureza & Conservação, 8(1), 41-45.
- LIRA, P. K.; SANTOS, M. S.; METZGER, J. P. (2019). Temporal Lag in Ecological Responses to Landscape Changes. Current Landscape Ecology Reports, 4(3), 77-88. DOI: 10.1007/s40823-019-00040-w.
- LOVEJOY, T.; NOBRE, C. (2018). Amazon tipping point. Science Advances, 4, eaaat2340. DOI: 10.1126/sciadv.aat2340.
- MANICA, L.; MARINI, M. A.; DUCA, C. (2010). Técnicas de pesquisa em biologia reprodutiva de aves. In: Ornithologia e Conservação. Technical Books. p. 297–312.

- MARINI, M. Â. et al. (2009). Biologia reprodutiva de *Tyrannus savana*. *Biota Neotropica*, 9(3), 55-63. DOI: 10.1590/S1676-06032009000300004.
- MARINI, M. Â. et al. (2009). Mainstream and distributor. *Diversity and Distributions*, 15, 59-69. DOI: 10.1111/j.1472-4642.2008.00491.x.
- MARTIN, T. E.; GEUPEL, R. G. (1993). Nest-monitoring plots. *J Field Ornithol*, 64, 507–519.
- MATTHEWS, T. J.; WHITTAKER, R. J. (2015). On the species abundance distribution. *Journal of Applied Ecology*, 52, 443–454.
- MCCULLOUGH, J. M.; LODOÑO, G. A. (2017). Nesting Biology of the Black-throated Tody-tyrant. *The Wilson Journal of Ornithology*, 129(4), 820–826. DOI: 10.1676/16-122.1.
- MELO, F. P. et al. (2021). Nesting biology of the Rufous-necked Puffbird. *Journal of Ornithology*, 162(1), 25-32.
- NOGUEIRA, I. T. et al. (2024). Sistema de monitorio climático em Assú, RN. *Research, Society and Development*, 13(11), e28131147287. DOI: 10.33448/rsd-v13i11.47287.
- OLIVEIRA-SILVA, W. et al. (2024). Habitat use and co-occurrence of two species of tody-tyrant. *Journal of Natural History*, 59(1-4), 77-98.
- ONU MEIO AMBIENTE. (2019). *Perspectivas do Meio Ambiente Global 6*. PNUMA. Disponível em: <https://www.unep.org/resources/global-environment-outlook-6>. Acesso em: 9 ago. 2025.
- PEDRO, C. M. L. (2023). Efeito de distúrbios antropogênicos sobre a predação de ninhos artificiais. *TCC (Graduação)*.
- PIMM, S. L.; RAVEN, P. (2000). Biodiversidade: extinção em números. *Natureza*, 403, 843–845.
- QUINN, J. L.; KOKOREV, Y. (2002). Trading-off risks from predators. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51, 455-460.
- QUIROGA, O. B.; CEJAS, D. (2023). Nidificación de la Mosqueta Ojo Dorado. *Nuestras Aves*, 68, 243–245. DOI: 10.56178/na.vi68.1017.
- RHEINDT, F. E.; NORMAN, J. A.; CHRISTIDIS, L. (2008). *Handbook of the birds of the world*. v. 9. Lynx Edicions.
- RIBEIRO, S. A.; DUCA, C.; MARTIN, T. E. (2024). Clutch size and incubation period of tropical birds. *Ecology & Evolution*, 14(3), e11005. DOI: 10.1002/ece3.11005.
- ROBINSON, W. D.; STYRSKY, J. N.; BRAUN, J. D. (2005). Are artificial bird nests effective surrogates? *Auk*, 122, 843–852.
- SETO, K. C. et al. (2012). Previsões globais de expansão urbana até 2030. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 16083–8.
- SICK, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira.

SILVA, R. V. L. (2002). Influência da ação humana no comportamento agonístico. Ararajuba, 10(2), 237-240.

SIMON, J. E.; PACHECO, S. (2005). Standardization of nest descriptions. Revista Brasileira de Ornitologia, 13, 143–154.

SKUTCH, A. F. (1985). Nesting success, and predation on nests. Ornithological Monographs, 36, 575–594.

TELLO, J. G.; BATES, J. M. (2007). Filogenética molecular do conjunto tody-tirano. Auk, 124, 134–154.

XIAO, H. et al. (2017). How much do we know about the breeding biology of bird species? Journal of Avian, 48, 513-518. DOI: 10.1111/jav.00934.

Arabic	Hebrew	Polish
Bulgarian	Hindi	Portuguese
Catalan	Hmong Daw	Romanian
Chinese Simplified	Hungarian	Russian
Chinese Traditional	Indonesian	Slovak

Czech	Italian	Slovenian
Danish	Japanese	Spanish
Dutch	Klingon	Swedish
English	Korean	Thai
Estonian	Latvian	Turkish
Finnish	Lithuanian	Ukrainian
French	Malay	Urdu
German	Maltese	Vietnamese
Greek	Norwegian	Welsh
Haitian Creole	Persian	

Anexos

Figura 1. Ninho de *Hemitriccus margaritaceiventer* ativo com dois ovos, encontrado na Floresta Nacional de Assú, no Rio Grande do Norte, Brasil.

Figura 2. Ovos de *Hemitriccus margaritaceiventer* na Floresta Nacional de Assú, no Rio Grande do Norte, Brasil.

CÓDIGO: SB1474

AUTOR: DIOGO HIESY TAVARES DANTAS

COAUTOR: MARINEIDE FERREIRA DA SILVA

COAUTOR: HÉLIDA MARAVILHA DANTAS E SOUSA ALMEIDA

ORIENTADOR: ALIANDA MAIRA CORNELIO DA SILVA

TÍTULO: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE HORMÔNIOS COMO FATORES ETIOLÓGICOS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA

Resumo

RESUMO: A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória e neurodegenerativa do sistema nervoso central, caracterizada pela destruição da bainha de mielina e comprometimento da neurotransmissão. Sua etiologia é multifatorial, envolvendo predisposição genética, fatores imunológicos, ambientais, virais, hormonais e a hipovitaminose D. Esta revisão narrativa teve como objetivo analisar artigos recentes que apontam interações complexas, destacando o papel modulador dos hormônios na etiologia da doença.

METODOLOGIA: As buscas foram executadas e como achados obtivemos 3825 artigos, mas apenas 814 foram inclusos, sendo eles categorizados em fatores hormonais, fatores virais, fatores genéticos, fatores imunológicos, fatores ambientais, e a hipovitaminose D.

RESULTADOS: Foram encontrados dez tipos de hormônios que influenciam na patogênese, alguns com maior prevalência, como a testosterona, dentre outros hormônios estão estrogênio, estradiol, AMH, melatonina, progesterona, LH, FSH, dehidroepiandrosterona e androstenediona. A testosterona, mesmo que seja apenas um hormônio, pode afetar de formas diferentes os pacientes. Além disso, vale ressaltar que os estudos analisam não só o sistema endócrino, mas como o ambiente e a imunidade.

CONCLUSÃO: Entende-se com este estudo que a EM é, de fato, uma doença multifatorial e que pode afetar o indivíduo de diversas maneiras, como a testosterona, a qual pode induzir uma piora progressiva.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla; hormônios; Testosterona; Neurodegenerativa.

TITLE: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE HORMÔNIOS COMO FATORES ETIOLÓGICOS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA

Abstract

ABSTRACT: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, and neurodegenerative disease of the central nervous system, characterized by the destruction of the myelin sheath and impaired neurotransmission. Its etiology is multifactorial, involving

genetic predisposition, and immunological, environmental, viral, hormonal factors, and hypovitaminosis D. This narrative review aimed to analyze recent articles that point to complex interactions, highlighting the modulating role of hormones in the etiology of the disease.

METHODOLOGY: Searches were performed, and we found 3825 articles, but only 814 were included. They were categorized into hormonal factors, viral factors, genetic factors, immunological factors, environmental factors, and hypovitaminosis D.

RESULTS: Ten types of hormones that influence pathogenesis were found, some with a higher prevalence, such as testosterone, which accounted for 27.8%. Other hormones included are estrogen, estradiol, AMH, melatonin, progesterone, LH, FSH, dehydroepiandrosterone, and androstenedione. Testosterone, even though it's just one hormone, can affect patients in different ways. Furthermore, it's worth noting that the studies analyze not only the endocrine system but also the environment and immunity.

CONCLUSION: It is understood from this study that MS is, in fact, a multifactorial disease that can affect individuals in different ways, such as testosterone, which can induce progressive worsening.

Keywords: Multiple Sclerosis; hormones; Testosterone; Neurodegenerative.

Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória, neurodegenerativa e crônica que afeta o sistema nervoso central (SNC), incluindo o cérebro e a medula espinhal. Ela ocorre quando o sistema imunológico ataca a bainha de mielina, uma camada protetora e isolante que envolve as fibras nervosas. A destruição dessa camada leva a interrupções na comunicação entre o cérebro e o resto do corpo, levando a uma variedade de sintomas (Lakin, 2021).

É uma doença, a qual sua manifestação ocorre, principalmente, em adultos jovens, do sexo feminino, em torno de 20 a 40 anos de idade. Em todo mundo são aproximadamente 2,8 milhões de pessoas com esclerose múltipla. A sua patogênese é explicada atualmente por uma hiperativação das células T, que reconhecem autoantígenos específicos no SNC, atacando a bainha de mielina (Hauser, 2020). Isso tem como resultado danos ou destruição de neurônios em áreas específicas do sistema nervoso. Essas lesões ou placas (esclerose) têm início precoce e promovem atrofia em áreas da substância branca e cinzenta, resultado de cicatrizes gliais e transecções de axônios, que é agravada pela incapacidade ou falha na remielinização neuroaxonal. (Woo, 2024, p. 494).

As manifestações clínicas da EM estão relacionadas com a localização e a gravidade das lesões no sistema nervoso. Podem ser graves no início da doença ou começar mais lentamente, muitas vezes, sendo despercebidos por meses ou até anos (Davies, 2005). 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 dos músculos faciais que podem provocar buxismo), sensibilidade ao calor, disfunção da bexiga, dor, disfunção cognitiva, geralmente leve, “névoa cerebral”, dificuldade em realizar multitarefas, disfunção sexual, fadiga (Hauser, 2020).

No entanto, a etiologia definitiva acerca do que leva a essa reatividade imunológica ainda é desconhecida. Contudo, algumas hipóteses são referenciadas na literatura como possíveis precursores dessa desordem imune, como hipovitaminose, desordens hormonais, genéticas, fatores virais e ambientais. E mesmo com diversos estudos que visam elucidar algum mecanismo de etiologia e explicar a patogênese da doença, não há muitas pesquisas que compilem esses dados buscando explicar a neurodegeneração em questão, à luz das diversas hipóteses disponíveis na literatura (Woo, 2004).

Dada toda a complexidade envolta desta patologia, este projeto visa discutir: quais fatores podem ocasionar a EM? Logo, desenvolver uma revisão da literatura que se propõe a analisar de forma ampla sobre os possíveis fatores etiológicos da doença, é de grande relevância especialmente sob a óptica da saúde pública, visto que a EM afeta jovens adultos em todo o mundo, e em idade economicamente ativa. Assim, os resultados obtidos por esse projeto concederão embasamento para futuros estudos envolvendo o manejo da EM, assim como alerta de fatores importantes para a sua prevenção.

Desse modo, o objetivo deste estudo é compilar e analisar, por meio de pesquisa narrativa, os principais achados das diferentes etiologias referenciadas na literatura sobre a patogênese da Esclerose Múltipla.

Metodologia

Para atender aos objetivos deste estudo, foi adotada a abordagem narrativa da literatura como método de estudo. Isso, pois, as revisões narrativas visam identificar e resumir publicações, exploração de debates existentes, ou seja, aprofundar o conhecimento em uma determinada área de pesquisa. Foram seguidos os seguintes passos:

Desenho das Buscas e Seleção de Bases de Dados: As buscas foram realizadas nas seguintes bases de dados em ciências médicas e biológicas: Scopus, PubMed, Embase e Web of Science. O delineamento da pesquisa foi baseado nas principais hipóteses sobre a etiologia da Esclerose Múltipla: fatores imunológicos (relação da resposta imunológica e a EM); fatores ambientais (como o ambiente pode influenciar o desenvolvimento da doença); fatores genéticos (predisposição genética à EM); fatores virais (influência de vírus, como o Epstein-Barr, na etiologia da doença); fatores endocrinológicos (impacto dos hormônios sexuais na manifestação da EM).

Estratégia de Busca: Os descritores utilizados foram: “multiple sclerosis environmental factors”, “multiple sclerosis viral factors/EBV”, “multiple sclerosis sex hormonal”, “multiple sclerosis immunological factors” e “multiple sclerosis genetic factors”; cruzados a partir do emprego dos operadores booleanos AND/ OR. O resultado foi a seguinte fórmula de busca: (“multiple sclerosis” AND (“environmental factors” OR “Epstein-Barr virus” OR “sex

hormones" OR "immune dysregulation" OR "genetic predisposition") AND ("etiology" OR "risk factors").

Crerios de Inclusão e Exclusão: foram incluídos estudos em inglês, publicados nos últimos 10 anos, que fornecessem informações relevantes sobre os fatores de interesse. Como critérios de exclusão, foram excluídos do trabalho os estudos com teorias refutadas, devido a questões éticas e hipóteses sem fundamentação científica. Assim, teses, dissertações, artigos de revisão e epidemiológicos, pesquisas que não abordassem em seus resultados nenhuma abordagem que relacionasse algum fator etiológico e o surgimento da esclerose múltipla, trabalhos indisponíveis na íntegra (como resumos publicados em congressos) foram excluídos.

Os artigos resgatados das bases de dados foram gerenciados através da plataforma de revisão Rayyan, sendo os artigos duplicados eliminados automaticamente. Feito isso, seguiu-se para a leitura dos títulos e resumos. Dessa forma, os artigos que contivessem em seus títulos e resumos alguns dos termos-chave listados anteriormente foram incluídos. Os artigos incluídos neste primeiro momento foram agrupados em conformidade com as etiologias relacionadas à esclerose múltipla indicadas em: fatores imunológicos; fatores ambientais; fatores genéticos; fatores virais; hipovitaminose D e fatores hormonais. Após a divisão dos artigos nas temáticas supracitadas iniciou-se análise dos artigos relacionando-os à temática “fatores hormonais”.

Resultados e Discussões

Três mil e oitocentos e vinte e cinco artigos foram importados das bases de dados eletrônicas. Esses artigos foram gerenciados através da utilização do aplicativo Rayyan. Assim, mil e setecentos e setenta e três artigos foram excluídos pelo Rayyan, por serem duplicados, restando dois mil e cinquenta e dois. Após a leitura dos títulos e resumos, foram retirados mil duzentos e trinta e oito trabalhos, sendo incluídos oitocentos e quatorze. Estes oitocentos e quatorze artigos foram categorizados em seis tópicos: fatores ambientais; fatores genéticos; fatores virais; hipovitaminose D e fatores hormonais. Dentre estes supracitados, foram incluídos quarenta e quatro artigos na subcategoria fatores hormonais. Esses trabalhos foram lidos na íntegra e, após essa leitura, dois artigos foram excluídos por serem estudos epidemiológicos, dois por estarem indisponíveis e oito foram realocados para outras seções (ambiental e genético). Dos 32 artigos restantes, vinte artigos foram excluídos por não atenderem os critérios de elegibilidade, conforme relatado na Figura 1.

Com a análise dos artigos incluídos no estudo, foi possível mapear os principais hormônios que poderiam influenciar a etiologia ou sintomas da esclerose múltipla, conforme mostrado na Tabela 1.

Ao analisar os doze estudos correspondentes aos fatores hormonais relacionados à etiologia e/ou sintomas da patogênese da EM, foram identificados e tabulados onze tipos de hormônios, os quais são descritos no Gráfico 1.

Diante do cenário visto, vários hormônios podem influenciar a etiologia e os sintomas da esclerose múltipla.

Por exemplo, Akhtar (2016) investigou a presença de EM em mulheres trans e a influência da testosterona - hormônio mais citado e estudo dentre os achados. Nesse sentido, os autores

sugerem que essas mulheres estão mais suscetíveis à EM em decorrência da mudança hormonal abrupta. Conforme esses dados, a EM se manifesta no início da transição de sexo, porque é nessa fase que ocorre a maior ingestão de hormônios. Consequentemente, o organismo passa a entender essa ingestão como algo errado e o sistema imunológico é ativado e passa a tentar reverter aquela irregularidade. Isto posto, o corpo ficará sobrecarregado para neutralizar o discurrido e os indivíduos com EM ficarão mais suscetíveis à piora da doença, porque a sua imunidade está voltada a regular os hormônios. Em decorrência disso, o organismo continuará em declínio até se adaptar à nova fase. E, assim, a patogênese conseguirá sobressair sem tantas barreiras. Além disso, como a imunidade do corpo funciona como uma barreira/silenciadora natural da EM, ao passar a tentar atenuar a irregularidade hormonal e não atuando na sua função prioritária, a patogênese passa a se expressar de forma mais pujante e progressiva por não ter um dificultador. Ou seja, com a mudança de sexo, as mulheres trans parecem estar mais suscetíveis à EM, devido à alteração hormonal que age em conjunto com o sistema imunológico.

Outra forma de exemplificar um dos possíveis intempéries decorrentes da testosterona e estrogênio, é com estudo que analisa a proporção do segundo para o quarto dígito na mão (2D:4D; GAZIOGLU et al., 2020). Essa proporção é determinada no útero sob a influência da exposição hormonal pré-natal, sem nenhuma mudança ocorrendo durante a vida subsequente. Como a proporção 2D:4D transmite a atividade androgênica e estrogênica e também está associada a distúrbios psiquiátricos, é uma forte medida para indicar a EM.

O estudo analisou do segundo ao quarto dedo de pacientes com e sem EM e mostrou que mulheres com EM têm o quarto dedo menor do que as do caso controle. Segundo GAZIOGLU et al. (2020) isto é um indicativo de que existe uma alteração na atividade androgênica e estrogênica, devido à exposição deficitária de testosterona na vida uterina. Esse fator seria responsável pelo desenvolvimento da patogênese posteriormente, em decorrência do caminho andrógeno-aromatase-estrogênio ainda no útero. Esse percurso converte testosterona, hormônio androgênico, em estradiol, hormônio estrogênico - apesar de ser um curso normal do organismo, se exacerbado, há déficits que podem desregular a quantidade necessária de testosterona para aquele sexo que, provavelmente, pode ser um grande potencializador da EM. Além dessas alterações, o sistema imunológico também é comprometido, o que induz uma possível manifestação precoce da doença e uma gravidade acentuada. Apesar dos resultados acima, é necessário ressaltar que não se deve considerar apenas a oscilação hormonal como o único fator a ser analisado, visto que outros fatores relacionados à etiologia da doença devem ser considerados, tais como fatores ambientais, genéticos ou imunológicos.

No entanto, apesar da testosterona ser o mais comentado, estudado e relacionado com a piora da EM, Geng e Tang (2024) associaram a Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais (SHGB), proteína a qual é produzida pelo fígado e que se liga a hormônios sexuais, aos hormônios testosterona e estradiol para mensurar se, de fato, eles são influenciadores da patogênese, tendo como resultado o oposto dos demais, pois foi constatado que, apesar de baixo nível destes hormônios, eles não apresentam efeito significativo para a potencialização da doença, de modo a associar a EM a fatores genéticos.

Embora a testosterona seja o hormônio mais citado da busca, há outros que também corroboram a EM, como o anti-Mülleriano (AMH) e o estradiol. O AMH é um hormônio marcador de reserva ovariana, o qual só pode exercer sua plena função se o hipotálamo estiver sem efeito nocivo da EM, haja visto que ele libera gonadotrofina (GnRH) que irá

passar pela hipófise, estimulando o hormônio luteinizante (LH) e o folículo-estimulante (FSH), os liberando na corrente sanguínea, tendo seu destino final o ovário, onde haverá o estímulo do AMH, no entanto, mulheres com EM em estágios mais graves podem ter seus níveis de reserva ovariana abaixo do esperado, ao comparar mulheres sem a patologia, porque a EM pode afetar o hipotálamo ou a hipófise e comprometer todo o processo, logo, uma vez que o ciclo é interrompido o resultado final é defasado, ou seja, quando a EM atua de forma mais forte e atinge áreas mais nobres, há o declínio do AMH e, por consequência, uma reserva ovariana defasada, a qual acarretará dificuldades em engravidar. Assim, entende-se e supõe-se que a EM é uma doença acarretadora de diversas disfunções, dentre elas, a infertilidade.

Em outra perspectiva, conforme Yorgun (2019), observou-se o estradiol, FSH, LH e a progesterona em mulheres com EM no período pré-menstrual. Neste período foram feitas duas análises: coletas de sangue, para saber os índices dos hormônios, e um questionário, acerca da piora física e cognitiva destas pacientes. Como resultado, obtiveram dados positivos para piora cognitiva e física, porquanto, se o físico, uma representação fisiológica, está mais debilitado, entende-se que os níveis hormonais também estão em declínio e com isso, suas funções estão comprometidas e enfraquecidas. Logo, a ideia de que mulheres com EM têm dificuldades em engravidar aumenta, pois no período pré-menstrual hormônios como estradiol caem, de modo a convergir e assegurar o supracitado, em que os níveis de AMH baixos também comprometem a gravidez.

Assim como o supracitado, Neyal (2023) também investigou o hormônio FSH, entretanto, concomitante foi analisado o tabagismo associado à menopausa precoce e piora da EM. Como se sabe, o uso do tabaco provoca a menopausa precoce, um efeito nocivo para pacientes com EM ou predisposição, porque, como já foi discutido anteriormente, qualquer alteração hormonal desencadeia a piora da patologia. A partir desta premissa houve a investigação de mulheres fumantes e como resultado: menopausa precoce, declínio do FSH e expressão da EM. Portanto, entende-se que pacientes com EM, apesar da doença já ser debilitante, eles têm uma vivência muito moderada e cerceada, haja visto que algumas mudanças ou modos de agir, por mais que simples, podem afetar negativamente suas vidas.

Conclusão

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.

Além disso, é necessário aprofundar, ainda mais, os estudos acerca da testosterona, pois, embora seja o hormônio mais estudado, ele pode atuar de diversas formas no organismo, a depender em qual região está sendo avaliada, o que nos impede de fazer afirmações; já os outros hormônios como estradiol e AMH, precisam ganhar enfoque nas pesquisas futuras, haja vista que suas ideias são coesas e convergem em mesmo sentido, contudo, há poucos achados, logo, não se pode confirmar as teorias sobre suas consequências.

Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução: Farias A. dos S. et al. 6ª ed. Rio de Janeiro. Saunders Elsevier. 2008.

ASCHERIO, A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.*, v. 13, n. 12s, p. 3-9, 2013. DOI:10.1586/14737175.2013.865866.

BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, v. 347, n. 12, p. 911-920, 19 set. 2002. DOI: 10.1056/NEJMra020100.

BARKHANE, Z.; ELMADI, J.; SATISH, K. L., et al. Multiple Sclerosis and Autoimmunity: A Veiled Relationship. *Cureus. Palo Alto*. V. 14. n 4. art. e24294. p. 1-12. 19 Apr; 2022. DOI: 10.7759/cureus.24294.

CORREALE, J. The role of microglial activation in disease progression. *Mult Scler*, v. 20, n. 10, p. 1288-1295, set. 2014. DOI: 10.1177/1352458514533230.

DAVIES, S.; NICHOLSON, T.; LAURA, M.; GIOVANNONI, G. et al. Spread of T lymphocyte immune responses to myelin epitopes with duration of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 64, n. 5, p. 371-377, mai. 2005. DOI: 10.1093/jnen/64.5.371. PMID: 15892293.

FERNÁNDEZ-PABLOSA, M. A. et al. Management of symptoms associated with spasticity in patients with multiple sclerosis. *Enfermería Clínica*, v. 26, n. 6, p. 367-373, nov.-dez. 2016. DOI: 10.1016/j.enfcli.2016.06.009.

FRANCO, R. C.; CURIB, H. T.; ANDRADE, L. F. et al. Understanding the difficulties and contextual factors in the daily activities of people with multiple sclerosis: a pilot study. *Brazilian Notebooks of Occupational Therapy*, v. 30, e2942, 2022. DOI: 10.1590/2526-8910.ctoAO22292942.

GALE, C. R.; MARTYN, C. N. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*, v. 47, n. 4-5, p. 425-448, nov.-dez. 1995. PMID: 8966212.

LAKIN, L. et al. Comprehensive Approach to Management of Multiple Sclerosis: Addressing Invisible Symptoms—A Narrative Review. *Neurology and therapy*, v. 10, n. 1, p. 75–98, 20 abr. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). DATASUS. Morbidade hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil. Brasília, 2024. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Acesso em: 20 jun. 2024.

POHL, D. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, v. 286, n. 1-2, p. 62-64, 15 nov. 2009. DOI: 10.1016/j.jns.2009.03.028.

SELMAJ, K. et al. Multiple sclerosis: time for early treatment with high-efficacy drugs. *Journal of neurology*, v. 271, n. 1, p. 105–115, 18 out. 2023.

SPARACO, M.; BONAVIDA, S.; The role of sex hormones in women with multiple sclerosis: From puberty to assisted reproductive techniques, *Frontiers in Neuroendocrinology*. V. 60. art. 100889. Jan. 2021. DOI:10.1016/j.yfrne.2020.100889.

TAVAZZI, E.; ROVARIS, M.; LA MANTIA, L. Drug therapy for multiple sclerosis. CMAJ. Canadian Medical Association journal, v. 186, n. 11, p. 833–840, 22 abr. 2014.

THACKER, E. L.; MIRZAEI, F.; ASCHERIO, A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. Ann Neurol, v. 59, n. 3, p. 499-503, mar. 2006. DOI: 10.1002/ana.20820.

THE MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION.

Atlas of MS, 3rd Edition (September 2020.); <<https://www.msif.org/wp-content/upads/2020/10/Atlas-3rd-Edition-Epidemiology-report-EN-updated-30-9-20.pdf>> . Acesso em: 17 jun. 2024.

WAUBANT, E.; LUCAS, R.; MOWRY, E. et al. A. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. Ann Clin Transl Neurol, v. 6, n. 9, p. 1905-1922, set. 2019. DOI: 10.1002/acn3.50862.

WINSTON-KHAN, S. I. et al. Stigma in Multiple Sclerosis: A Narrative Review of Current Concepts, Measures, and Findings. Int J MS Care, v. 26, n. 3, p. 125-133, mai.-jun. 2024. DOI: 10.7224/1537-2073.2023-047.

ALIZADEH KHATIR, G. et al. The effect of estrogen replacement therapy on multiple sclerosis progression: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Neuroscience, v. 130, n. 4, p. 331-340, 2020

TURKYILMAZ, H. et al. Decreased second to fourth digit ratios in female multiple sclerosis patients. Early Human Development, [s. l.], v. 144, p. 105039, maio 2020. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2020.105039.

WINCHEL, Ingo et al. Sex- and species-specific contribution of CD99 to T cell costimulation during multiple sclerosis. Biology of Sex Differences, [S. l.], v. 15, n. 41, 2024. DOI:<https://doi.org/10.1186/s13293-024-00618-y>. Disponível em:<https://doi.org/10.1186/s13293-024-00618-y>.

Anexos

Figura 1 – Fluxograma de detalhamento da pesquisa.

Gráfico 1 - índice dos hormônios citados.

Tabela 1 –Hormônios que influenciam a etiologia e/ou sintomas da esclerose múltipla.

CÓDIGO: SB1483

AUTOR: MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA GUERREIRO

ORIENTADOR: DANIEL MARQUES DE ALMEIDA PESSOA

TÍTULO: Desenvolvimento de um modelo taxidermizado de caranguejo para substituição de animais vivos em pesquisas comportamentais

Resumo

A utilização de modelos animais taxidermizados em pesquisas comportamentais tem se mostrado uma estratégia promissora para reduzir a captura de indivíduos vivos (YORZINSKI; PLATT, 2012), especialmente em espécies ameaçadas. O presente estudo teve como objetivo produzir modelos taxidermizados do caranguejo terrestre *Cardisoma guanhumi*, conhecido popularmente como Guaiamum, replicando seus quatro padrões de cores (“I”, “II”, “III” e “IV”), e avaliar se esses modelos poderiam substituir animais vivos em testes comportamentais. Os espécimes foram coletados no Rio Grande do Norte, Brasil, e taxidermizados seguindo metodologia adaptada de Oliveira (1964). A coloração dos modelos foi registrada, e comparada à de indivíduos vivos por meio de espectrofotometria, analisando brilho, saturação e matiz dos exemplares, por meio do pacote pavo 2.0 do software R. Testes comportamentais foram conduzidos registrando-se o tempo de permanência e as interações de machos vivos com fêmeas taxidermizadas, por meio de um protocolo que já havia utilizado fêmeas vivas. Os resultados indicaram que os machos não apresentaram preferência por padrões de corespecíficos, e permaneceram principalmente nas extremidades da arena, um resultado similar ao encontrado quando fêmeas vivas foram apresentadas. A comparação entre as propriedades físicas das cores naturais e artificiais revelou resultados semelhantes.

Palavras-chave: Taxidermia. Coloração animal. Crustacea. Conservação. Etologia.

TITLE: Development of a taxidermized crab model for the replacement of live animals in behavioral research

Abstract

The use of taxidermized animal models in behavioral research has proven to be a promising strategy to reduce the capture of live individuals (YORZINSKI; PLATT, 2012), especially in threatened species. The present study aimed to produce taxidermized models of the land crab *Cardisoma guanhumi*, popularly known as Guaiamum, replicating its four color patterns (“I”, “II”, “III” and “IV”), and to evaluate whether these models could replace live animals in behavioral tests. Specimens were collected in Rio Grande do Norte, Brazil, and taxidermized following a methodology adapted from Oliveira (1964). The coloration of the models was recorded and compared to that of live individuals through spectrophotometry, analyzing brightness, saturation, and hue of the specimens using the pavo 2.0 package in R software. Behavioral tests were conducted by recording the time spent and the interactions of live males with taxidermized females, using a protocol that had previously employed live females. The results indicated that males did not show preference for specific color patterns and remained mainly at the edges of the arena, a result similar to that found when live females

were presented. The comparison between the physical properties of natural and artificial colors revealed similar results.

Keywords: Taxidermy. Animal coloration. Crustacea. Conservation. Ethology.

Introdução

A pesquisa científica está sempre trazendo inovações, e não seria diferente quando falamos em testes na ecologia comportamental com modelos animais não vivos. Modelos podem ser reproduzidos na forma de esculturas em madeira ou plástico e depois pintados (THOROGOOD; DAVIES, 2016); de modelos liofilizados, que consistem na sublimação direta do solvente no corpo do animal congelado em temperaturas ultra baixas (BAZIN; SEALY, 1993); de modelos impressos produzidos com tecnologia de impressão 3D (BARTOLINI et al., 2016); de modelos utilizando plasticina atóxica (GUIDI et al., 2021); e modelos taxidermizados, nos quais pelos, penas, carapaças e peles são mantidos, preenchidos com enchimento e preservados em antisséptico (SCHULZE-HAGEN et al., 2003).

A taxidermia, em especial, destaca-se por uma ampla utilização em museus e coleções biológicas, servindo não somente para funções didáticas, mas também para a pesquisa, preservando o DNA para estudos genéticos, bem como os próprios animais para estudos morfológicos. Também é utilizada para treinar animais resgatados em centros de reabilitação e em projetos de reintrodução que estudam comportamentos de sobrevivência (MARBURY, 2014). Além disso, um estudo com aves substituiu o potencial predador vivo por um guaxinim taxidermizado, a fim de observar sistemas de detecção de predadores e preservar os animais de potenciais ataques (YORZINSKI; PLATT, 2012). Com isso, vemos que a taxidermia engloba diversas aplicações metodológicas, para os mais variados grupos animais, mostrando-se uma importante ferramenta de conscientização e conservação das espécies.

Os crustáceos apresentam grande diversidade de formas e colorações, e estas desempenham papel fundamental na ecologia das espécies, atuando, por exemplo, como sinais visuais utilizados na seleção de parceiros, em que a comunicação pode ocorrer exclusivamente por meio da cor (BALDWIN; JOHNSON, 2009), e também nas interações agonísticas, nas quais exibem ao oponente as cores do lado externo do quelípodo (SCHÖNE, 1968). Em algumas espécies de braquiúros, os caranguejos identificam o gênero e reconhecem animais da espécie por padrões de cores aprendidos (DETTO et al., 2006).

Apesar de não haver muitos estudos comportamentais utilizando modelos não vivos de crustáceos, seu desenvolvimento é importante, visto que podem reduzir a quantidade de animais vivos utilizados em pesquisas, contemplando dois dos três R's da pesquisa com animais: a substituição (Replacement) e a redução (Reduction) (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

O Guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) é uma espécie categorizada como Criticamente Ameaçada (CR), critério A4bcd, segundo a União Internacional para a Conservação da

Natureza – IUCN (SANTOS et al., 2022). Portanto, é de suma importância entender seu comportamento, fisiologia e ecologia para elaborar planos de manejo e conservação. Essa abordagem dialoga com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, em especial o ODS 14 (Vida na Água) e o ODS 15 (Vida Terrestre), ao promover práticas científicas mais sustentáveis e menos impactantes para a biodiversidade.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo produzir modelos taxidermizados da espécie de caranguejo terrestre *Cardisoma guanhumi*, replicando seus quatro padrões de cores nomeados “I”, “II”, “III” e “IV” (GIFFORD, 1962) (Figura 1), para utilização desses modelos em testes comportamentais como substitutos de animais vivos. Em particular, o foco deste estudo foi analisar se o caranguejo *C. guanhumi* taxidermizado e pintado artificialmente apresenta coloração equivalente à de indivíduos vivos, bem como verificar se os modelos taxidermizados podem substituir animais vivos em experimentos comportamentais.

Metodologia

Área de coleta e sujeitos amostrais;

O caranguejo *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, é conhecido como guaiamum, sendo o maior caranguejo terrestre e o único membro da família Gecarcinidae encontrado nas Américas (DUARTE et al., 2008). As coletas foram realizadas no estado do Rio Grande do Norte, Brasil: no Riacho Taborda, Parnamirim (5°57'53"S; 35°08'58"W). Foram coletados 8 indivíduos de *C. guanhumi* para taxidermização e 93 para os testes comportamentais, entre janeiro e março. Os espécimes foram capturados utilizando armadilhas tipo “ratoeiras”, confeccionadas no Laboratório de Ecologia Sensorial (SEL), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Após a captura, os animais foram transportados em caixa térmica e mantidos em terrários até a realização dos experimentos no laboratório.

A pesquisa foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Autorização para atividades com finalidade científica: nº 91008-1; Código de autenticação: 0910080120231208) e, para as atividades na UFRN, contou com a revisão e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRN (Protocolo nº 006/2024).

Mensuração de cor e tamanho;

Através da utilização de um paquímetro digital, realizou-se o processo de medição dos animais em relação às dimensões horizontais e verticais da carapaça e do quelípedo hipertrofiado. Na caracterização da cor, mediu-se a coloração utilizando o espectrofotômetro USB4000-UV-VIS (Ocean Optics, Inc.), conectado a uma fonte de luz DH-2000-BAL (Ocean Optics, Inc.). Os locais de medição da cor e do brilho incluíram a carapaça anterior (CA), carapaça posterior (CP), carapaça superior (CS), carapaça lateral (CL), boca lateral (BL), boca inferior (BI), boca superior, quela frontal (QF), quela carpus (QS), quela superior (QS) e o 5º pereópodo, sendo regiões de grande visibilidade para outros animais (Figura 2).

Taxidermização;

Taxidermizou-se, por meio da metodologia adaptada do trabalho de Oliveira (1964), no Museu de Ciências Morfológicas (MCM-UFRN). Para a pintura dos espécimes, foi utilizada uma balança de precisão. As misturas mais próximas da coloração do animal foram

organizadas em uma tabela por códigos de cores (Tabela 2), contendo informações sobre a quantidade de tinta para cada mistura, o morfotipo e a região a ser pintada (Tabela 3) (Figura 3). Aplicou-se o primer, tinta acrílica PVA fosca (Tabela 1) e filtro solar em spray, aplicado todas as vezes antes do experimento ser realizado, para bloquear a emissão do ultravioleta (UV) presente na tinta Azul Ultramar (ACRILEX).

Análise das cores naturais e artificiais;

Mediu-se o espectro das pinturas, com o objetivo de selecionar qual destas estava mais próxima à coloração natural dos animais. Para verificar essa proximidade da pintura artificial com a coloração natural, realizou-se a comparação das propriedades físicas das cores naturais e artificiais quanto ao brilho, à saturação e à matiz por meio do pacote pavo 2.0 (MAIA et al., 2019), no programa R (R CORE TEAM, 2024) (Figura 4).

Testes comportamentais;

Realizaram-se testes comportamentais em arenas de madeira, divididas em três quadrantes: um central, medindo 140 cm × 50 cm, e dois nas extremidades, medindo 50 cm × 30 cm, separados por uma divisória de vidro (Figura 5). Nas extremidades da arena, duas fêmeas taxidermizadas foram posicionadas a uma distância de 5 mm da divisória de vidro. Foram realizados quatro tratamentos: confrontaram-se fêmeas dos padrões “IV” e “I”; “IV” e “II”; “IV” e “III”; e no quarto, o tratamento controle, com duas fêmeas do padrão “IV”, a fim de analisar se o comportamento do macho diante do animal taxidermizado seria semelhante ao observado frente a um animal vivo (CORDEIRO, 2025).

A região central da arena foi virtualmente subdividida em quatro zonas: T1 (fêmea teste), D1 (fêmea IV) e duas zonas intermediárias, T0 e D0, localizadas medialmente afastadas de T1 e D1 (Figura 6). Para avaliar se o macho apresenta preferência por permanecer próximo às fêmeas, bem como indícios de escolha entre elas, registrou-se o tempo total gasto em cada zona e mensurou-se o tempo de interação. Este último foi definido como o período em que o macho se encontrava: (i) a menos de 5 cm da divisória de vidro; (ii) orientado lateral ou frontalmente em direção à fêmea; e (iii) em movimento.

Os testes da manhã ocorreram entre 05:30 à 07:00 e os a tarde entre 16:00 à 17:30, períodos em que a espécie se encontra mais ativa. Cada macho foi utilizado apenas uma vez. Os 15 minutos de aclimação e 75 minutos de observação de cada macho foram registrados por duas câmeras (TAPO-C100). Foram realizados, ao todo, 93 testes, sendo 89 no período da tarde e 4 no período da manhã.

Rastreamento comportamental;

As coordenadas espaciais dos machos foram extraídas dos vídeos utilizando a ferramenta DeepLabCut. As análises comportamentais foram conduzidas no Matlab 2021 (The Mathworks, Inc., Natick, Massachusetts, 2025). A velocidade instantânea foi obtida quadro a quadro, calculando-se a distância euclidiana bidimensional entre posições consecutivas e dividindo-a pelo intervalo temporal entre quadros. Para gerar os mapas de calor e estimar o tempo de permanência em cada região, foi desenvolvido um algoritmo em Matlab com a função `histcounts2`, utilizando como entrada as coordenadas rastreadas pelo DeepLabCut e os limites de cada eixo.

Análise estatística;

Para testar a preferência dos machos realizou-se o teste Shapiro-Wilk, revelando que os dados

das quatro áreas da arena (T1, T0, D0 e D1) não apresentaram distribuição normal. Dessa forma, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Dunn-Bonferroni para verificar diferenças entre os grupos dos tratamentos e identificar quais divergiam entre si. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Development Core Team), no RStudio, por meio dos pacotes rstatix e nortest, utilizando o ggplot2 na criação dos gráficos

Resultados e Discussões

A comparação entre as propriedades físicas (brilho, saturação e matiz) das cores naturais e artificiais (Figura 4) apresentaram resultados semelhantes. No entanto, observaram-se exceções com variações acentuadas na região da quela frontal (manus), em todos os padrões de cor, bem como na boca superior (3º maxilípede) e na carapaça superior do padrão III, além da quela carpus no padrão IV.

Foram elaborados dois gráficos do tipo boxplot: o primeiro representou o tempo por área em cada tratamento (Figura 7) e o segundo apresentou o tempo de interação em cada tratamento (Figura 8). Ao analisar o tempo por área de cada tratamento, foi observado que não ocorreu uma diferença significativa no tempo que o macho permaneceu próximo a cada padrão de cor (Tabela 4). O mesmo ocorreu no tempo de interação em cada tratamento (Tabela 5). A análise do mapa de calor (Figura 9) evidenciou que os machos permaneceram a maior parte do tempo nas extremidades da arena, corroborando os resultados estatísticos.

Os resultados demonstram que os machos não apresentaram preferência por um padrão de corespecífico das fêmeas taxidermizadas, como ocorrido com fêmeas vivas no trabalho de Cordeiro (2025). No entanto, a ausência de preferência neste experimento não implica que, em outras condições, tal comportamento não possa ser evidenciado. A falta de preferência pode estar relacionada ao modelo experimental da arena, uma vez que animais em situação de desconforto tendem a buscar os cantos, o que pôde ser observado no mapa de calor (Figura 9). Além disso, os testes não foram realizados no período reprodutivo da espécie, época em que os machos respondem de maneira mais intensa a estímulos externos (GIFFORD, 1962).

Conclusão

A comparação das propriedades físicas das cores naturais e artificiais revelou resultados semelhantes. Os testes comportamentais não indicaram preferência dos machos por determinado padrão de cor, apresentando resultados consistentes com os descritos por Cordeiro (2025), o que sugere possíveis limitações metodológicas. Recomenda-se a revisão do modelo de arena utilizado, bem como a realização do experimento em período reprodutivo

Referências

THOROGOOD, R.; DAVIES, N. Combining personal with social information facilitates host defences and explains why cuckoos should be secretive. *Scientific Reports*, v. 6, n. 19872, 2016. DOI: 10.1038/srep19872.

BAZIN, R. C.; SEALY, S. G. Experiments on the responses of a rejector species to threats of predation and cowbird parasitism. *Ethology*, v. 94, n. 4, p. 325–338, 1993. DOI: 10.1111/j.1439-0310.1993.tb00449.x.

BARTOLINI, F. et al. Zebrafish response to 3D printed shoals of conspecifics: the effect of body size. *Bioinspiration & Biomimetics*, v. 11, n. 2, 2016. DOI: 10.1088/1748-3190/11/2/026003.

GUIDI, R. D. S.; SÃO-PEDRO, V. de A.; SILVA, H. R. da; COSTA, G. C.; PESSOA, D. M. A. The trade-off between color and size in lizards' conspicuous tails. *Behavioural Processes*, 2021. DOI: 10.1016/j.beproc.2021.104496.

SCHULZE-HAGEN, K.; STEINHEIMER, F.; KINZELBACH, R.; GASSER, C. Avian taxidermy in Europe from the middle ages to the renaissance. *Journal für Ornithologie*, v. 144, n. 4, p. 459–478, 2004. DOI: 10.1111/j.1439-0361.2003.03047.x.

MARBURY, R. *Taxidermy Art: A Rogue's Guide to the Work, the Culture, and How to Do It Yourself*. Artisan, 2014.

YORZINSK, J. L.; PLATT, M. L. The difference between night and day: anti-predator behavior in birds. *Journal of Ethology*, v. 30, p. 211–218, 2012. DOI: 10.1007/s10164-011-0318-5.

BALDWIN, J.; JOHNSON, S. The importance of color in mate choice of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 212, 2009. DOI: 10.1242/jeb.028027.

SCHÖNE, H. Agonistic and Sexual Display in Aquatic and Semi-Terrestrial Brachyuran Crabs. *American Zoologist*, v. 8, n. 3, p. 641–654, 1968. DOI: 10.1093/icb/8.3.641.

DETTO, T.; BACKWELL, P. R. Y.; HEMMI, J. M.; ZEIL, J. Visually mediated species and neighbour recognition in fiddler crabs (*Uca mjoebergi* and *Uca capricornis*). *Proceedings of the Royal Society B*, p. 1661–1666, 2006. DOI: 10.1098/rspb.2006.3503.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 54, n. 2, p. 120–132, mar. 2015.

SANTOS, L. C. M.; BOOS, H.; SANO, E. E. et al. Management and conservation of the land crab *Cardisomaguahumi* (Crustacea: Gecarcinidae) based on environmental and fishery factors: a case study in Brazil. *Wetlands Ecology and Management*, v. 30, p. 389–403, 2022.

GIFFORD, C. A. Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisomaguahumi* (Latreille), in South Florida. *The Biological Bulletin*, v. 123, n. 1, p. 207–223, 1962. DOI: 10.2307/1539516.

DUARTE, M. S.; MAIA-LIMA, F. A.; MOLINA, W. F. Interpopulational morphological analyses and fluctuating asymmetry in the brackish crab *Cardisomaguahumi* Latreille (Decapoda, Gecarcinidae), on the Brazilian Northeast coastline. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 3, n. 3, p. 294–303, 2008.

OLIVEIRA, L. D. D. Taxidermia na espécie *Cardisomaguahumi*. *Arquivos do Instituto de Antropologia*, Natal, v. 1, n. 2, p. 153–160, dez. 1964. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/items/65f36e59-850d-42dd-818c-c-cda385af2853>.

MAIA, R.; GRUSON, H.; ENDLER, J. A.; WHITE, T. E. pavo 2: new tools for the spectral and spatial analysis of colour in R. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 10, n. 7, p. 1097–1107, 2019. DOI: 10.1111/2041-210X.13174.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

CORDEIRO, Thiago De Freitas. Papel adaptativo do polimorfismo de com em fêmeas de *Cardisomaguahumi* Latreille 1828, (Brachyura: gecarcinidae). 2025. 72 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

THE MATHWORKS, INC. MATLAB: version R2021a. Natick, MA: The MathWorks, Inc., 2025. Disponível em: <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>.

SILVA, D. J. A.; ERICKSON, M. F.; GUIDI, R. D. S.; PESSOA, D. M. A. Thin-fingered fiddler crabs display a natural preference for UV light cues but show no sensory bias to other hypertrophied claw coloration. *Behavioural Processes*, v. 200, 2022, p. 104667. DOI: 10.1016/j.beproc.2022.104667.

COSTA, F. P. da; ARRUDA, M. de F.; RIBEIRO, K.; PESSOA, D. M. de A. Influence of color and brightness on ontogenetic shelter preference by the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae). *Zoologia (Curitiba)*, v. 40, 2023. DOI: 10.1590/S1984-4689.v40.e22023.

HORVATH, K.; ANGELETTI, D.; NASCETTI, G.; CARERE, C. Invertebrate welfare: an overlooked issue. *Ann Ist Super Sanità*, v. 49, n. 1, p. 9–17, 2013. DOI: 10.4415/ANN_13_01_04.

QUINTERO-TORRES, E.; CHACÓN, N.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, B. The ecosystem engineering role of the Neotropical crab *Cardisoma guanhumi* in mangrove soil properties. *Wetlands Ecology and Management*, v. 26, p. 993-1000, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11273-018-9618-7>.

Anexos

Figura 1 - Os quatro padrões de cor do caranguejo *Cardisoma guanhumi*, com a respectiva numeração. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 1 - Tintas utilizadas na confecção das cores, incluindo a marca referente e o código utilizado para cada uma. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 3 - Códigos referentes a cada região para cada padrão de cor. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 3 - Modelos taxidermizados e pintados de acordo com seu padrão de cor característico (I, II, III e IV). Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 4a - Gráficos da comparação das propriedades físicas (brilho, saturação e matiz) das cores naturais e artificiais nas regiões de maior visualização do animal. Padrão de cor “I”.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 4b - Gráficos da comparação das propriedades físicas (brilho, saturação e matiz) das cores naturais e artificiais nas regiões de maior visualização do animal. Padrão de cor “II”.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 4c - Gráficos da comparação das propriedades físicas (brilho, saturação e matiz) das cores naturais e artificiais nas regiões de maior visualização do animal. Padrão de cor “III”.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 4d - Gráficos da comparação das propriedades físicas (brilho, saturação e matiz) das cores naturais e artificiais nas regiões de maior visualização do animal. Padrão de cor “IV”.
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 5 - Espaço onde ocorreu o experimento comportamental, contendo as 4 arenas, os 2 suportes e as 2 câmeras. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 6 - Esquema da arena subdividida virtualmente. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 7 - Boxplot do tempo por área da arena em cada tratamento, onde se observa a falta de diferença significativa entre grupos. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 8- Boxplot do tempo de interação em cada tratamento, onde se observa a falta de diferença significativa entre grupos. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 4 - Valor de p do tempo por área de cada tratamento. Todos os valores de p foram p

Tabela 5 - Valor de p do tempo de interação em cada tratamento. Todos os valores de p foram p

Figura 9 - Mapa de calor. Quanto mais quente a coloração, mais tempo o macho permaneceu no local.

Tabela 2 - Cada letra no código equivale a uma tinta, utilizada com sua respectiva quantidade, formando a mistura completa.

Figura 2 - Locais de medição da cor e do brilho: CP(A), CS (B), CA (C), CL (D), BL (E), BI (F), BS (G), QF (H), QC (I), QS (J) e o 5° pereópodo. (K). Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

CÓDIGO: SB1494

AUTOR: VINÍCIUS SILVA DE MORAIS

ORIENTADOR: IURI GOULART BASEIA

TÍTULO: Estudo taxonômico da ordem Phallales E. Fisch. em remanescentes de Mata Atlântica nos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba

Resumo

A ordem Phallales é caracterizada por basidiomas com morfologias peculiares, gleba mucilaginosa e mecanismos de dispersão passiva de esporos. Este estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a diversidade taxonômica e ecológica de Phallales em remanescentes de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte. Foram realizadas coletas entre maio e julho, com análise de características macroscópicas e micromorfológicas de basidiomas, incluindo observações de hifas, rizomorfos, pseudostipes, volvas e basidiósporos. Como resultado, foram registrados dois gêneros distintos, totalizando sete exsicatas e três espécies: *Clathrus natalensis*, *Phallus indusiatus* e *Phallus cf. purpurascens*. Destaca-se o possível primeiro registro de *P. purpurascens* para a região Nordeste, o que reforça a relevância da taxonomia integrativa, associando análises morfológicas e moleculares. Os achados evidenciam o potencial micológico ainda pouco explorado da região e a importância de investimentos em pesquisa para subsidiar a conservação e compreensão da biodiversidade local.

Palavras-chave: Diversidade. Ecologia. Fungos. Gasteroides. Taxonomia

TITLE: Taxonomic study of the order Phallales E. Fisch. in remnants of Atlantic Forest in the states of Rio Grande do Norte and Paraíba

Abstract

The order Phallales is characterized by basidiomes with peculiar morphologies, mucilaginous gleba, and passive spore dispersal mechanisms. This study aimed to expand knowledge about the taxonomic and ecological diversity of Phallales in remnants of the Atlantic Forest in Rio Grande do Norte. Collections were made between May and July, with analysis of macroscopic and micromorphological characteristics of basidiomes, including observations of hyphae, rhizomorphs, pseudostipes, volvas, and basidiospores. As a result, two distinct genera were recorded, totaling seven exsiccatae and three species: *Clathrus natalensis*, *Phallus indusiatus*, and *Phallus cf. purpurascens*. Of particular note is the possible first record of *P. purpurascens* for the Northeast region, which reinforces the relevance of integrative taxonomy, combining morphological and molecular analyses. The findings highlight the region's still largely unexplored mycological potential and

the importance of investing in research to support the conservation and understanding of local biodiversity.

Keywords: Diversity. Ecology. Fungi. Gasteromycetes. Taxonomy.

Introdução

Os fungos gasteroides, que incluem a ordem Phallales, são caracterizados por um desenvolvimento angiocárpico e pela dispersão passiva de esporos, em contraste com outros basidiomicetos que liberam esporos a distâncias consideráveis por meios ativos. Os esporos amadurecem dentro do basidioma, envolvidos por uma camada estéril denominada perídio, composta por subcamadas como exoperídio, mesoperídio e endoperídio (Miller & Miller, 1988). Este grupo é polifilético, abrangendo ordens como Agaricales, Boletales, Geastrales, Hysterangiales e Phallales (He et al., 2019).

Os Phallales, são conhecidos por suas formas morfológicas peculiares e pela gleba mucilaginosa (Alexopoulos et al., 1996). A família Phallaceae, cosmopolita e composta por gêneros como *Phallus*, *Mutinus*, *Clathrus*, e outros, possui um basidioma com gleba mucilaginosa que atrai insetos por seu odor fétido, uma estratégia de dispersão eficaz (Miller & Miller, 1988; Webster & Weber, 2007). Esta ordem compreende as famílias Claustulaceae, Gastrosporiaceae e Phallaceae, com 32 gêneros e 157 espécies (Wijayawardene et al., 2021).

Estudos filogenéticos indicam que os fungos gasteroides têm origens evolutivas distintas, sugerindo que o termo "gasteroide" é um táxon artificial e não possui valor taxonômico (Baseia et al., 2014; Webster & Weber, 2007; Wijayawardene et al., 2021). A diversidade e distribuição dos Phallales são notáveis, ocorrendo em diferentes ecossistemas, incluindo áreas de Mata Atlântica nos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba, onde os estudos podem ter resultados significativos (Baseia et al., 2003; Baseia & Calonge, 2005; Cabral et al. 2012; Cabral et al. 2019; Cabral et al. 2022; Miller & Miller, 1988).

Recentes descobertas na região destacam a necessidade de estudos taxonômicos e ecológicos para descrever a biodiversidade desses fungos e contribuir para estratégias de conservação (Baseia et al., 2003; Baseia & Calonge, 2005; Fazolino et al., 2010; Cabral et al., 2012; Melanda et al., 2021). A riqueza de espécies de fungos, ainda pouco conhecida, pode fornecer insights para aplicações futuras em áreas como medicina e agricultura, semelhante às contribuições históricas da micologia para avanços como a descoberta da penicilina (Raven et al., 1996).

Portanto, este estudo visa não apenas ampliar o conhecimento taxonômico das Phallaceae na Mata Atlântica, mas também fornecer bases para a conservação desses ecossistemas e explorar potenciais aplicações biotecnológicas dos fungos gasteroides.

Metodologia

Coleta, processamento e herborização: Os espécimes serão coletados durante a estação chuvosa, no período entre Maio a Julho. A metodologia adotada para a coleta e preservação dos basidiomas será a de Baseia et al. (2014). Trilhas pré existentes serão percorridas a fim de verificar os locais onde normalmente fungos gasteroides se desenvolvem (solo, serapilheira, madeira em decomposição e esterco). Os espécimes encontrados serão fotografados, em seguida removidos do substrato com o auxílio de canivete. Também será feita uma varredura no substrato, verificando se há estruturas como rizomorfa e basidiomas imaturos. Os basidiomas serão acondicionados em recipientes compartimentados e etiquetados. Nas etiquetas constam informações como: coletor, local de coleta, data, características do substrato, hábito de crescimento, coloração e dimensões do basidioma. O material será levado para o laboratório de Biologia de Fungos, localizado no Departamento de Botânica e Zoologia (DBEZ) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), colocado em um desidratador a aproximadamente 40°C por até 48 horas e, posteriormente, colocado em envelopes etiquetados. Após as análises, o material identificado receberá números de registro e serão depositados na Coleção de Fungos da UFRN. Toda a coleção possui seus dados inseridos em um banco de dados (BRAHMS) que está sendo periodicamente enviado ao Centro de Referências em Informação Ambiental (CRIA).

Resultados e Discussões

Como resultado deste estudo, foram coletados e analisados basidiomas de dois gêneros distintos, totalizando sete exsiccatas e três espécies descritas. Dentre elas, destaca-se *Phallus purpurascens* T.S.Cabral, B.D.B.Silva & Baseia que, caso confirmado por análises moleculares, representará o primeiro registro para a região Nordeste e o segundo para a ciência.

DESCRIÇÃO DO MATERIAL ANALISADO

Clathrus natalensis G.S. Medeiros, Melanda, T.S. Cabral, B.D.B Silva & Baseia, Persoonia 41: 351 (2018).

Material examinado: BRASIL. Rio Grande do Norte. Natal, Campus Universitário Central da UFRN, Setor IV, (UFRN-Fungos 2799). Rio Grande do Norte, Campus Universitário Central da UFRN, Mata dos Saguais (UFRN-Fungos 2796).

Basidiomas imaturos subglobosos, 15–20 × 18–24 mm, branco a branco amarelado (4A1,4A2 KW). Rizomorfa medindo 68 mm, branco (1A1). Basidiomas expandidos 97 × 75 mm. Malhas do braço pentagonais, 18-21 × 17-22 mm, brancas (1A1) da base à porção média e (7A2) da porção média ao ápice. Pseudoestipe ausente. Gleba mucilaginosa, cinza esverdeado a verde escuro (30E2,30F3), com odor fétido. Volva subglobosa, 28 × 24 mm, branco (1A1). Rizomorfa medindo 68 mm, branco (1A1). Basidiósporos cilíndricos, 3,9-5,1 × 1,5-2,5 µm, parede ≤ 0,5 µm, hialina em KOH. Braços exibindo células globosas, subglobosas e irregulares, 16,7-45,2 × 15,2-31,3 µm, parede ≤ 0,7 µm diam, hialina. Volva composta de hifas filamentosas de 2,1-4,3 µm de diâmetro, parede ≤ 0,8 µm de diâmetro, fina, não septada, ramificada, sem grampos de conexão.

Phallus indusiatus Vent., Mém. Inst. Natl. Sci., Sci. Arts 1: 520 (1798).

Material examinado: BRASIL. Rio Grande do Norte, Floresta Nacional de Nísia Floresta. Rio Grande do Norte, Parque Estadual das Dunas de Natal.

Basidiomas imaturos globoso a subgloboso, 32 mm de altura x 47 mm de diâmetro, branco a branco alaranjado (5A1, 5B2). Rizomorfa medindo 75 mm. Basidiomas expandidos com 130 mm de altura. Pseudoestipe 90 mm de altura × 12 mm de diâmetro, branco (1A1). Gleba mucilaginosa marrom-oliva a verde escuro, com odor fétido. Volva hipógea, subglobosa, 38 mm de altura × 45 mm de diâmetro. Véu branco (1A1) ocupando mais de 2/3 do basidioma. Rizomorfa medindo 75 mm, branco (1A1). Basidiósporos alongados, 3,2-3,9 µm × 1,4–2,0, parede ≤ 0,5 µm, lisa, hialina. Pseudoestipe composto por células globosas, 30-52 × 22-48 µm de diâmetro, parede ≤ 0,7 µm de diâmetro. Volva composta por hifas filamentosas, 3,2-6,4 µm diam, hialina, fina, com grampos de conexão. Rizomorfa composto de hifas filamentosas, 2,5-6,4 µm de diâmetro, parede ≤ 0,4 µm diam, fino, hialino, com cristais.

Phallus cf. purpurascens T.S.Cabral, B.D.B.Silva & Baseia, MycoKeys 58: 115 (2019).

Material examinado: BRASIL. Rio Grande do Norte. Natal, Campus Universitário Central da UFRN, Mata dos Saguis. Rio Grande do Norte, Floresta Nacional de Nísia Floresta.

Basidiomas imaturos globoso a subgloboso, 45 mm de altura x 52 mm de diâmetro, branco a branco rosado (5A1, 5A2, 6A2, 7A2). Rizomorfa medindo 98 mm. Basidiomas expandidos com 190 mm de altura. Pseudoestipe 120 mm de altura × 18 mm de diâmetro, branco (1A1). Gleba mucilaginosa marrom-oliva a verde escuro, com odor fétido. Volva semi-hipógea, subglobosa, 45 mm de altura × 52 mm de diâmetro. Véu branco (1A1) ocupando mais de 2/3 do basidioma. Rizomorfa medindo 170 mm, branco (1A1). Basidiósporos cilíndricos, 4,3-4,5 µm × 2,3-3,1 µm, parede ≤ 0,4 µm, lisa, hialina. Pseudoestipe composto por células globosas a ovóides, 35-65 × 20-47 µm de diâmetro, parede ≤ 1,0 µm de diâmetro.

Volva composta por hifas filamentosas, 3,4-6,5 μm diam, hialina, fina, com grampos de conexão. Rizomorfa composto de hifas filamentosas, 2,9-6,1 μm de diâmetro, parede $\leq 0,7$ μm diam, fino, hialino, septado, com cristais.

Conclusão

O presente estudo contribui para o conhecimento da diversidade da ordem Phallales em remanescentes de Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Norte, apresentando registros relevantes de espécies já conhecidas e o possível primeiro registro de *Phallus purpurascens* para a região Nordeste. A descrição detalhada dos basidiomas coletados reforça a importância de trabalhos integrativos, que associem análises morfológicas e moleculares para a correta identificação taxonômica e compreensão das relações evolutivas dentro do grupo. Além disso, os resultados aqui apresentados ressaltam o potencial micológico ainda pouco explorado da região, evidenciando a necessidade de investimentos em pesquisas que possam ampliar a compreensão da biodiversidade local e subsidiar estratégias de conservação dos ecossistemas.

Referências

- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. Wiley.
- Baseia, I. G., Silva, B. D. B., & Cruz, R. H. S. F. (2014). *Fungos Gasteroides no Semiárido do Nordeste Brasileiro*. Print Mídia.
- Cabral, T. S., Marinho, P., Goto, B. T., & Baseia, I. G. (2012). *Abrachium*, a new genus in the Clathraceae, and *Itajahya* reassessed. *Mycotaxon*, 119(1), 419-429.
- Cabral, T. S., Silva, B. D., Martín, M. P., Clement, C. R., Hosaka, K., & Baseia, I. G. (2019). Behind the veil—exploring the diversity in *Phallus indusiatus* sl (Phallomycetidae, Basidiomycota). *MycoKeys*, 58, 103.
- Cabral, T. S., Melanda, G., De Assis, N. M., Ovrebo, C., Baseia, I. G., & Martín, M. P. (2022). Loosening the belt: unknown diversity of the strangled stinkhorn genus *Staheliomyces* (Phallales, Basidiomycota). *Mycological Progress*, 21(4), 1-17.
- He, M.-Q., Zhao, R.-L., Hyde, K. D., Begerow, D., Kemler, M., Yurkov, A., McKenzie, E. H. C., et al. (2019). Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 99(1), 105–367.
- Melanda, G. C., Silva-Filho, A. G., Lenz, A. R., Menolli Jr., N., Lima, A. D. A. D., Ferreira, R. J., ... & Baseia, I. G. (2021). An overview of 24 years of Molecular Phylogenetic Studies in Phallales (Basidiomycota) with notes on systematics,

geographic distribution, lifestyle, and edibility. *Frontiers in Microbiology*, 12, 689374.

Miller, O. K., & Miller, H. H. (1988). *Gasteromycetes: Morphological and Development Features*. Mad Rivers Press.

Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Dai, D. Q., Sánchez-García, M., Goto, B. T., & Magurno, F. (2022). *Outline of Fungi and fungus-like taxa–2021*.

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press.

CÓDIGO: SB1499

AUTOR: GERALDO ALEXANDRE DO NASCIMENTO NETO

ORIENTADOR: ERMELINDA MARIA MOTA OLIVEIRA

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO SOB SISTEMA AGROFLORESTAL IMPLANTADO NA ÁREA DE EXPERIMENTAÇÃO AGROECOLÓGICA DA ESCOLA AGRÍCOLA DE JUNDIAÍ

Resumo

O Sistema agroflorestal pedagógico (SAFP) é um sistema integrado de aprendizagem que combina o cultivo de plantas e a criação de animais com o objetivo de ensinar princípios de sistemas agroflorestais agroecológicos. Objetivou-se avaliar o pH do solo um Sistema Agroflorestal Pedagógico (SAFP) na Escola Agrícola de Jundiaí (EAJ), UFRN, em Macaíba/RN. As análises de pH foram realizadas em 10 linhas de canteiro, cada uma com diferentes técnicas de adubação orgânica, calagem e cobertura do solo. Os tratamentos aplicados em cada linha de canteiro foram: Linha 1 (L1): Cobertura com poda triturada + adubação com composto. Linha 2 (L2): Cobertura de poda triturada + calagem (200 g/m²). Linha 3 (L3): Cobertura com poda triturada + adubação com composto. Linha 4 (L4): Cobertura com poda triturada + calagem + composto. Linha 5 (L5): Adubação de fundação com composto. Linha 6 (L6): Adubação de fundação com composto. Linha 7 (L7): Adubação com biomassa (margaridão). Linha 8 (L8): Calagem + composto. Linha 9 (L9): Composto. Linha 10 (L10): Composto + poda triturada. Os valores de pH variaram de 6,58 a 7,24, indicando condições de solo favoráveis ao desenvolvimento das culturas. A linha (L4) apresentou o pH mais elevado (7,24), evidenciando a eficácia da calagem e do composto na estabilização do pH. Concluiu-se que as práticas de manejo aplicadas no SAFR da EAJ resultaram em condições de pH de solo adequadas para o desenvolvimento das culturas.

Palavras-chave: Sistema Agroflorestal, cobertura do solo, adubação orgânica

TITLE: CHEMICAL CHARACTERIZATION OF SOIL UNDER AGROFORESTRY SYSTEM IMPLEMENTED IN THE AGROECOLOGICAL EXPERIMENTATION AREA OF THE AGRICULTURAL SCHOOL OF JUNDIAÍ

Abstract

The Pedagogical Agroforestry System (SAFP) is an integrated learning system that combines plant cultivation and animal husbandry with the aim of teaching the principles of agroecological agroforestry systems. The objective was to evaluate the soil pH of an Educational Agroforestry System (SAFP) at the Agricultural School of Jundiaí (EAJ), UFRN, in Macaíba/RN. pH analyses were performed on 10 rows of beds, each with different techniques of organic fertilization, liming, and soil cover. The treatments applied in each row of beds were: Row 1 (R1): Covering with shredded prunings + fertilization with compost. Row 2 (R2): Covering with shredded prunings + liming (200 g/m²). Row 3 (R3): Covering with shredded prunings + fertilization with compost. Row 4 (L4): Mulching with shredded

prunings + liming + compost. Row 5 (L5): Foundation fertilization with compost. Row 6 (L6): Foundation fertilization with compost. Row 7 (L7): Fertilization with biomass (margaridão). Line 8 (L8): Liming + compost. Line 9 (L9): Compost. Line 10 (L10): Compost + shredded pruning. pH values ranged from 6.58 to 7.24, indicating soil conditions favorable to crop development. Line (L4) had the highest pH (7.24), demonstrating the effectiveness of liming and compost in stabilizing pH. It was concluded that the management practices applied in the EAJ SAFP resulted in soil pH conditions suitable for crop development.

Keywords: Agroforestry system, soil cover, organic fertilization

Introdução

A avaliação da fertilidade do solo constitui um pilar fundamental para o manejo agrícola eficiente, tendo como objetivo primordial a determinação da disponibilidade de nutrientes para as plantas (Alvarez V., 1996). Nesse contexto, a análise química do solo emerge como o critério essencial para avaliar sua fertilidade e, conseqüentemente, sua qualidade química. Em Sistemas Agroflorestais (SAFs), a avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) do solo é crucial para compreender sua acidez ou alcalinidade, uma vez que essa característica influencia diretamente a disponibilidade de nutrientes para as plantas e a atividade microbiana (Silva et al., 2024). O Sistema agroflorestal pedagógico (SAFP) é um sistema integrado de aprendizagem que combina o cultivo de plantas e a criação de animais com o objetivo de ensinar princípios de sistemas agroflorestais agroecológicos. Ela serve como um laboratório vivo onde estudantes e professores podem observar e interagir com processos naturais, aprendendo técnicas agrícolas que respeitam e potencializam a biodiversidade local. (CARVALHO, 2024). O pH do solo é expresso em uma escala que varia de 0 a 14, onde 7 é considerado neutro; valores abaixo de 7 indicam acidez e valores acima de 7 indicam alcalinidade. Em SAFs, a medição do pH auxilia no monitoramento e ajuste das condições do solo para otimizar a produtividade das culturas e a saúde do ecossistema. O pH equilibrado, geralmente na faixa de 6 a 7, é ideal, pois garante que nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo e potássio estejam em formas disponíveis para as plantas (Alvarez V., 1996). Além disso, solos com pH adequado favorecem o crescimento de microrganismos benéficos, que desempenham papel vital na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes (Carneiro, 2013). A manutenção de um pH adequado também previne a toxicidade de elementos como o alumínio em solos muito ácidos ($\text{pH} < 5,5$) e a diminuição da disponibilidade de micronutrientes como ferro e zinco em solos muito alcalinos ($\text{pH} > 7,5$). Essa caracterização inicial é importante para o adequado manejo nutricional das diversas espécies florestais, oleícolas, frutíferas e culturas anuais já implantadas no SAF. A área de experimentação agroecológica da Escola Agrícola de Jundiá (EAJ), onde está implantado o Sistema Agroflorestal Pedagógico (SAFP) do Grupo de Estudos em Solos (GESOLO), ainda carece de uma avaliação detalhada da fertilidade do solo. Esta caracterização inicial é importante para o adequado manejo nutricional das diversas espécies florestais, oleícolas, frutíferas e culturas anuais já implantadas no SAF. O pH do solo pode ser alterado por fatores naturais, como a decomposição de matéria orgânica e a composição mineral do solo, e por fatores artificiais, como a aplicação de fertilizantes e corretivos (Vieira et al., 2004). Práticas como a calagem (aplicação de carbonato de cálcio) são comuns para elevar o pH de solos ácidos, enquanto a adição de matéria orgânica, como composto, pode estabilizar o pH e melhorar a fertilidade. O presente trabalho teve como objetivo realizar a determinação do pH do solo sob cultivo em Sistema Agroflorestal Pedagógico da Escola Agrícola de Jundiá.

Metodologia

A área de estudo compreende a Agrofloresta Pedagógica (SAFP) do Grupo de Estudos em Solos (GESOLO) com aproximadamente 0,5 hectares, na Escola Agrícola de Jundiaí (EAJ), pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), localizada no município de Macaíba, Rio Grande do Norte. O solo da região é classificado como Neossolo Flúvico, formado por sedimentos fluviais do Rio Jundiaí (Beltrão et al., 1975). O clima local é tropical chuvoso com verão seco, conforme a classificação de Köppen, com precipitação anual média de 1.442,8 mm e temperatura média anual de 27,1 °C. A implantação da Horta Agroecológica, que deu origem à Área de Experimentação Agroecológica, iniciou-se em 2014, por iniciativa da primeira turma de Agroecologia e Agricultura Orgânica (DOS SANTOS, 2020). Em 2023, a área foi expandida com a construção de uma Agrofloresta Pedagógica de 0,5 ha, adjacente à sede do GESOLO, com o intuito de desenvolver pesquisa e extensão em sistemas agroflorestais por meio da prática (RAMOS et al., 2023). O SAF consiste em 10 canteiros de 25 m de comprimento por 0,50 m de largura cada. Para a realização das análises de pH, os canteiros foram divididos em cinco áreas de 5,00 m de comprimento por 0,50 m de largura. Em cada área foram feitas oito amostras simples em duas profundidades diferentes, 0 - 10 cm e 10-20 cm de profundidade. Após cada coleta de amostras de solo simples foi feita uma mistura de cada profundidade para formar uma amostra composta. Os tratamentos aplicados em cada linha de canteiro foram: Linha 1 (L1): Cobertura com poda triturada + adubação com composto. Linha 2 (L2): Cobertura de poda triturada + calagem (200 g/m²). Linha 3 (L3): Cobertura com poda triturada + adubação com composto. Linha 4 (L4): Cobertura com poda triturada + calagem + composto. Linha 5 (L5): Adubação de fundação com composto. Linha 6 (L6): Adubação de fundação com composto. Linha 7 (L7): Adubação com biomassa (margaridão). Linha 8 (L8): Calagem + composto. Linha 9 (L9): Composto. Linha 10 (L10): Composto + poda triturada. Após a coleta das amostras de solo, essas foram acondicionadas em bandejas individuais onde ocorreu a secagem por um período de dois dias ao ar livre, para o preparo da Terra Fina Seca ao Ar (TFSA). Posteriormente, as análises de pH em água foram realizadas no laboratório de Solos e Resíduos Orgânicos da EAJ, utilizando um pHmetro de Bancada Digital PHB-550 da Incoterm. Para cada análise, 12g de solo seco foram pesados e transferidos para um béquer de 50ml, aos quais foram adicionados 50ml de água destilada. A mistura foi agitada por 1 minuto e, em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por 1 hora para estabilização antes da medição do pH.

Resultados e Discussões

Os resultados das análises de pH do solo nas diferentes linhas de canteiro do Sistema Agroflorestal Pedagógico (SAFP) são apresentados na Tabela 1. Os valores médios de pH variaram de 6,58 (Linha 10) a 7,24 (Linha 4). Essa faixa de pH é considerada adequada para a maioria das culturas agrícolas, indicando condições de solo que favorecem a disponibilidade de nutrientes. Tabela 1 - Valores médios de pH do solo das linhas de canteiro no Sistema Agroflorestal Pedagógico (SAFP) da Escola Agrícola de Jundiaí (EAJ). Tratamentos pH do solo L1: Cobertura com poda triturada + adubação com composto 6,85 L2: Cobertura de poda triturada + calagem (200 g/m²) 6,86 L3: Cobertura com poda triturada + adubação com composto 7,13 L4: Cobertura com poda triturada + calagem + composto 7,24 L5: Adubação de fundação com composto 7,19 L6: Adubação de fundação com composto 6,74 L7: Adubação com biomassa (margaridão) 6,97 L8: Calagem + composto. 7,11 L9: Composto

6,83 L10: Composto + poda triturada 6,58 A avaliação do pH do solo é um indicador fundamental da qualidade do solo e da sua capacidade de sustentar o crescimento vegetal. Um pH ideal, geralmente entre 6,0 e 7,0, otimiza a disponibilidade da maioria dos nutrientes essenciais para as plantas, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Soares et al., 2021). A Linha 4, que recebeu a combinação de cobertura com poda triturada, calagem e composto, apresentou o pH mais elevado (7,24). Este resultado corrobora a literatura, que aponta a calagem como uma prática eficaz na elevação do pH de solos ácidos, neutralizando a acidez e fornecendo cálcio (Vieira et al., 2004). A adição de composto orgânico também desempenha um papel crucial, pois a matéria orgânica, ao se decompor, libera ácidos orgânicos que podem tamponar o pH do solo, ou seja, estabilizá-lo, e em solos ácidos, pode contribuir para um aumento do pH (Carneiro, 2013). A sinergia entre calagem e matéria orgânica é benéfica, pois o composto melhora a estrutura do solo, a capacidade de troca catiônica e a atividade microbiana, potencializando os efeitos da calagem. As Linhas 3 (cobertura com poda triturada + adubação com composto) e 5 (adubação de fundação com composto) também exibiram valores de pH ligeiramente alcalinos, 7,13 e 7,19, respectivamente. A presença do composto orgânico nesses tratamentos é um fator chave para esses resultados. O composto orgânico, além de fornecer nutrientes, contribui para a estabilização do pH e a melhoria das propriedades físico-químicas do solo, promovendo um ambiente mais favorável para o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes. Em contraste, a Linha 10, que recebeu composto e poda triturada, registrou o menor pH (6,58). Embora ainda esteja dentro de uma faixa considerada adequada para a maioria das culturas, este valor sugere que, sem a adição de cal, a decomposição da matéria orgânica pode ter um efeito ligeiramente mais acidificante em comparação com os tratamentos que incluíam calagem. A decomposição de resíduos vegetais e a liberação de ácidos orgânicos podem levar a uma leve diminuição do pH, especialmente em solos com menor capacidade de tamponamento. As linhas (L1, L2, L6, L7, L8 e L9) apresentaram valores de pH variando entre 6,74 e 7,11, indicando condições de solo que variam de neutras a ligeiramente alcalinas. A Linha 2, com cobertura de poda triturada e calagem, obteve um pH de 6,86. A quantidade de calagem aplicada (200 g/m²) pode ter sido suficiente para aproximar o pH da neutralidade, mas não para elevá-lo tanto quanto na Linha 4, que também continha composto. A Linha 7, com adubação de biomassa (margaridão), registrou um pH de 6,97, demonstrando que a adição de biomassa verde pode contribuir para manter o pH em uma faixa ideal, além de enriquecer o solo com matéria orgânica e nutrientes. Comparando os resultados obtidos com outros estudos realizados na Escola Agrícola de Jundiá, observa-se a relevância do manejo orgânico no equilíbrio do pH do solo. No trabalho de Freire et. al (2016) observou-se que o uso do carvão vegetal e da manipueira atua como condicionante do solo, melhorando suas características químicas, físicas e biológicas, e como fertilizante. Canário (2015) concluiu que a manipueira, rica em nutrientes (principalmente nitrogênio, fósforo e potássio), pode ser utilizada como fertilizante orgânico alternativo à adubação química. A manipueira, sendo um resíduo orgânico, também pode influenciar o pH do solo, embora seu efeito possa variar dependendo da sua composição e da dose aplicada (Ferreira, 2012). A análise do pH é um indicador importante da saúde do solo e da atividade microbiana. Solos com pH na faixa ideal promovem o crescimento de microrganismos benéficos que são essenciais para a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a supressão de patógenos (Carneiro, 2013). A faixa de pH observada no SAFR da EAJ (6,58 a 7,24) é, de modo geral, favorável para a maioria das espécies cultivadas, minimizando o risco de toxicidade por elementos como alumínio em solos muito ácidos ou deficiências de micronutrientes em solos muito alcalinos. É importante ressaltar que o tipo de solo estudado, Neossolo Flúvico (Beltrão et al., 1975), possui características intrínsecas que podem influenciar sua resposta

aos tratamentos. Além disso, fatores ambientais como a precipitação e a composição mineral do solo também podem afetar o pH ao longo do tempo. A variabilidade observada entre as linhas reforça a importância de um monitoramento contínuo do pH e de outras características químicas do solo para um manejo adaptativo e eficiente no sistema agroflorestal.

Conclusão

No Sistema Agroflorestal Pedagógico (SAFP) da Escola Agrícola de Jundiá (EAJ), verificou-se que as práticas de manejo adotadas resultaram em condições de pH do solo favoráveis ao desenvolvimento das culturas.

Referências

- ALVAREZ V., V. H. Avaliação da fertilidade do solo. Viçosa, MG: UFV, 1996. BELTRÃO, M. L. G. de M.; SUGUIO, K.; PETRI, S. Geologia da Folha de Natal. DNPM, 1975.
- CANÁRIO, T. M. F. Resposta da rúcula (*Eruca sativa*) a doses crescentes de água residuária da mandioca em comparação à adubação mineral. 2015. 55 p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Agrícola de Jundiá, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2015.
- CANÁRIO, T. F.; DOS SANTOS, J. M. A. P.; COSTA, J. E.; SILVA, G. G. C. da. Projetos Integradores De Conhecimentos Como Instrumentos De Avaliação E Desenvolvimento De Habilidades Acadêmicas Voltadas Ao Ensino Agroecológico. 2014. Disponível em: <https://drive.google.com/drive/search?q=HORTA%20AGROECOL%C3%93GICA>. Acesso em: 01 jun. 2025.
- CARNEIRO, J. J. Sistemas Agroecológicos de produção conservam solo e água. 2013. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- DOS SANTOS, C. A. Experiências em Agroecologia. 1. ed. Maringá-PR: Uniedusul Editora, 2020. v. 1. 161p. Disponível em: <https://www.uniedusul.com.br>. Acesso em: 22 jul. 2025.
- FERREIRA, R. F. de A. e L. Efeitos da aplicação de manipueira nos atributos de um solo e na produção de alface *Lactuca sativa* L. 2012. 34 f.: il. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- FREIRE, M. M. Resposta de plantas de rúcula (*Eruca sativa* Miller) a doses crescentes de carvão vegetal e manipueira. 2016. 45 p. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônoma) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2016.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (Ed.). Biochar for environmental management: science and technology. London: Earthscan, 2009.
- RAMOS, R. S. et al. Avaliação dos atributos do solo submetidos a diferentes usos e manejos do solo no semiárido paraibano. RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218, v. 4, n. 2, e422769-e422769, 2023.
- SILVA, D. G. O.; DE FÁTIMA CARMO, D.; DE LIMA NORONHA, L. Diagnóstico da qualidade dos solos pela cromatografia circular de Pfeiffer em sistema agroflorestal no assentamento Nova Esperança I em São José dos Campos/SP. Cadernos de Agroecologia, v. 19, n. 1, 2024.
- SOARES, A. F. et al. Características químicas do solo sob sistema agroflorestal e floresta primária no município de Pacajá, Pará, Brasil. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, v. 12, n. 6, p. 45-59, 2021.
- VIEIRA, M. S.; MENDONÇA, E. S.; SOUZA, D. M. G. Amostragem de solo para análise química e física. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (org.). Cerrado: correção do solo e adubação. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 19-35, 2004.

CÓDIGO: SB1505

AUTOR: GABRIEL ESTEVAM FREITAS

ORIENTADOR: SERGIO MAIA QUEIROZ LIMA

TÍTULO: Diferenciação de nicho em peixes rivulídeos não-anuais do gênero *Anablepsoides* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) nos biomas Cerrado e Caatinga

Resumo

A família Rivulidae é altamente diversa, possuindo características peculiares, como cores exuberantes, hermafroditismo e alta adaptabilidade em habitats, dividindo-se em espécies anuais, que vivem em ambientes intermitentes, e não anuais, que vivem em ambientes perenes. Tal especificidade de ambiente faz com que muitas espécies estejam ameaçadas. Este estudo teve como objetivo modelar o nicho ecológico de *Anablepsoides cearensis* e *Anablepsoides vieirai*, duas espécies filogeneticamente próximas, mas ecologicamente distintas, para avaliar sua similaridade de nicho atual e projetar mudanças sob cenários futuros de clima. Utilizamos o algoritmo MaxEnt para modelagem, com variáveis bioclimáticas e de cobertura vegetal, e avaliamos a sobreposição de nicho por meio do índice D de Schoener e testes de equivalência. Os modelos apresentaram desempenho robusto ($AUC > 0,86$). Os resultados mostram baixa sobreposição de nicho entre as espécies: $D = 0,127$ no cenário atual; $D = 0,116$ no futuro, com diferenças significativas nas variáveis mais influentes: sazonalidade da precipitação para *A. cearensis* e temperatura do trimestre úmido para *A. vieirai*. As projeções futuras sugerem contração severa do habitat adequado para *A. cearensis* (~60%), enquanto *A. vieirai* pode exibir maior resiliência. Concluímos que os nichos não são equivalentes e que estratégias de conservação diferenciadas são urgentes, especialmente para *A. cearensis*, criticamente ameaçado.

Palavras-chave: Modelagem de nicho ecológico, Rivulidae, MAXent, conservação

TITLE: Niche differentiation in non-annual rivulid fishes of the genus *Anablepsoides* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in the Cerrado and Caatinga biomes

Abstract

The Rivulidae family is highly diverse, with peculiar characteristics such as vibrant colors, hermaphroditism, and high adaptability to habitats. It is divided into annual species, which live in intermittent environments, and non-annual species, which inhabit perennial environments. This environmental specificity places many species at risk. This study aimed to model the ecological niche of *Anablepsoides cearensis* and *Anablepsoides vieirai*, two phylogenetically close but ecologically distinct species, to assess their current niche similarity and project changes under future climate scenarios. We used the MaxEnt algorithm for modeling, with bioclimatic variables and vegetation cover data, and evaluated niche overlap using Schoener's D index and equivalence tests. The models showed robust performance ($AUC > 0.86$). The results indicate low niche overlap between the species: $D = 0.127$ in the current scenario and $D = 0.116$ in the future, with significant differences in the most influential variables: precipitation seasonality for *A. cearensis* and temperature of the wettest

quarter for *A. vieirai*. Future projections suggest a severe contraction of suitable habitat for *A. cearensis* (~60%), while *A. vieirai* may exhibit greater resilience. We conclude that the niches are not equivalent and that differentiated conservation strategies are urgently needed, especially for *A. cearensis*, which is critically endangered.

Keywords: Ecological Niche Modelation, Rivulidae, MAXent, conservation

Introdução

A família Rivulidae é um grupo com alta diversidade, sendo a quarta maior família de peixes que ocorre em água doce na região neotropical (Ciolete et al, 2018), contando com 27 gêneros e 240 espécies. As espécies dentro dessa família apresentam características peculiares, como o dimorfismo sexual marcado por cores exuberantes e hermafroditismo (Costa, 1998). Sendo destaque, a alta especificidade de habitat a diferentes ambientes, em ambientes que vão do norte da Argentina, até ilhas localizadas na América Central (Tarso et al 2018). Com alta adaptabilidade e variabilidade de nichos, os rivulídeos podem ser classificados peixes anuais, que são adaptados a mudanças de corpos hídricos sazonais, e peixes não-anuais, que vivem em ambientes perenes de baixa profundidade (Silva, 2024). O alto endemismo e especificidade de habitats desses peixes tornam a família vulnerável a mudanças climáticas e ações antrópicas, sendo os rivulídeos a família com maior número de espécies com algum grau de ameaça, sendo 57 criticamente ameaçadas, 40 em perigo e 38 vulneráveis (ICMBio, 2018). O gênero *Anablepsoides* é caracterizado pelo seu comprimento reduzido, tendo entre 30mm e 60mm, com alta variedade de habitat, se distribuindo em sua maioria na bacia amazônica, no cerrado, na caatinga e na mata atlântica (Silva, 2024), onde as espécies presentes na região do nordeste brasileiro: *A. cearensis*, *A. vieirai*, *A. bahianus* presentes na caatinga e o *A. urophthalmus* presente na Amazônia maranhense estão dentro de um grupo monofilético '*A. urophthalmus*' (Amorim & Costa, 2022) apresentando características de padrão de escamas na cabeça e coloração, com manchas dispostas no flanco do peixe (Silva, 2024). Apesar disso, o *A. cearensis* se encaixou nesse grupo devido às suas características morfológicas semelhantes, já que não fez parte das análises filogenéticas. Mesmo presentes no nordeste o *Anablepsoides cearensis* e o *Anablepsoides vieirai*, o habitat é diferente: caatinga e cerrado respectivamente. O *A. cearensis* foi descrito em 2009, apresentando características morfológicas similares ao grupo monofilético '*A. urophthalmus*' apresentando manchas no flanco de coloração avermelhada nos machos, evidenciando a característica de dimorfismo sexual da família Rivulidae, sendo encontrado no estado do Ceará em uma mata úmida residual na caatinga (Costa & Vono, 2009). Essa espécie se destaca por ser a única espécie não-anual do semiárido, e devido sua diminuta distribuição em ambientes restritos, a espécie está classificada como 'criticamente em perigo' (Silva, 2024; ICMBio, 2018). O *A. vieirai*, foi descrito em 2016, com características que se diferenciam dos outros exemplares do grupo '*A. urophthalmus*' com a presença de pontos escurecidos na cabeça e na região opercular, porém com coloração avermelhada e azulada nos machos, sendo encontrado ao leste da região amazônica no rio Itapecuru no estado do Maranhão (Nielsen, 2016). Sendo uma espécie recente, o *A. vieirai* não apresenta status de conservação definido. A Modelagem de Nicho Ecológica ou MNE é uma ferramenta que combina aspectos ambientais com ocorrências de determinada espécie, que combinados fazem um modelo estatístico preditivo que determina a adequabilidade de habitat, visto que a MNE trabalha com a hipótese de que, sobrevivendo nesta localização, com tais condições, em outra localidade e com condições iguais ou parecidas, a mesma espécie pode igualmente ser encontrada (Santana, 2009). Com isso, foram retirados dados presentes em materiais de apoio da Coleção Ictiológica da UFRN para o *A. cearensis* e por meio de levantamento bibliográfico

da espécie *A. Vieirai*. Com a projeção de modelos visa avaliar a similaridade de nicho entre essas duas espécies verificando sobreposição e co-ocorrência desses animais, para compreender a diferença de nicho de cada espécie e projetar a dinâmica no futuro dos habitats, visando a adequação das espécies frente às mudanças climáticas.

Metodologia

Para a primeira etapa do projeto, foram coletadas as localidades de *Anablepsoides cearensis* e *Anablepsoides vieirai*. Os dados de *A. cearensis* foram obtidos a partir de materiais tombados na Coleção Ictiológica da UFRN (CIUFRN), incluindo dados recebidos do ICMBio e materiais de consultoria ambiental, totalizando 11 registros. Para *A. vieirai*, os dados provieram de materiais auxiliares da CIUFRN, complementados por levantamento bibliográfico e exemplares das coleções da Unicamp (ZUEC) e do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CICCA), totalizando 25 registros todos na área apresentada na figura 1. Após a compilação, as ocorrências foram filtradas 'R' para eliminar redundâncias e registros com coordenadas incompletas ou duplicadas, garantindo uma única ocorrência por pixel de resolução das variáveis ambientais (1 km²). A modelagem de nicho ecológico (MNE) foi realizada no software R versão 4.3.1, utilizando os pacotes *dismo* e *ENMeval*. O algoritmo de Máxima Entropia (MaxEnt) foi escolhido por sua eficiência com pequenos tamanhos amostrais (Phillips et al., 2006). As variáveis ambientais inicialmente consideradas incluíram 19 variáveis bioclimáticas e uma de elevação, obtidas do WorldClim (<https://www.worldclim.org>), além de variáveis de carbono do solo e cobertura vegetal obtidas do MapBiomas (<https://plataforma.brasil.mapbiomas.org>) para a série histórica mais recente. Para evitar multicolinearidade, quatro métodos de seleção de variáveis foram aplicados: (1) Fator de Inflação de Variância (VIF) Step com limiar de 0,3, que selecionou 8 variáveis (BIO2, BIO4, BIO8, BIO13, BIO15, BIO18, cobertura vegetal e elevação); (2) VIF Cor com limiar de 0,7, que selecionou 9 variáveis (BIO2, BIO4, BIO5, BIO8, BIO13, BIO15, BIO18, cobertura vegetal e elevação); (3) Análise de Componentes Principais (PCA) entre variáveis, que selecionou 3 variáveis (BIO15, carbono no solo e cobertura vegetal); e (4) PCA entre valores extraídos, que selecionou 5 variáveis (BIO4, BIO18, carbono no solo, cobertura vegetal e elevação). As variáveis presentes em todos os métodos ou na maioria deles foram retidas para a modelagem final, resultando na seleção de BIO4 (sazonalidade da temperatura), BIO8 (temperatura média do trimestre mais úmido), BIO15 (sazonalidade da precipitação) e cobertura vegetal. Para projeções futuras, o mesmo protocolo foi repetido, mas excluindo-se as variáveis de solo e cobertura vegetal (devido à incerteza em suas projeções), utilizando apenas as variáveis bioclimáticas. Foram selecionadas BIO3 (sazonalidade da temperatura), BIO4, BIO8 e BIO15. Os dados futuros foram obtidos do WorldClim para o cenário SSP 4.5 (caminho socioeconômico intermediário) para o período 2040-2060, do modelo MIROC6. A avaliação dos modelos foi feita com validação cruzada (k-fold com 5 partições) e as métricas TSS (True Skill Statistic) e AUC (Area Under the Curve - ROC). A similaridade de nicho foi quantificada pelo índice D de Schoener (1968) e pelo índice I de Warren, utilizando o pacote *phyloclim* em R. Testes de equivalência e similaridade de nicho (Warren et al., 2008) foram realizados com 1000 replicações de bootstrap para determinar a significância estatística.

Resultados e Discussões

Os modelos de nicho ecológico para ambas as espécies demonstraram desempenho estatístico robusto e confiável. Para *Anablepsoides cearensis*, mostrado na figura 2 os valores de AUC (Area Under the Curve) variaram entre 0,892 e 0,899, com o melhor modelo (PA3_RUN15) alcançando um AUC de 0,899 e um TSS (True Skill Statistic) de 0,796. Este valor de TSS, considerado "bom" a "excelente" de acordo com a literatura (valores > 0,7 indicam boa capacidade preditiva), é notável, dado o pequeno número de ocorrências (n=11), demonstrando que o modelo não sofreu severamente com o overfitting. A sensibilidade perfeita (100%) em todos os modelos para esta espécie confirma sua capacidade de identificar corretamente as áreas de presença conhecida. Para *Anablepsoides vieirai*, mostrado na figura 3, o desempenho foi igualmente sólido, com valores de AUC variando de 0,866 a 0,923. O modelo ótimo (PA2_RUN72) obteve um AUC ótimo de 0,923 e um TSS de 0,760, também indicando alta confiabilidade preditiva. A sensibilidade foi consistentemente alta (93,75% a 100%). A especificidade, que variou de 63,96% a 75,38% para as duas espécies, indica uma tendência moderada dos modelos de superestimar um pouco a área de distribuição potencial, um fenômeno comum em algoritmos de MNE, mas que não compromete a validade das conclusões sobre sobreposição e adequabilidade relativa.

A análise das variáveis preditoras revelou diferenças ecológicas fundamentais entre as espécies. Para *A. cearensis*, a variável mais influente foi BIO15 (sazonalidade da precipitação), contribuindo com aproximadamente 45% para o modelo. Isto está perfeitamente alinhado com a ecologia conhecida da espécie, restrita a riachos perenes com pouca água e ambientes sazonais da Caatinga, em que a imprevisibilidade das chuvas é um fator ecológico primordial. Esta especialização em ambientes hiper-sazonais, embora seja uma adaptação impressionante, representa uma "aposta evolutiva" de alto risco, tornando a espécie extremamente vulnerável a qualquer alteração no já errático regime de chuvas. A Cobertura Vegetal foi a segunda variável mais importante (~30%), destacando a dependência da espécie por microhabitats ripários sombreados e preservados para proteção e desova. Esta dupla dependência (precipitação sazonal e vegetação preservada) cria um cenário de dupla ameaça, em que tanto as mudanças climáticas quanto o desmatamento podem levar a espécie à extinção.

Para *A. vieirai*, o padrão foi marcadamente diferente. A variável BIO8 (Temperatura Média do Trimestre mais Úmido) foi a mais determinante, com contribuição de ~35%, seguida por BIO4 (Sazonalidade da Temperatura) com ~25%. Isto sugere que a espécie está mais associada à estabilidade térmica e à umidade constante característica de riachos perenes em regiões de Cerrado e transição Amazônica, sendo menos tolerante a grandes flutuações sazonais do que *A. cearensis*. Sua resiliência projetada pode ser explicada por esta associação a ambientes com maior buffer contra variações climáticas, como matas ciliares mais densas e aquíferos mais estáveis, típicos de sua área de ocorrência. No entanto, sua dependência de temperaturas específicas no trimestre úmido a torna sensível a ondas de calor e alterações no timing das estações.

A quantificação da sobreposição de nicho no cenário atual, utilizando o índice D de Schoener, revelou um valor de $D = 0,1268$. Este valor, considerado "baixo" ($0 < D < 0,2$) na escala de Schoener, indica que as espécies compartilham apenas ~12,7% de seus nichos ecológicos fundamentais. Esta baixa sobreposição, apesar da proximidade filogenética, é um claro exemplo de divergência de nicho, em que espécies irmãs ocupam habitats dramaticamente distintos para reduzir competição ou explorar oportunidades ecológicas únicas. Crucialmente, o teste de equivalência de nicho (Warren et al., 2008) confirmou que esta baixa sobreposição é estatisticamente significativa. O resultado não significativo ($p =$

0,2887) permite rejeitar a hipótese de que os nichos das espécies são equivalentes. Em outras palavras, as diferenças observadas no nicho são maiores do que seria esperado por acaso, indicando que *A. cearensis* e *A. vieirai* ocupam nichos ecológicos distintos e não intercambiáveis. Este resultado refuta a ideia de que a anualidade define um nicho homogêneo e ressalta a importância de se considerar fatores abióticos específicos (como sazonalidade da precipitação vs. temperatura) na ecologia desses peixes.

Sob o cenário climático futuro SSP 4.5 (2040-2060), os modelos projetam mudanças profundas e assimétricas na distribuição potencial de ambas as espécies. *Anablepsoides cearensis* (figura 2) sofrerá uma contração severa de ~60% de sua área de habitat climaticamente adequada. Esta projeção é alarmante e sugere um elevado risco de extinção, confirmando e agravando sua classificação como "Criticamente em Perigo". Esta drástica redução acentua seu status de conservação já crítico, levando o peixe a refúgios microclimáticos cada vez menores e mais isolados dentro da Caatinga. A perda está intimamente ligada ao aumento projetado na sazonalidade e imprevisibilidade da precipitação (BIO15), ultrapassando os limites de tolerância da espécie. A perda de habitat adequado não é linear; ela pode levar a um colapso populacional devido à fragmentação, que isola pequenos grupos, reduz o fluxo gênico e aumenta a endogamia e a vulnerabilidade a eventos estocásticos.

Anablepsoides vieirai (figura 3) exibiu maior resiliência, mas ainda assim enfrentará uma redução considerável de ~25% em seu habitat adequado. Os modelos ainda projetam um deslocamento latitudinal e longitudinal da distribuição, sugerindo que a espécie poderá precisar migrar para áreas com condições climáticas mais favoráveis no futuro. No entanto, a capacidade de dispersão desses animais entre bacias hidrográficas é limitada. A viabilidade dessa migração projetada dependerá criticamente da permeabilidade da paisagem e da existência de corredores ecológicos aquáticos contínuos.

A sobreposição de nicho projetada para o futuro diminui ainda mais, para $D = 0,1160$. O teste de similaridade para o cenário futuro também não foi significativo ($p > 0,05$), indicando que as mudanças climáticas não promoverão uma convergência dos nichos, mas sim acentuarão sua divergência atual. Este resultado é crucial, pois demonstra que as pressões seletivas atuarão de forma independente sobre cada espécie. Estratégias de conservação "genéricas" para rivulídeos seriam, portanto, ineficazes. As ações devem ser tão específicas quanto os nichos que essas espécies ocupam. Este resultado reforça que as pressões seletivas e os riscos climáticos serão específicos para cada espécie, demandando estratégias de conservação igualmente específicas.

Nossos resultados quantitativos confirmam a hipótese inicial de que *A. cearensis* e *A. vieirai*, embora filogeneticamente próximas, ocupam nichos ecológicos drasticamente distintos ($D = 0,127$; $I = 0,341$). Esta baixa sobreposição não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$), indicando que as diferenças observadas são reais e refletem adaptações a pressões ambientais fundamentalmente diferentes. Para *A. cearensis*, a sazonalidade da precipitação é o fator dominante, moldando sua existência em poças temporárias da Caatinga. Em contraste, *A. vieirai* é primariamente influenciada pela temperatura estável de riachos perenes em regiões de Cerrado/Amazônia. Esta divergência de nicho é um claro exemplo de como a anualidade, uma estratégia de vida compartilhada, pode ser moldada por regimes ambientais contrastantes, levando a trajetórias evolutivas distintas, conforme observado em outros estudos com rivulídeos (Costa, 1998; 2009).

A não-equivalência de nicho tem implicações profundas para a conservação. Ela significa que as espécies não são ecologicamente intercambiáveis. Habitats adequados para *A. cearensis* são inóspitos para *A. vieirai*, e vice-versa. Portanto, estratégias de conservação genéricas para 'rivulídeos anuais' são insuficientes. Medidas devem ser específicas para cada espécie, focadas nas variáveis ambientais críticas para cada uma: preservação do regime hidrológico e da vegetação ripária para *A. cearensis*, e manutenção da integridade e estabilidade térmica dos riachos para *A. vieirai*, seguindo as diretrizes propostas no Livro Vermelho da Fauna Brasileira (ICMBio, 2018).

A projeção de uma ainda menor sobreposição de nicho no futuro ($D = 0,116$) é alarmante. Isto não indica que as espécies estarão mais seguras, mas sim que as mudanças climáticas vão aumentar suas vulnerabilidades específicas de maneira isolada. O clima futuro da Caatinga pode se tornar ainda mais imprevisível, superando os limites de tolerância de *A. cearensis*. Paralelamente, o aquecimento global pode desestabilizar termicamente os habitats de *A. vieirai*, forçando-a a deslocamentos latitudinais. As pressões seletivas atuarão de forma independente em cada linhagem, potencialmente ampliando a distância ecológica entre elas, um padrão similar ao documentado para outros táxons aquáticos neotropicais (Santana et al., 2009).

A baixa sobreposição de nicho explica por que essas espécies não co-ocorrem geograficamente, apesar de sua proximidade filogenética. Suas adaptações a diferentes biomas (Caatinga vs. Cerrado/Amazônia) as segregaram espacialmente, reduzindo ou eliminando a competição direta por recursos. Este padrão de segregação espacial mediada por divergência de nicho é consistente com os mecanismos de especiação ecológica documentados em peixes anuais de ambientes sazonais (Costa, 1998; Costa & Vono, 2009).

Conclusão

Este estudo demonstrou que *Anablepsoides cearensis* e *Anablepsoides vieirai*, embora compartilhem a estratégia de vida anual, ocupam nichos ecológicos fundamentalmente distintos, com baixa sobreposição atual ($D = 0,127$) e projetada ($D = 0,116$). Essa divergência é impulsionada por adaptações a diferentes regimes ambientais: *A. cearensis* é especialista em ambientes marcados por alta sazonalidade de precipitação, enquanto *A. vieirai* depende criticamente de estabilidade térmica. As projeções futuras indicam que as mudanças climáticas aumentarão drasticamente os riscos de conservação para *A. cearensis*, podendo levar a uma perda de ~60% de seu habitat já restrito e fragmentado. Para *A. vieirai*, embora mais resiliente, a perda de ~25% da área adequada e a necessidade de deslocamento representam ameaças significativas. Estes resultados demandam ações de conservação urgentes e específicas: Para *A. cearensis* (CR), deve ser imediata a proteção dos micro-refúgios identificados, restauração de matas ciliares e consideração de programas de translocação assistida e criação em cativeiro. Para *A. vieirai* (ainda não avaliada), é necessário a descrição de sua situação de risco, monitoramento populacional contínuo e a integração de suas áreas de ocorrência atual e projetada em corredores ecológicos e unidades de conservação. Conclui-se que a condição de anualidade não confere homogeneidade de respostas ecológicas ou vulnerabilidades às mudanças climáticas. Estratégias de conservação para rivulídeos anuais devem, portanto, ser específicas, baseadas em modelagens robustas de nicho que capturem suas particularidades ecofisiológicas e geográficas. Estudos futuros devem investigar a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética destas espécies para melhor prever sua capacidade de adaptação às mudanças em curso.

Referências

Costa, W. J. E. M. (1998). Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). *Journal of Comparative Biology*, 3, 33-92. Costa, W. J. E. M. & Vono, V. (2009). *Rivulus cearensis*, a new aplocheiloid killifish from northeastern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 20(1), 7-11. ICMBio. (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI – Peixes. Brasília: ICMBio. Phillips, S. J., Anderson, R. P., & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190(3-4), 231-259. Santana, F. S. (2009). Uma infraestrutura orientada a serviços para a modelagem de nicho ecológico (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo. Schoener, T. W. (1968). The *Anolis* lizards of Bimini: resource partitioning in a complex fauna. *Ecology*, 49(4), 704-726. SILVA, Salu Coêlho da. Distribuição geográfica e respostas às mudanças climáticas no peixe rivulídeo *Anablepsoides cearensis* (Costa & Vono, 2009): uma abordagem integrativa entre Conservação Filogenética de Nicho (CFN) e Modelos de Nicho Ecológico (MNE). 2024. Dissertação (Mestrado em ...) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2024. CIOLETE, Tarso N.; VASCONCELLOS, Angélica da S.; REZENDE, Juliana de L. P. Estado de conservação dos rivulídeos (Teleostei) no estado de Minas Gerais – Revisão de literatura. *Sinapse Múltipla*, v. 7, n. 1, p. 8-26, jul. 2018. Warren, D. L., Glor, R. E., & Turelli, M. (2008). Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*, 62(11), 2868-2883.

Anexos

Figura 1: Distribuição do *Anablepsoides vieirai* e *Anablepsoides cearensis*.

Figura 2: Mapas de adequabilidade para *Anablepsoides cearensis*. A) é a projeção atual e B) é a projeção futura.

Figura 3: Mapas de adequabilidade para *Anablepsoides vieirai*. A) é a projeção atual e B) é a projeção futura.

CÓDIGO: SB1510

AUTOR: LUCAS VINICIUS SOUZA DE CARVALHO

ORIENTADOR: AURIGENA ANTUNES DE ARAUJO

TÍTULO: Avaliação Biológica da FORMULAÇÃO DE PACTH (ADESIVO TRANSDERMICO) DE QUITOSANA INCORPORANDO A METFORMINA PARA CONTROLE DO DIABETES TIPO II

Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica de alta prevalência, sendo a metformina o fármaco de primeira linha no seu tratamento. No entanto, sua administração oral apresenta limitações relacionadas à biodisponibilidade e efeitos adversos, já que, na maioria dos casos, doses elevadas são necessárias, comprometendo também a adesão ao tratamento. Neste contexto, sistemas de liberação transdérmica representam uma alternativa promissora para aumentar a eficácia terapêutica e melhorar a adesão. Neste projeto, foi definida a utilização do sorbitol como plastificante mais adequado para a formação de membranas contendo nanopartículas de quitosana incorporadas com metformina, ao passo que se identificou o desafio da cristalização do fármaco na matriz polimérica. Os adesivos transdérmicos irão ser testados em ratos Wistar com DM2 induzido experimentalmente. Além disso, considerando que alterações metabólicas decorrentes do DM2 podem impactar a microbiota intestinal, validou-se o processo de extração de gDNA a partir das fezes de animais, processo essencial para futuros estudos de sequenciamento genético. Assim, o estudo em desenvolvimento, estabeleceu a indução experimental do DM2 em ratos wistar, caracterizou, em parte, o adesivo transdérmico à base de quitosana incorporado com metformina, bem como estabeleceu método experimental para extração de gDNA .

Palavras-chave: Palavras-chave: DM2; Metformina; Quitosana; Adesivo Transdérmico.

TITLE: Biological Evaluation of a Chitosan-Based PATCH (Transdermal Adhesive) Formulation Incorporating Metformin for Type II Diabetes Control

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a highly prevalent metabolic disease, with metformin being the first-line pharmacological treatment. However, its oral administration presents limitations related to bioavailability and adverse effects, since, in most cases, high doses are required, which also compromises treatment adherence. In this context, transdermal delivery systems represent a promising alternative to enhance therapeutic efficacy and improve adherence. In this project, sorbitol was defined as the most suitable plasticizer for the formation of membranes containing chitosan nanoparticles loaded with metformin, while the challenge of drug crystallization within the polymeric matrix was identified. The transdermal patches will be tested on Wistar rats with experimentally induced T2DM. Furthermore, considering that metabolic alterations resulting from T2DM can impact the gut microbiota,

the gDNA extraction process from animal feces was validated, an essential process for future genetic sequencing studies. Thus, the ongoing study has established the experimental induction of T2DM in Wistar rats, partially characterized the metformin-incorporated chitosan-based transdermal patch, as well as established an experimental method for gDNA extraction.

Keywords: Key-Words: DM2; Metformin; Chitosan; Transdermal patch.

Introdução

A metformina é uma biguanida utilizada como tratamento de primeira escolha para o diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (Malta et al., 2020). É derivado da planta *Galega officinalis* (lilás francês), planta tradicionalmente utilizada na Europa como medicamento para tratar o diabetes (Fujita; Inagaki, 2017). Esse fármaco tornou-se a primeira escolha para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 devido à sua notável capacidade de diminuir os níveis de glicose plasmática (Blonde; Dipp; Cadena, 2018). A principal vantagem da Metformina é a sua capacidade de reduzir as concentrações de glicose no sangue, a longo prazo, apresentando melhorias na sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos sem o risco de hipoglicemia (Horakova et al., 2019).

A metformina convencional apresentam perfil de liberação imediata após a ingestão por via oral, sua concentração atinge o pico máximo após 2 a 3 horas, dificultando a eficácia clínica sustentada, o que traz a necessidade de doses múltiplas ao longo do dia (geralmente 2–3 vezes), o que pode reduzir a adesão do paciente ao tratamento e aumentar efeitos gastrointestinais (náusea, diarreia). Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada é uma ferramenta essencial para aperfeiçoar o efeito terapêutico, maximizando a biodisponibilidade dos medicamentos e reduzindo os efeitos colaterais (Mourão et al., 2010).

Fármacos de liberação prolongada possuem uma ampla vantagem sobre os fármacos de liberação imediata, incluindo uma maior eficácia devido ao controle na entrega do princípio ativo ao longo do tempo e toxicidade reduzida, já que a dose é liberada por período de tempo maior, prolongando o tempo de ação do princípio ativo no organismo sem ocasionar picos de concentrações elevadas (Kamaly et al., 2016). Além disso, a liberação controlada do fármaco pode otimizar a resposta farmacológica e evitar sub ou superdosagem, prevenindo reações adversas e prolongando o tempo de ação do princípio ativo (Silva-caldeira et al., 2019). Esses sistemas controlados mantêm os níveis plasmáticos do medicamento constante, mantendo a curva de concentração controlada.

Nesse contexto, a incorporação de estratégias nanotecnológicas tem levado a avanços significativos no setor farmacêutico. A encapsulação de princípios ativos surge como uma metodologia importante para contornar desafios intrínsecos à formulação (Liu et al., 2024). Nanofármacos são constituídos de partículas de tamanho nanométricos, que apresentam uma grande área de superfície com maior carga ou dosagem por unidade de volume ou massa e proporcionam uma melhor biodisponibilidade do princípio ativo (Deng et al., 2019). As consequências deste tipo de formulação são: respostas terapêuticas desejadas com dose muito mais baixa em relação a formulações convencionais, com efeitos adversos reduzidos e prolongamento do intervalo entre as doses.

O desenvolvimento de nanofármacos a partir de princípios ativos já estabelecidos no mercado farmacêutico, busca a modulação de parâmetros farmacocinéticos para melhorar a biodisponibilidade e meia-vida farmacológica (Apolinário et al., 2020).

Os principais nanossistemas utilizados para desenvolvimento de nanofármacos utilizam nanopartículas poliméricas como: quitosana, lipossomas, ciclodextrinas e dendrímeros. As nanopartículas poliméricas apresentam diâmetro entre 1 e 1000 nm. Mudanças químicas na superfície das partículas podem vetorizá-las a um local de liberação específico ou modificar sua toxicidade (Singh et al., 2022).

Nessa perspectiva, o projeto objetiva propor a formulação de um adesivo transdérmico utilizando o polímero quitosana incorporando com metformina para controle do DM2 em ratos wistar. Esta formulação será caracterizada quanto às suas características físico-químicas e atividade biológica em modelo experimental de DM2 in vivo utilizando ratos Wistar divididos randomicamente em grupos controles e experimentais.

Metodologia

Diâmetro de partícula e índice de polidispersão

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas foram determinados por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) utilizando ZetaSizer NanoZS, sob as seguintes condições experimentais: temperatura de 25 ± 2 °C, comprimento de onda de 633 nm e um ângulo de detecção de 173° (retroespalhamento). Previamente às análises, as amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:10 (v/v). As medições foram realizadas em triplicata, e os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (dp).

Caracterização física e morfológica das membranas

A avaliação macroscópica consistiu em inspeção visual e tátil. Foram analisados parâmetros como flexibilidade (classificada como rígida, maleável ou quebradiça mediante dobragem manual), aderência e aspecto superficial (presença de exsudação de plastificante, manchas esbranquiçadas ou textura gelatinosa).

Complementarmente, a análise da microestrutura foi realizada por microscopia óptica (aumento de 40x). Para avaliação da estabilidade física, imagens de um mesmo campo foram obtidas imediatamente após o preparo (T_0) e após 72 horas. As imagens foram analisadas qualitativamente para identificar sinais de instabilidade, como cristalização de fármaco ou plastificante, separação de fases ou formação de fissuras e bolhas.

Validação do processo de extração de gDNA

A extração de gDNA foi realizada utilizando o QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen), utilizando 250mg de fezes a extração foi feita em triplicata. A quantificação de DNA foi realizada por nanodrop (ThermoFisher) e posteriormente em fluorômetro (Invitrogen Qubit Fluorometer) com auxílio do Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher). Posteriormente o gDNA foi analisado quanto a sua integridade por eletroforese, foi utilizado gel de agarose (0,8%) corado com Sybr Safe DNA Gel 10.000X (ThermoFisher). As amostras foram preparadas utilizando 5uL de DNA (200ng), 4 uL de água DNase free e 2uL de 6× TriTrack DNA Loading Dye (ThermoFisher). O marcador de peso molecular usado foi GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher).

Modelo experimental in vivo

Os experimentos serão realizados em ratos Wistar, machos (180-220 g) alojados em condições padrão (12 horas de claro / escuro, $22 \pm 0,1$ ° C), com acesso ad libitum a comida e água. Todos os protocolos de utilização dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com número de protocolo 035/2023. Os animais serão divididos em grupos controle e experimentais. A DM2 será induzida por dieta cafeteira (hiperglicêmica e hiperlipídica) associada a Estreptozotocina (STZ) 35 mg/kg via intraperitoneal. Serão realizadas medidas antropométricas, verificação de glicemia capilar, e teste de tolerância a insulina(TTT), no qual a glicose será aferida no tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 30 e até 60 minutos após a administração de insulina com o objetivo de confirmar a intolerância à insulina, critério de exclusão do modelo.

Após o período experimental, os animais serão eutanasiados. Nela será realizada coleta de sangue para dosar: glicose, hemoglobina glicada, ureia, creatinina, TGO, TGP, triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL.

Ademais serão coletados órgãos tais como: pâncreas, rins, fígado, coração, pulmão, intestino delgado, cólon para estudos histopatológicos. Haverá coleta de fezes para posterior sequenciamento da microbiota. Todos os grupos serão eutanasiados no 81º dia de experimento. Os grupos serão divididos da seguinte forma:

Controle negativo (sem tratamento): 50 dias de ração padrão, realizar TTT no 50º dia. Ração padrão mantida por mais 30 dias. N= 8

Controle positivo, ração cafeteira + STZ (Sem tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira mantida por mais 30 dias. N= 8

STZ sozinho (Sem tratamento): 42 dias de ração padrão, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração padrão mantida por mais 30 dias. N= 5

Dieta cafeteira sozinho (Sem tratamento): 50 dias de ração cafeteira, realizar TTT no 50º dia. Ração cafeteira mantida por mais 30 dias. N= 5

Ração cafeteira + STZ (Sem tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira será trocada pela ração padrão pelos próximos 30 dias. N= 8

Ração cafeteira + STZ (Com tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira mantida por mais 30 dias e aplicação de solução oral de metformina por gavagem. N= 10

Ração cafeteira + STZ (Com tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira será trocada pela ração padrão pelos próximos 30 dias e aplicação de solução oral de metformina por gavagem. N= 10

Ração cafeteira + STZ (Com tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira mantida por mais 30 dias e aplicação de metformina padrão por gavagem. N= 8

Ração cafeteira + STZ (Com tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira será trocada pela ração padrão pelos próximos 30 dias e aplicação de metformina padrão por gavagem. N= 8

Ração cafeteira + STZ (Com tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira será mantida por mais 30 dias e aplicação do adesivo transdérmico de metformina. N= 10

Ração cafeteira + STZ (Com tratamento): 42 dias de ração cafeteira, será aplicado o STZ e após 8 dias será realizada a confirmação através do TTT. Ração cafeteira será trocada pela ração padrão pelos próximos 30 dias e aplicação do adesivo transdérmico de metformina. N= 10

Resultados e Discussões

Caracterização de nanopartículas de quitosana

Conforme visto na tabela 1 para a quitosana de médio peso molecular (MPM), a nanopartícula branca (NPB) apresentou um tamanho médio de $116,4 \pm 2,04$ nm e um Índice de Polidispersão (PDI) de $0,403 \pm 0,028$. Com a incorporação de metformina (0,7 mg/mL), formando a Nanopartícula com incorporação de metformina (NPMET), houve um aumento no diâmetro hidrodinâmico para $127,6 \pm 1,96$ nm, enquanto o PDI manteve-se estável em $0,408 \pm 0,025$. Este incremento no tamanho das nanopartículas de MPM é um provável indicativo de encapsulação bem-sucedida, sugerindo que as moléculas de metformina se alojaram na matriz polimérica. A manutenção do PDI indica que o processo de formação das nanopartículas não afetou a homogeneidade, permanecendo dentro de uma faixa aceitável para sistemas de liberação controlada (Danaei et al., 2018).

Por outro lado, a NPB de baixo peso molecular (BPM) apresentou tamanho maior ($157,4 \pm 3,02$ nm) e um PDI mais elevado ($0,470 \pm 0,01$) em comparação a MPM, conforme mostra a tabela 2. As cadeias poliméricas mais curtas, provavelmente possuem uma capacidade reduzida de formar nanoestruturas compactas e uniformes, geralmente resultando em moléculas maiores e hetero dispersas (Yan et al. 2022). Contudo, a adição de metformina (NPMET) promoveu uma redução no tamanho para $132,5 \pm 1,29$ nm e diminuição do PDI para $0,416 \pm 0,02$.

Os resultados do estudo de concentração de metformina (Tabela 3) mostram que, à medida que a concentração de metformina aumentou de 0 mg/mL (Amostra A) para 1,5 mg/mL (Amostra C), observou-se uma redução no tamanho das NPs (de 146,03 nm para 100,18 nm) e uma melhoria na polidispersidade, com o PDI decrescendo de 0,491 para 0,349. O mesmo fenômeno ocorreu com a amostra B (de 146,03 nm para 97,5nm), porém a mudança no PDI foi menos expressiva (de 0,491 para 0,416). A Amostra C, portanto, produziu as nanopartículas mais uniformes. O subsequente aumento para 3,0 mg/mL (Amostra D) resultou em um certo aumento no tamanho (115,72 nm), possivelmente indicando que a capacidade de carga da nanopartícula foi atingida ou ultrapassada. O pH ácido (~4.0) de todas as formulações se manteve adequado para a estabilidade do sistema, garantindo a protonação da quitosana e sua solubilidade (Danaei et al., 2018).

Desenvolvimento e Análise de Membranas de Quitosana

Como mostra o Quadro 1, a glicerina (nas concentrações de 10% e 20%) combinada com propilenoglicol resultou em membranas quebradiças e gelatinosas, caracterizando separação de fases. O sorbitol a 10% destacou-se como o plastificante mais eficaz, conferindo às membranas características de maleabilidade e aderência tanto para a formulação branca quanto para a contendo metformina 1%. A eficácia superior do sorbitol parece ter relação com a sua estrutura molecular com múltiplos grupos hidroxila, que interagem de forma mais forte e estável com as cadeias de quitosana, criando uma rede plastificada homogênea e resistente à migração. (Sinaga et al., 2021).

Como demonstrado nas figuras 4-7, às membranas tornam-se esbranquiçadas após 72h em todas as diferentes concentrações de metformina adotadas. A microscopia torna evidente a formação de cristais na matriz polimérica, o que explica a mudança de cor. Esse fator é um problema para a formulação e afetaria a biodisponibilidade do fármaco, do qual pode ter relação com incompatibilidade ou problemas na solubilidade. Uma possível solução para o problema seria realizar a complexação do fármaco com ciclodextrinas para melhorar a solubilidade (Campos; Mei; Santos Jr, 2015; Roselet; Premakumari, 2015)

As Figuras 8-15, avaliaram a opacidade da membrana. A opacidade em filmes poliméricos está associada à presença de domínios cristalinos ou agregados que dispersam a luz. Logo, a incorporação de um fármaco pode intensificar a opacidade, seja pela presença de partículas não dissolvidas do princípio ativo, seja pela indução de cristalização na matriz polimérica. Os resultados visuais e microscópicos obtidos sugerem que a metformina não se encontra completamente solubilizada na matriz de quitosana, formando agregados que conferem opacidade ao filme (Shi et al., 2024).

Validação do processo de extração de gDNA

Em seguimento ao processo de extração com o QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen), foram obtidos aproximadamente 75 uL de solução contendo gDNA para cada uma das três amostras de fezes utilizadas, sendo elas: Amostra A, Amostra B e Amostra C. Como mostra a tabela 4, no espectrofotômetro de microvolume (Nanodrop ThermoFisher) foram aferidos os valores de: 181,1 ng/uL (amostra A), 512,2 ng/uL (Amostra B) e 292.7 ng/uL (Amostra C). Por conseguinte os valores de A260/A280 foram: 1,84 (Amostra A), 1,88 (Amostra B) e 1,88 (Amostra C). Todos os valores concernentes a esse parâmetro se encontram entre a faixa ideal de 1,7-2, isso denota um bom indicativo de que não há contaminação por proteínas. Por outro lado, os valores de A260/A230 foram: 0,93 (Amostra A), 1,66 (Amostra B) e 1,42 (Amostra C). Para esse parâmetro é ideal que as leituras sejam acima de 1,8 e que caso estejam abaixo, não sejam menores que 1,5, já que valores nessas condições podem indicar baixa pureza para contaminantes orgânicos. Provavelmente o que explica os valores aferidos sejam os resíduos de guanidina deixados pela extração, o que é comum para kits que utilizam coluna (Peredo, 2023).

Por conseguinte, os valores obtidos no fluorômetro (Quibt ThermoFisher), tal qual demonstra a tabela 4, foram: 107 ng/uL (Amostra A), 354 ng/uL (Amostra B) e 181 ng/uL (Amostra C). Esses valores indicam as concentrações puramente do DNA, dessa forma percebe-se que a extração foi bem sucedida no que tange a quantidade de gDNA, sendo assim o kit extrai amostra suficiente para dar prosseguimento ao sequenciamento da microbiota no futuro (Zucherato, 2023).

A figura 16 apresenta a eletroforese das três amostras de gDNA. O marcador de peso molecular usado vai de 100-3000 bp (pares de base). Nota-se que todas as amostras tiveram

sinal mais forte consideravelmente acima da marcação para 3000 pb, indicando que o extraído é realmente DNA genômico, já que o seu peso molecular é de 5000 bp. Quanto à integridade, analisando o resultado percebe-se uma banda não tão íntegra com um pequeno arraste (smear), o que indica integridade parcial da amostra. Apesar do gDNA extraído não estar totalmente íntegro, o pequeno arraste demonstra que as perdas não foram significativas e essa extração pode prosseguir para as próximas etapas. (Matias, 2021)

Novo desenho experimental In vivo

O modelo animal ainda está em fase inicial de desenvolvimento, tendo em vista que o processo por inteiro tem duração de 81 dias. Ainda não há resultados confirmatórios a serem apresentados. Está sendo produzida semanalmente a dieta de cafeteria para nutrição dos animais para indução do DM2. No momento estão em andamento três grupos: um grupo controle negativo saudável sem tratamento (sem DM2) em uso de ração padrão para ratos, um grupo controle positivo em uso de ração cafeiteira associada a STZ (desenvolvimento do DM2 sem tratamento) e um outro grupo em uso de ração cafeiteira associada a STZ (desenvolvimento do DM2 que será tratado) o tratamento será com adesivo transdérmico de quitosana contendo metformina. A tabela 2 mostra a média de dados antropométricos e glicemia dos grupos em fase inicial de desenvolvimento. Os animais para os próximos serão entregues pelo biotério central da UFRN em breve.

Conclusão

Em conclusão, a fabricação de nanopartículas de quitosana associadas a metformina foi alcançada, apresentando bom tamanho e uniformidade adequada, especialmente com a quitosana de baixo peso molecular. Paralelamente, identificou-se o sorbitol como o plastificante ideal para membranas, mas salientou-se o desafio da cristalização do fármaco, que demanda otimizações adicionais da formulação. Estes nanossistemas e filmes poliméricos representam plataformas promissoras para a liberação controlada de metformina. Para além, o processo de extração de gDNA foi validado, permitindo que análises futuras no que tange a microbiota dos animais testados seja feita, dessa forma o presente estudo fará contribuições para além do desenvolvimento da formulação.

Referências

- APOLINÁRIO, A. C. et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais espaço lá embaixo. *Química Nova*, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 212-225, 2020. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/v43n2a12.pdf>. Acesso em: 17 out. 2022.
- BLONDE, L.; DIPP, S.; CADENA, D. Combination glucose-lowering therapy plans in T2DM: case-based considerations. *Advances in Therapy*, [S. l.], v. 35, p. 939-965, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12325-018-0694-0.pdf>. Acesso em: 12 out. 2022.
- CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I.; SANTOS JUNIOR, A. R. Sorbitol-Plasticized and Neutralized Chitosan Membranes as Skin Substitutes. *Materials Research*, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 781-790, ago. 2015. *FapUNIFESP (SciELO)*. <http://dx.doi.org/10.1590/1516-1439.025015>.

CHAMUNDEESWARI, M.; JESLIN, J.; VERMA, M. L. Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, [S. l.], v. 17, p. 849-865, 2019.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARANI, F. Hasanzadeh; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R.. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 57-74, 18 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

DENG, Y. et al. Application of the nano-drug delivery system in treatment of cardiovascular diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [S. l.], v. 7, p. 489, 2019.

FUJITA, Y.; INAGAKI, N. Metformin: new preparation and nonglycemic benefits. *Current Diabetes Reports*, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11892-017-0829-8.pdf>. Acesso em: 12 out. 2022.

HORAKOVA, O. et al. Metformin acutely lowers blood glucose levels by inhibition of intestinal glucose transport. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 6156, Apr. 2019.

KAMALY, N. et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. *Chemical Reviews*, [S. l.], v. 116, n. 4, p. 2602-2663, 2016.

MATIAS, F. (organizadora). *Práticas e Protocolos Básicos de Biologia Molecular*. Editora: Blucher. 1 Ed. São Paulo. 2021.

MOURÃO, S. C. et al. Dissolution parameters for sodium diclofenac-containing hypromellose matrix tablet. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 386, n. 1-2, p.201-207, 2010.

NATARAJAN, J.V. et al. Sustained-release from nanocarriers: a review. *Journal of Controlled Release*, [S. l.], v. 193, p. 122-38, Nov. 2014.

PEREDO, E. L. DNA quantification, Purity and Integrity v1. Protocol Io, [S.L.], v. 1, n. 1, 20 jul. 2023. ZappyLab, Inc.. <http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.81wgbx6pqlpk/v1>.

ROSELET, S. L.; PREMAKUMARI, Dr J. STUDIES ON METFORMIN HYDROCHLORIDE AND ALPHA-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES. *Green Chemistry & Technology Letters*, [S.L.], v. 1, n. 01, p. 48-53, 5 nov. 2015. GIAP Journals. <http://dx.doi.org/10.18510/gctl.2015.117>.

SHI, B.; HAO, Z.; DU, Y.; JIA, M.; XIE, S. Mechanical and barrier properties of chitosan-based composite film as food packaging: a review. *Bioresources*, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 4001-4014, 30 abr. 2024. BioResources. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.19.2.shi>.

SILVA-CALDEIRA, P. P. et al. Liberação controlada do fármaco mebendazol a partir de uma matriz polimérica natural. *Iniciação Científica CESUMAR*, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 37-44, jan./jun. 2019. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/iccesumar/article/view/7389/pdf>. Acesso em: 11 out. 2022.

SINAGA, M. Zulham E.; GEA, S.; ZUHRA, C. F.; SIHOMBING, Y. A.; ZAIDAR, E.; SEBAYANG, F.; NINGSIH, T. U.. The effect of plasticizers and chitosan concentration on the structure and properties of Gracilaria sp.-based thin films for food packaging purpose. Polimery, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 119-126, 17 fev. 2021. LUKASIEWICZ Research Network - Industrial Chemistry Research Institute. <http://dx.doi.org/10.14314/polimery.2021.2.5>.

SINGH, A. P. et al. Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. Signal Transduction and Targeted Therapy, [S. l.], v. 4, n. 33, p. 1-21 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-019-0068-3>. Acesso em: 11 out. 2022.

YAN, X.; LIU, Z.; DIAO, M.; ZHANG, T. Effect of molecular weight of chitosan on properties of chitosan-Zn nanoparticles. Food Bioscience, [S.L.], v. 50, p. 102206, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102206>.

ZUCHERATO, V. S. Aplicação da nanotecnologia portátil de sequenciamento MinION para análise do metagenoma viral. 2023. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Anexos

Tabela 1 - Índice de Polidispersividade e Tamanho Médio das nanopartículas produzidas com quitosana de médio peso molecular. NPB - Nanopartícula Branca; NPMET - Nanopartícula com inclusão de Metformina (0,7mg/mL); PDI - Índice de polidispersão.

Tabela 2 - Índice de Polidispersividade e Tamanho Médio das nanopartículas produzidas com quitosana de baixo peso molecular. NPB - Nanopartícula Branca; NPMET - Nanopartícula com inclusão de Metformina (0,7mg/mL); PDI - Índice de polidispersão.

Tabela 3 - Caracterização das nanopartículas de quitosana, com diferentes concentrações de metformina, após 24h da obtenção. A - Nanopartícula Branca; B - Nanopartícula com inclusão de Metformina (0,7 mg/mL); C - Nanopartícula com inclusão de Metformina (

Tabela 4 - Dados qualitativos e quantitativos das amostras de gDNA extraídas com o QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit

Figura 1 - Gráficos de dispersão de tamanho: formulações com quitosana de médio peso molecular. NPB MED - Nanopartícula Branca; NPMET MED - Nanopartícula Nanopartícula com inclusão de Metformina (0,7mg/mL).

Figura 2 - Gráficos de dispersão de tamanho: formulações com quitosana de baixo peso molecular. NPB BAIX - Nanopartícula Branca; NPMET BAIX - Nanopartícula Nanopartícula com inclusão de Metformina (0,7mg/mL).

Figura 3 - Gráficos de dispersão de tamanho referentes às formulações com diferentes concentrações de metformina. A - Nanopartícula Branca; ; B - Nanopartícula com inclusão de Metformina (0,7 mg/mL); C - Nanopartícula com inclusão de Metformina (1,5 mg/mL)

Quadro 1 - Diferentes agentes plastificantes testados

Quadro 2 - Média das medidas antropométricas e dados de glicemia em grupos de fase inicial

Figura 4 - Membrana branca: 0h e 72h após formulação. Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 5 - Membrana A (1% de metformina): 0h e 72h após formulação. Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 6 - Membrana B (2,5% de metformina): 0h e 72h após formulação. Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 7 - Membrana C (5% de metformina): 0h e 72h após formulação. Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 8 - Opacidade da membrana branca A (0,5% de glicerina e MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 9 - Opacidade da membrana branca B (1% de glicerina e MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 10 - Opacidade da membrana branca C (2% de glicerina e MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 11 - Opacidade da membrana com fármaco A (MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 12 - Opacidade da membrana com fármaco B (MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 13 - Opacidade da membrana com fármaco C (MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 14 - Opacidade da membrana com sorbitol 10% (Branca), (MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 15 - Opacidade da membrana com sorbitol 10% (MET 2,5%). Fotos de microscopia óptica com objetiva 40x.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) das amostras de gDNA extraídas com QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit. Ladder - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; A - Amostra A; B - Amostra B; C - Amostra C.

CÓDIGO: SB1514

AUTOR: ANA LETICIA FERNANDES ALVES

ORIENTADOR: VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do amido da semente de *Artocarpus heterophyllus* sobre comportamentos associados à ansiedade e à atividade locomotora

Resumo

O presente estudo avaliou os efeitos do extrato da semente de *Artocarpus heterophyllus* (jaca) a partir de testes laboratoriais e comportamentais, relacionados à ansiedade e à atividade locomotora, em ratas Wistar. Nesse contexto, o objetivo da pesquisa foi identificar um possível efeito ansiolítico, contribuindo para a investigação de novos compostos com potencial terapêutico. Desse modo, foram utilizadas dez ratas divididas em dois grupos (grupo A - Controle e grupo B - Tratado), submetidas a um tratamento com extrato da semente da jaca, por meio de gavagem oral, pelo período de 14 dias. 24 horas após a última administração, foram realizados testes comportamentais de ansiedade e locomoção, sendo escolhido para análise o teste de campo aberto. Após essa etapa, os animais foram eutanasiados, com auxílio de anestesia, e amostras sanguíneas foram coletadas para avaliações bioquímicas e hematológicas. Sob tal ótica, os dados adquiridos foram expostos à estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão, variância e erro padrão). Em seguida, foram aplicados testes estatísticos de normalidade (Shapiro Wilk), e homogeneidade de variâncias (Levene) e comparações entre os grupos (T-student ou Mann-whitney). Os resultados obtidos, a partir da comparação entre os grupos, não apresentaram diferença estatística significativa para a maioria das variáveis estudadas. Contudo, foi observado uma redução significativa nos níveis séricos de creatinina do grupo B em relação ao grupo A.

Palavras-chave: Amido, Semente, Jaca, Ansiedade, Ratas Wistar, Campo aberto

TITLE: Evaluation of the Effects of *Artocarpus heterophyllus* Seed Starch on Anxiety-Related Behaviors and Locomotor Activity

Abstract

The present study evaluated the effects of *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) seed extract through laboratory and behavioral tests related to anxiety and locomotor activity in Wistar rats. In this context, the aim of the research was to identify a possible anxiolytic effect, contributing to the investigation of new compounds with therapeutic potential. Accordingly, ten female rats were divided into two groups (Group A – Control and Group B – Treated) and subjected to treatment with jackfruit seed extract via oral gavage for a period of 14 days. Twenty-four hours after the last administration, behavioral tests assessing anxiety and locomotion were conducted, with the open field test selected for analysis. Following this stage, the animals were euthanized under anesthesia, and blood samples were collected for biochemical and hematological evaluations. From this perspective, the data obtained were first subjected to descriptive statistics (mean, median, standard deviation, variance, and standard error). Subsequently, statistical tests of normality (Shapiro–Wilk), homogeneity of

variances (Levene), and group comparisons (Student's t-test or Mann–Whitney test) were applied. The results obtained from the comparison between groups did not show statistically significant differences for most of the variables studied. However, a significant reduction in serum creatinine levels was observed in Group B compared to Group A.

Keywords: Starch, Seed, Jackfruit, Anxiety, Wistar rats, Open field

Introdução

Os transtornos de ansiedade possuem grande prevalência no mundo, o que afeta, de forma significativa, a saúde mental da população global. Nesse viés, com a pandemia de COVID-19, essa problemática se intensificou, cada vez mais, resultando em um aumento intrínseco na incidência desses distúrbios. Um estudo publicado na *The Lancet* (2021) estimou que, após a pandemia, houve um aumento de 25,6% nos casos de transtornos de ansiedade em comparação com os níveis pré-pandemia, sendo as mulheres mais afetadas do que os homens. Sob tal ótica, apesar da alta prevalência, o tratamento para transtornos ansiosos é cheio de nuances, diante da expressiva taxa de efeitos adversos apresentada pelos ansiolíticos tradicionais. Dentre eles, os benzodiazepínicos são um exemplo clássico dessa categoria terapêutica, visto que, apresentam várias limitações. Dentre elas, são mais comuns o potencial de abuso, desenvolvimento de tolerância, efeitos sedativos, alterações motoras e cognitivas, além de latência para início do efeito terapêutico (LADER, 1999). Diante dessa temática, é notório que há uma necessidade imediata de buscar novos tratamentos ansiolíticos eficazes com menor risco de reações adversas ou abstinência. Desse modo, estudos indicam que suplementos nutricionais e fitoterápicos têm demonstrado eficácia no tratamento de transtornos de ansiedade, com evidências positivas para o uso de extratos de plantas (LAKHAN; VIEIRA, 2010). Com isso, essa pode ser uma alternativa eficaz para tratar a ansiedade sem riscos colaterais graves, trazendo uma abordagem terapêutica mais segura para essa condição. Nesse cenário, a semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus*) destaca-se como uma fonte promissora de compostos bioativos com alta capacidade antioxidante e propriedades farmacológicas. Ela é composta, principalmente, por amido, que representa entre 60% a 80% de sua composição (DHANI et al., 2025). Paralelo a isso, estudos recentes investigam o perfil farmacológico do amido da semente da jaca, o que evidencia efeitos hipoglicemiantes em modelos animais (AJIBOYE et al., 2020) e possível propriedade sedativa (RATNASOORIYA; JAYAKODY, 2002), o que reforça seu potencial terapêutico e científico. Em suma, considerando a necessidade de investigação de novos compostos com potencial terapêutico ansiolítico e evidências que apontam um possível efeito sedativo do amido da semente da jaca, tornou-se pertinente a realização desse estudo. Dessa forma, foram realizados ensaios experimentais, utilizando modelos animais (ratas Wistar), para compreender os mecanismos de ação e a eficácia desse amido como alternativa terapêutica para transtornos de ansiedade. Nesse viés, o estudo em questão teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato da semente de *Artocarpus heterophyllus* (jaca), de acordo com parâmetros comportamentais, bioquímicas e hematológicas em ratas Wistar, a fim de investigar um possível efeito ansiolítico e seu potencial terapêutico como alternativa aos tratamentos tradicionais para transtornos ansiosos.

Metodologia

2.1 Animais Foram utilizadas dez ratas Wistar (90±10 dias), distribuídas em dois grupos (A - Controle e B - Tratado) e alojadas em caixas de polipropileno (5 por caixa). As ratas foram mantidas em ciclo claro-escuro de 12h, temperatura de 23±1°C e umidade de 70-80%, com

acesso à ração padrão e água à vontade. 2.2 Tratamento Em princípio, foi realizado o cálculo da dose, resultando em 125 mg/Kg com um volume de administração de 1 mL/Kg. As ratas do grupo controle (grupo A) receberam o mesmo volume de solução salina como controle. As ratas tratadas (grupo B) receberam a dose do amido extraído das sementes de jaca, diluída em solução salina. O tratamento foi realizado por meio de gavagem oral e teve duração de 14 dias consecutivos. 2.3 Testes Comportamentais Sendo assim, após o período de 14 dias de administração do extrato, os animais foram condicionados ao teste comportamental de campo aberto, que avalia ansiedade e atividade locomotora por meio da quantificação da locomoção total, entradas no centro e tempo de permanência em regiões centrais e periféricas. Paralelo a isso, esse ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Seibenhener & Wooten (2015), com adaptações. Sendo assim, o teste foi realizado em um quadrado de madeira com piso preto e parede branca sob iluminação de intensidade moderada (luz amarela) e temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Com isso, cada animal foi colocado no centro do aparato e observado por 15 minutos. Após cada sessão, o aparato era limpo com álcool 5%. As sessões foram registradas por gravação em vídeo e analisadas, posteriormente, de forma manual. Considerou-se como parâmetro, possível de análise, a distância percorrida, como também passagens e tempo no centro do aparato. 2.4 Eutanásia e coleta de amostras Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina, e foram realizadas coletas sanguíneas, em cada animal, para análises bioquímicas e hematológicas. Logo em seguida, os animais foram eutanasiados por meio da guilhotina. 2.5 Análise estatística Em princípio, os dados obtidos foram submetidos a estatística descritiva, resultando em valores de média, mediana, desvio padrão, variância e erro padrão de todas as variáveis. Além disso, foram realizados testes estatísticos de Shapiro-Wilk, que avalia a distribuição normal e não normal das variáveis; De Levene, que avalia a homogeneidade de variâncias dos dados; E testes de comparação entre os grupos, em que foram aplicados o teste t de Student, para dados normais e homogêneos, e Mann-Whitney, para dados não normais. Em suma, todos esses dados foram analisados por meio do software Rstudio Versão 4.5.1 for Windows. Adotou-se significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussões

RESULTADOS 3.1 Estatística descritiva Em primeiro plano, os dados alcançados foram condicionados à estatística descritiva, que consiste na organização, resumo e apresentação dos dados de forma compreensível. Dessa forma, foram calculadas medidas de tendência central, como média e mediana, e de dispersão, como desvio padrão, variância e erro padrão, além de serem utilizadas representações gráficas para facilitar a visualização dos resultados. **Teste Comportamental** No teste de campo aberto, a distância percorrida foi usada como parâmetro. Paralelo a isso, no grupo A, a distância percorrida apresentou média de $1505 \pm 383,4$ cm (DP), com mediana de 1510 cm. A variância foi de 147033,3 e o erro padrão da média foi estimado em 191,7. Para as análises inferenciais subsequentes, considerou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). No grupo B, a distância percorrida apresentou média de $860 \pm 768,6$ cm (DP), com mediana de 1100 cm. A variância foi de 590.800 e o erro padrão da média foi estimado em 443,7. Para as análises inferenciais subsequentes, considerou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Além disso, não foram realizadas análises estatísticas referentes aos parâmetros de passagens e tempo no centro do aparato, em virtude do modesto número de ratas que exerceram essas características (3 ratas). Dentre elas, duas pertenciam ao grupo tratado, o que pode sugerir uma possível redução nos níveis de ansiedade nesses animais. **Testes Laboratoriais** Nos testes laboratoriais foram considerados como parâmetro as variáveis glicose, creatinina, uréia, TGO, TGP, leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Sob tal perspectiva, no grupo A, a glicose apresentou média de

217,7 ± 24,3 mg/dL, com mediana de 220,2 mg/dL. A variância foi de 589,7 e o erro padrão da média foi estimado em 10,9. A ureia apresentou média de 56,2 ± 11,2 mg/dL, com mediana de 57,2 mg/dL. A variância foi de 126,1 e o erro padrão da média estimado em 5,0. A creatinina apresentou média de 0,68 ± 0,09 mg/dL, com mediana de 0,69 mg/dL. A variância foi de 0,007 e o erro padrão da média de 0,038. A TGO (AST) apresentou média de 210,2 ± 88,4 U/L, com mediana de 157,0 U/L. A variância foi de 7.818,7 e o erro padrão da média de 39,5. A TGP (ALT) apresentou média de 78,5 ± 29,2 U/L, com mediana de 66,3 U/L. A variância foi de 853,9 e o erro padrão da média de 13,1. As hemácias apresentaram média de 6,97 ± 3,09 milhões/ μ L, com mediana de 8,12 milhões/ μ L. A variância foi de 9,55 e o erro padrão da média de 1,38. A hemoglobina apresentou média de 12,6 ± 5,36 g/dL, com mediana de 14,7 g/dL. A variância foi de 28,7 e o erro padrão da média de 2,40. O hematócrito apresentou média de 33,2 ± 14,5%, com mediana de 39,4%. A variância foi de 210,9 e o erro padrão da média de 6,50. Os leucócitos apresentaram média de 4.340 ± 2.519 células/ μ L, com mediana de 4.900 células/ μ L. A variância foi de 6.343.000 e o erro padrão da média de 1.126,3. As plaquetas apresentaram média de 508.400 ± 448.768/ μ L, com mediana de 770.000/ μ L. A variância foi de 201.392.300.000 e o erro padrão da média de 200.695. Para as análises inferenciais subsequentes, considerou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). No grupo B, a glicose apresentou média de 215 ± 69 mg/dL, com mediana de 212,6 mg/dL. A variância foi 4763,8 e o erro padrão da média foi estimado em 30,8. A ureia apresentou média de 54,9 ± 23,1 mg/dL, com mediana de 59,0 mg/dL. A variância foi de 534,3 e o erro padrão da média estimado em 10,3. A creatinina sérica apresentou média de 0,43 ± 0,17 mg/dL, com mediana de 0,38 mg/dL. A variância foi de 0,029 e o erro padrão da média de 0,077. A TGO (AST) apresentou média de 218,8 ± 118,1 U/L, com mediana de 178,0 U/L. A variância foi de 13.936,7 e o erro padrão da média de 52,8. A TGP (ALT) apresentou média de 80,3 ± 27,7 U/L, com mediana de 69,8 U/L. A variância foi de 767,2 e o erro padrão da média de 12,4. As hemácias apresentaram média de 7,27 ± 0,78 milhões/ μ L, com mediana de 7,35 milhões/ μ L. A variância foi de 0,614 e o erro padrão da média de 0,35. A hemoglobina apresentou média de 14,0 ± 0,48 g/dL, com mediana de 14,1 g/dL. A variância foi de 0,227 e o erro padrão da média de 0,21. O hematócrito apresentou média de 34,5 ± 3,95%, com mediana de 36,1%. A variância foi de 15,6 e o erro padrão da média de 1,76. Os leucócitos apresentaram média de 5.820 ± 3.563 células/ μ L, com mediana de 5.100 células/ μ L. A variância foi de 12.697.000 e o erro padrão da média de 1.593,5. As plaquetas apresentaram média de 370.000 ± 273.078/ μ L, com mediana de 310.000/ μ L. A variância foi de 74.571.500.000 e o erro padrão da média de 122.124. Para as análises inferenciais subsequentes, considerou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3.2 Teste de normalidade Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, que determina a distribuição normal das variáveis. Atrelado a isso, no grupo A, as variáveis: distância percorrida, glicose, creatinina, uréia, TGO, TGP e leucócitos, apresentaram distribuição normal de dados ($w = 0,796$ a $0,990$; $p = 0,075$ a $0,980$). Todavia, as variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas, apresentaram distribuição não normal de dados ($w = 0,606$ a $0,756$; $p = 0,0001$ a $0,034$). No grupo B, todas as variáveis, citadas anteriormente, apresentaram distribuição normal de dados ($w = 0,819$ a $0,990$; $p = 0,114$ a $0,982$).

3.3 Teste de homogeneidade de variâncias Após o teste de Shapiro Wilk, foi realizado o teste de Levene para avaliar a homogeneidade de variâncias dos dados. Nessa perspectiva, foi constatado que todas as variáveis, do grupo controle e tratado, apresentaram homogeneidade de variância ($f = 0,0007$ a $2,16$; $p = 0,29$ a $0,98$).

3.4 Comparação entre os grupos (A e B) Teste t deT Student Para a comparação das médias entre os grupos Controle e Tratado, empregou-se o teste t de Student, aplicado às variáveis que apresentaram normalidade e homogeneidade de variâncias em ambos os grupos. Desse modo, a análise comparativa entre os grupos não evidenciou diferenças estatisticamente

significativas, tanto no teste comportamental, considerando o parâmetro de distância percorrida ($t = 1,48$; $p = 0,191$), quanto nos testes laboratoriais, considerando os parâmetros bioquímicos e hematológicos ($t = 0,08$ a $0,76$; $p = 0,470$ a $0,937$). Entretanto, os valores de creatinina demonstraram uma diferença estatística significativa de redução do grupo B em relação ao grupo A ($t = 2,87$, $p = 0,021$, IC95% [0,05; 0,44] Médias: A = 0,678 | B = 0,432). O que pode indicar uma possível relação do tratamento do amido da semente da jaca com a creatinina sérica. Mann-Whitney Em correlação, para variáveis que apresentaram distribuição não normal em pelo menos um dos grupos, foi realizado o teste Mann-Whitney. Sendo assim, as variáveis hemácias ($w=20$; $p=0,15$), hemoglobina ($w=19$; $p=0,22$), hematócrito ($w=20$; $p=0,14$) e plaquetas ($w=17$; $p=0,47$) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas. DISCUSSÃO O presente trabalho avaliou a influência do amido extraído das sementes de jaca, de acordo com parâmetros comportamentais, bioquímicos e hematológicos, em dez ratas Wistar. Diante disso, embora a maior parte desses indicadores tenha se mantido estatisticamente inalterada, foi observado que duas das três ratas que exploraram o centro do aparato eram do grupo tratado, essa constatação deve ser interpretada com cautela, visto o número reduzido de animais. Tal achado, pode sugerir uma possível ação ansiolítica do extrato, mas precisa ser confirmada em estudos com maior número amostral. Ademais, foi observada uma redução expressiva na creatinina sérica do grupo tratado (B). Atrelado a isso, ainda não há relatos na literatura científica a respeito da redução da creatinina sérica correlacionada com uso do amido presente na semente da jaca, ou de sua influência na função renal. No entanto, de acordo com Fernandes et al. (2017) e Dhani et al. (2025), a semente da jaca contém, em sua composição, um conjunto de bioativos, como polifenóis e flavonóides, capazes de neutralizar radicais livres. Dessa forma, essas substâncias são reconhecidas por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Sob tal perspectiva, a atividade antioxidante aumentada pode respaldar a possibilidade de que estes compostos protegem os rins contra danos oxidativos ou inflamatórios, o que pode refletir em um melhor funcionamento renal e níveis de creatinina sérica diminuídos. Outrossim, como descrito por Burci et al. (2018), o amido possui um perfil de segurança favorável em estudos, uma vez que, assim como em outros ensaios, ele apresentou ausência de toxicidade. Todavia, esses resultados podem depender de sua forma de preparo, dosagem e via de administração. Com isso, o amido da semente da jaca se destaca como um modelo funcional de grande viabilidade industrial, sendo utilizado como espessante, agente geleificante e componente farmacêutico, além de apresentar elevado teor de amido, proteínas, fibras e minerais, o que possibilita um potencial fisiológico relevante, a depender de forma de processamento. (DHANI et al., 2025; RANASINGHE; MADUWANTHI; MARAPANA, 2019). Portanto, mesmo que o estudo em questão não tenha demonstrado alterações estatisticamente significativas na maioria dos parâmetros analisados, os achados na literatura científica reforçam que a semente da jaca, de onde o amido é extraído, contém compostos bioativos com grande atividade antioxidante e anti-inflamatória, o que pode indicar um potencial protetor sobre os rins. Nesse viés, é importante ressaltar que o presente ensaio foi realizado com um número reduzido de animais (10 ratas), apenas um teste comportamental, apenas dois testes laboratoriais que indicam função renal (creatinina e ureia) e um tipo de dose, fatores como estes, podem ter afetado os resultados obtidos. Contudo, torna-se imprescindível que sejam conduzidos novos estudos robustos, com um número amostral maior, doses variadas e mais testes comportamentais e laboratoriais, a fim de elucidar, de forma mais efetiva, os efeitos e mecanismos de ação do amido extraído da semente da jaca.

Conclusão

Em síntese, foi observado que o tratamento com amido extraído da semente da jaca, administrado continuamente por 14 dias nas ratas Wistar do grupo B (Tratado), não apresentou alterações consideráveis nos níveis de ansiedade, atividade locomotora e na maior parte dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, em relação ao grupo A (Controle) na dose e condições experimentais empregadas. No entanto, a redução constatada nos níveis de creatinina sérica, do grupo tratado, pode indicar uma possível ação do amido sobre a função renal, um aspecto que abre portas para investigações futuras. De forma geral, os resultados indicam um perfil de segurança para o amido da semente da jaca nas condições estudadas. Entretanto, para esclarecer seus efeitos e mecanismos de ação, é preciso que hajam novos estudos com maior número de animais e diferentes tipos de doses.

Referências

AJIBOYE, B. O.; OJO, O. A.; OYINLOYE, B. E.; OKESOLA, M. A.; OLUWATOSIN, 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, 2020, p. 2515690X20916123. BURCI, L. M.; DA SILVA, C. B.; RONDON, J. N.; DA SILVA, L. M.; DE ANDRADE, S. F.; MIGUEL, O. G.; DE FÁTIMA GASPARI DIAS, J.; MIGUEL, M. D. Acute and subacute (28 days) toxicity, hemolytic and cytotoxic effect of *Artocarpus heterophyllus* seed extracts. *Toxicology Reports*, v. 6, p. 1304–1308, 2018. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.02.006. Erratum in: *Toxicology Reports*, v. 8, p. 62–63, 2020. COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Lancet*, v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02143-7. DHANI, S.; HAMID; NGOBESE, N. Z.; SHARMA, S.; JAISWAL, A. K. Uma revisão abrangente sobre a composição nutricional, benefícios para a saúde e aplicações industriais das sementes de jaca. *Revista de Agricultura e Pesquisa Alimentar*, v. 19, 2025, p. 101692. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101692>. FERNANDES, F.; FERREIRES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; OLIVEIRA, A. P.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Accumulation of primary and secondary metabolites in edible jackfruit seed tissues and scavenging of reactive nitrogen species. *Food Chemistry*, v. 233, p. 85–95, 2017. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.068. LADER, M. H. Limitações ao uso de benzodiazepínicos na ansiedade e insônia: são justificadas? *Neuropsicofarmacologia Europeia*, v. 9, supl. 6, p. S399–S405, 1999. DOI: 10.1016/S0924-977X(99)00051-6. LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K. F. Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systematic review. *Nutrition Journal*, v. 9, p. 42, 2010. DOI: 10.1186/1475-2891-9-42. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2959081/>. RANASINGHE, R. A. S. N.; MADUWANTHI, S. D. T.; MARAPANA, R. A. U. J. Nutritional and health benefits of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): a review. *International Journal of Food Science*, v. 2019, p. 4327183, 2019. doi: 10.1155/2019/4327183. 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. 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*, v. 96, p. 52434, 2015.

CÓDIGO: SB1515

AUTOR: DALMO MONTEIRO DANTAS JUNIOR

ORIENTADOR: ADRIANA FERREIRA UCHOA

TÍTULO: Efeitos morfológicos do extrato aquoso de sementes de *Tephrosia toxicaria* Pers. e frações proteicas derivadas sob a forma promastigota de *Leishmania infantum*.

Resumo

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozário *Leishmania* spp. A forma clínica de Leishmaniose Visceral é causada pela *Leishmania infantum* no Brasil. Essa doença é amplificada pelo alto custo de tratamento, resistência parasitária e drogas altamente citotóxicas. Em razão disso, alternativas são exploradas, como os extratos botânicos, que tem apresentado resultados promissores. Eles apresentam moléculas leishmanicidas, são leishmanicidas e são capazes de alterar a morfologia do parasita. Inibidores de Proteases são moléculas que afetam as proteases do alvo, reduzindo a sua virulência. *Tephrosia toxicaria* é uma planta tropical com diversas propriedades bioativas, como microbicida e inseticida, e com potencial para apresentar adjuvantes para o tratamento da leishmaniose. Investigamos o extrato aquoso das sementes dessa planta, e frações derivadas, quando ao seu potencial leishmanicida e a possibilidade de mudanças morfológicas na presença do extrato, e realizamos a caracterização bioquímica inicial. Foi observado que as amostras causam alterações no flagelo e na membrana plasmática na forma promastigota do parasita. Foram detectados a presença de lectinas, compostos fenólicos e inibidores de proteases, todas biomoléculas com capacidade de serem leishmanicidas e estarem contribuindo para o fenótipo morfofisiológico. Esses resultados reafirmam a riqueza dessa espécie, e seu potencial terapêutico, a sugerem futuras investigações.

Palavras-chave: Extratos Botânicos, Leishmaniose, flagelos, Proteases, Timbó.

TITLE: Morphological effects of the aqueous extract of *Tephrosia toxicaria* Pers. seeds and derived protein fractions in the promastigote of *Leishmania infantum*

Abstract

Leishmaniasis is a tropical neglected disease caused by the protozoan *Leishmania* spp. The clinical form, Visceral Leishmaniasis, is caused by *Leishmania infantum* in Brazil. This disease is enhanced by the high treatment costs, drug resistance, and drug toxicity. Because of that, new alternatives are being explored, such as botanical extracts, which are showing promising results. They have leishmanicidal molecules that can affect the parasite morphology. Protease Inhibitors are molecules that target a protease in the parasite, reducing its virulence. *Tephrosia toxicaria* is a tropical plant with many distinguishing bioactive properties, such as microbial and insecticide, and has the potential to develop new treatment adjuvants to

leishmaniasis. We investigated the aqueous extract of the seeds of said plant, and its derived fractions, for their leishmanicidal potential, and morphology-altering capabilities, and began its biochemical characterization. We observed flagellum and cell membrane morphological changes in the parasite. Lectins, phenolic compounds, and protease inhibitors are all biomolecules that can contribute to the phenotype observed and are present in the crude extract and derived fractions. These results reaffirm the diversity of this species and its therapeutic potential, and suggest future investigations.

Keywords: Botanical Extracts, Leishmaniasis, Flagella, Proteases, Timbó

Introdução

A leishmaniose é classificada como uma Doença Tropical Negligenciada (PAHO, 2025), sendo endêmica em mais de 90 países, infectando cerca de 12 milhões de pessoas globalmente. Conforme Ivănescu et al. (2023), menos de 50% dos casos de leishmaniose são reportados anualmente, e até 30 mil mortes são registradas por ano. Essa doença possui 3 principais formas clínicas: Leishmaniose Cutânea (LC), Mucocutânea (LC) e Visceral (LV) (Akhoundi et al, 2016; Machin et al., 2022). A LV, conhecida popularmente também como calazar, tem uma letalidade de 95% em casos não tratados, segundo a OMS (2025).

Leishmaniose é causada pelo parasita do gênero *Leishmania*, um protozoário intramacrocitário obrigatório, com diversas espécies e uma ampla distribuição geográfica. Sua transmissão é feita pela picada de insetos vetores, popularmente chamados de “mosquito-palha”, um flebotômneo. A fêmea desse artrópodes, *Lutzomia* nas Américas e *Phlebotomos* no Velho Mundo, durante o repasto sanguíneo, pode ser infectada, e está apta para transmitir o parasita no próximo repasto (WHO, 2025).

O tratamento para a leishmaniose tem se tornando um desafio crescente, frente aos medicamentos onerosos disponíveis e a crescente resistência a quimioterapia apresentado pelo parasita. O medicamento usual, os Antimoniais Pentavalentes, causam problemas cardiológicos e gastrointestinais, e já resultaram em falha terapêutica, conforme relatos da literatura (Pradhan et al., 2022; Fischer et al., 2024; Majoor et al., 2025). Anfotericina B é um medicamento usado como última escolha, mas tem efeitos nefrotóxicos significativos (Faral-Tello et al., 2020). Já a formulação lipossomal desse medicamento reduz os efeitos secundários tóxicos, mas eleva o custo do produto, e reduz sua acessibilidade a regiões que carecem de uma alta infraestrutura médica (Majoor et al., 2025).

Conforme estudos de genoma, há uma grande diversidade genética dentro do gênero *Leishmania*, (Scarpini et al., 2022), que se relaciona com a presença de diferentes perfis de resistência em redor do globo. Em razão disso, o desenvolvimento de alternativas para o tratamento da leishmaniose tem sido desafiador, e demanda mais prospecção de candidatos, com maior eficácia, uma boa disponibilidade e uma menor toxicidade (Ebiomedicine, 2023).

A prospecção de extratos botânicos representa um campo rico em potencial, com alta biodisponibilidade e baixa citotoxicidade, e forma uma alternativa de interesse farmacológico para diversas doenças. (Darwish et al., 2019; Khademvatan et al., 2019; Rottini et al., 2019; Albuquerque et al., 2020; De Cunha et al., 2021). Já são relatados na literatura compostos derivados de plantas com atividade leishmanicida (Emiliano et al., 2023; De Paula et al., 2019; Nigatu et al., 2021).

Proteases são fatores de virulência fundamentais para o parasita *Leishmania*, e quando inibidas, elas afetam a sobrevivência do parasita (Sreedharan et al., 2023; Casgrain et al., 2016). Em razão disso, inibidores de proteases (IP) são vistos como um potencial agente leishmanicida. IP de batata apresentaram atividade leishmanicida in vivo (Paik et al., 2020). Além disso, já são relatadas moléculas capazes de afetar a morfologia celular do parasito, como membrana e flagelo, contribuindo para a perda da viabilidade celular, em ensaios in vitro (do Socorro et al., 2022; Da Silva et al., 2018).

Tephrosia toxicaria Pers (Timbó) é uma planta da família Leguminosae. Ela está dentro de um gênero de plantas ricos em compostos antiplasmodiais e antiprotozoários, e ocorre em regiões tropicais do planeta (Zhang et al., 2020; Atilaw et al., 2020; Chen et al., 2014; Juma et al., 2011). Moléculas leishmanicidas, inseticidas, miobicidas e antioxidantes já são descritas para essa planta (Sá et al., 2023).

Dessa forma, essa pesquisa avaliou a atividade do Extrato Bruto e Frações derivadas de *T. toxicaria* Pers de promover alterações morfológicas, bem como realizou a caracterização bioquímica parcial das amostras da planta.

Metodologia

Material biológico

Sementes de *T. toxicaria* foram coletadas no distrito de São José, município de Ibiapina, Ceará, Brasil (3°55'31"S 40°53'43"W), em conformidade com o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen n. A3104E7). A confirmação botânica do vegetal está registrada e depositada (UFRN00022960) no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os parasitas (*Leishmania infantum*) foram obtidos do acervo parasitológico do Laboratório de Imunogenética do Instituto de Medicina Tropical do RN, UFRN, coordenado pela Dra. Selma Maria Bezerra Jerônimo e cedido pela Dra. Daniella Regina Arantes Martins.

Obtenção das amostras

As sementes foram secas (37°C) em ambiente com circulação de ar, durante uma semana, com posterior trituração em moinho de facas tipo Willye e peneiradas (trama 40 mesh) para obtenção da farinha da semente. A farinha foi solubilizada com água destilada para produção do extrato bruto, na proporção 1:5 (p/v). Após 24 de repouso a 4°C, o extrato foi centrifugado (10.000 Xg, 30 min, 4°C), filtrado em papel filtro (poro 20 a 25 µm) e liofilizado.

Empregando o método Scopes (1994), o extrato foi solubilizado com (NH₄)₂SO₄ em crescentes concentrações: F1: 0-25%, F2: 25-50%, F3: 50-75% e F4: 75-100% (p/v). O extrato ficou de repouso por 24h após a incorporação do sal sob agitação magnética, e então foi centrifugado (10.000 Xg, 30 min, 4°C), dialisado (poro de 14 kDa) e liofilizado.

O peso seco de cada fração foi determinado pela massa resultante de sua liofilização. Um volume conhecido de cada fração foi aliquoteado em um tubo de fundo cônico com peso conhecido. Após liofilização, o peso atual é comparado, e a diferença compõem a massa da amostra. A massa (mg) multiplicada pelo volume total da amostra é o peso seco. O rendimento (%), é a relação entre farinha de semente/massa de cada fração pós liofilização.

Atividade leishmanicida

Formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) a 27 ± 2 °C por 4 dias até a fase log. Um volume de 160 µL de um inóculo parasita (10^6 parasitas/mL) foram adicionadas em uma placa de 96 poços, seguidos do extrato bruto e frações, em diluições seriadas de 1000 - 1,0 µg/mL, e incubados por 24 horas a 27 ± 2 °C. A viabilidade parasitária foi medida pelo ensaio de redução da resazurina. 20 µL de resazurina (1,0 mM) foram adicionados às placas após cada tempo de incubação e, em seguida, incubados novamente por 24 horas (CORRAL et al., 2013). A absorbância foi determinada a 570 nm e 600 nm em leitor de microplacas. A porcentagem de inibição foi calculada usando a Equação:

$$\text{Inibição \%} = 100 - \frac{A_{570t} - A_{600t}}{A_{570c} - A_{600c}} \times R_0 \times 100$$

Onde

A_{570t}: Absorbância do tratamento a 570 nm;

A_{600t}: Absorbância do tratamento a 600 nm;

A_{570c}: Absorbância do controle a 570 nm;

A_{600c}: Absorbância do controle a 600 nm.

R₀: Fator de correção da influência do meio na redução da resazurina, o produto da absorbância do meio a 570 nm pela absorbância do meio a 600 nm.

Análise Morfológica por Microscopia Óptica

Formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio RPMI 1640 a 27 ± 2 °C por 4 dias até a fase log. Um volume de 200 µL de um inóculo de parasita (10^7 parasitas/mL) foram adicionadas as frações, na concentrações de 1000 µg/mL em placa de 96 poços, e incubados por 4 horas a 27 ± 2 °C, em triplicata. Após esse período, uma alíquota de 10 µL /triplicata foi homogeneizada e colocada sobre lâmina para microscopia e deixado secar à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. As lâminas foram então fixadas com metanol e coradas com o corante Panótico rápido. A análise morfológica foi realizada pela observação de alterações das estruturas celulares em comparação com as lâminas do controle, quanto à forma e número do flagelo, do núcleo, e do cinetoplasto, quanto a forma da membrana e da célula, e quanto à presença de células isoladas ou agrupadas.

Caracterização bioquímica inicial

Dosagem de proteínas solúveis

Separadamente, 2 mg de cada fração obtida foram solubilizados em 1,0 mL de água destilada para determinação do teor de proteínas solúveis totais, obtido conforme método descrito por Bradford (1976). A dosagem foi realizada em microplacas de 96 poços utilizando albumina sérica bovina como padrão (1,0 mg/mL).

Detecção de inibidores de proteases

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Xavier-Filho et al. (1989), utilizando azocaseína 1% como substrato para a enzima papaína (0,2 mg/mL). A hidrólise do substrato pelas enzimas foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm.

Detecção de Lectinas

As amostras foram submetidas a diluição seriada e avaliadas macroscopicamente de forma qualitativa, seguindo a metodologia de Debray et al. (1981). A coleta dos eritrócitos foi feita em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFRN, Brasil (autorização n. 4.769.699). Alíquotas de sangue humano dos tipos A, B e O foram lavadas, para obtenção de hemácias à 4% livres de soro. Eritrócitos humanos foram incubados em uma placa de 96 poços de fundo em "V". Os eritrócitos foram usados com ou sem tratamento enzimático. As amostras foram incubadas com o concentrado de eritrócitos por 1h a temperatura ambiente. Uma solução de NaCl 150 mM foi usada como controle. A leitura foi feita por observação direta, pela presença ou não de hemaglutinação. O título, expresso em Unidades de Hemaglutinação (UH), corresponde ao inverso da maior diluição da amostra com aglutinação visível dos eritrócitos humanos.

Dosagem de compostos fenólicos

O método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M, 1999) foi utilizado para a dosagem de compostos fenólicos do extrato e das frações. Este ensaio colorimétrico foi conduzido em microplacas de 96 poços, usando ácido gálico (10 mg/mL) como curva padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 790 nm em espectrofotômetro

Resultados e Discussões

Determinação de peso seco e rendimento

O fracionamento do extrato aquoso bruto das sementes de *T. toxicaria* resultou em quatro frações proteicas (F1 a F4) correspondentes a diferentes faixas de saturação do sal (0-25%, 25-50%, 50-75% e 75-100%).

A fração F2 apresentou o maior rendimento (0,464%), com um peso seco de 0,1159 g. As demais frações apresentaram os seguintes rendimentos e pesos secos, respectivamente: F1 (0,124%, 0,031g), F3 (0,302%, 0,0755 g) e F4 (0,1663%, 0,04157 g). O rendimento total do processo foi de 1,056%.

Essa curva de rendimento do processo de fracionamento sugere a formação de frações com características bioquímicas distintas. Essa variação pode implicar, por exemplo, na presença, em cada fração, de diferentes compostos bioativos, justificando análises individuais de cada amostra.

Caracterização bioquímica parcial

Dosagem de proteínas solúveis totais

O levantamento do teor proteico das frações revelou que todas as frações exibiram concentrações de proteína acima de 20%, sendo que a fração F2 apresentou 39,39% de proteína. Em contraste, o Extrato Bruto (EB) possuía um teor proteico de 2,96%. Isso indica que o processo de fracionamento de T. toxicaria foi eficaz em concentrar proteínicos no extrato, conforme é a característica do método de fracionamento (Scopes, 1994).

As frações F2 e F3 obtiveram altos teores de proteínas solúveis, em conjunto com um bom rendimento do processo de fracionamento. A correlação entre maior massa e maior teor de proteínas solúveis nas frações F2 e F3 sugere um enriquecimento em potenciais bioativos.

Detecção de Inibidores de Proteases

Os resultados do ensaio de inibição da papaína podem ser encontrados na Tabela 1. A inibição foi determinada pela redução da absorção a 410 nm. Todas as frações apresentaram uma atividade de inibição de papaína detectável. A fração F1 apresentou maior potencial inibitório. Em seguida, a fração F2 e fração 3 apresentaram valores médios de inibição, enquanto que a fração F3 apresentou o menor resultado. O valor superior a 100% para o extrato aquoso (EA) pode ser atribuído à presença de substâncias interferentes que absorvem a 410 nm, resultando em valores de atividade inibitória aparentemente elevados.

A papaína pode ser considerada um candidato a alvo interessante em *Leishmania infantum*, visto que é uma protease conservada no protozoário (Sreedharan et al., 2023). É possível que a presença de inibidores dessa protease afetem a viabilidade celular do parasito, afetando sua capacidade de digestão. Um estado de desnutrição proteico pode levar a alterações na morfologia celular, fruto de erros nos processos de síntese em virtude da redução de precursores.

Dosagem de compostos fenólicos

O ensaio de determinação da quantidade de compostos fenólicos mostrou resultados variados nas amostras testadas, conforme Tabela 2. A fração F2 obteve um teor de compostos fenólicos maior do que o do EB (1,503% Vs 1,614%), mostrando um possível resultado de concentração de moléculas na fração F2. As demais frações (F1, F3 e F4) obtiveram resultados menores do que o EB.

Detecção de lectinas

A detecção de lectinas foi feito utilizando eritrócitos humanos dos tipos A, B e O, tratados ou não com papaína. As frações F3 e F4 foram as únicas que apresentaram aglutinação, nos sangues tipo A e O tratados com papaína (F3), e a fração F4 apresentou aglutinação com o sangue do tipo A, também tratado com papaína.

De maneira paralela, o EB não apresentou hemaglutinação nos ensaios. Isso pode indicar que existe a presença de lectinas no EB, mas sob concentrações baixas e indetectáveis, mas que o

processo de fracionamento contribui para a concentração de moléculas capazes de realizar essa hemaglutinação observada in vitro.

As aglutinações foram observadas somente com o tratamento da papaína. Isso pode ser atribuído a maior exposição de sítios de ligação nos eritrócitos tratados em contraste com os eritrócitos in natura.

Atividade leishmanicida

Em busca de determinar o potencial leishmanicida das amostras, o Extrato Bruto (EB) e as frações derivadas da semente de *T. toxicaria* foram incubadas com um indicador de viabilidade celular (Resazurina). A redução do indicador, mensurada pelo espectrofotometro, foi usado para estimar o potencial leishmanicida das amostras.

Na figura 1, podemos observar o resultado dos ensaios envolvendo o EB. Em todas as concentrações testadas, houve a presença de atividade leishmanicida em todas as concentrações testadas. Isso sugere a presença de moléculas com atividade leishmanicida no EB, que podem estar presentes nas demais frações. E justamente, na figura 2-5, podemos observar o potencial leishmanicida das frações derivadas do EB.

Importante notar que todas as frações obtiveram resultados maiores do que o EB, o que sugere um efeito de concentração de moléculas de interesse, com potencial leishmanicida. Além disso, ressaltamos ainda a fração F3, que foi capaz de reduzir 100% da viabilidade na menor concentração testada (10 µg/mL).

Diversos grupos de moléculas possuem atividade antiprotozoária registradas na literatura (Ambrosio, Rosa L., et al., 2020; Darwish et al., 2019; Rottini et al., 2019; Albuquerque et al., 2020; de Cunha et al., 2021), podendo elas estarem presentes nas amostras. O efeito leishmanicida observado pode ser proveniente de diversos mecanismos de ação, como por exemplo, a dificuldade de aquisição de nutrientes, como resultado da presença de inibidores de protease.

Contudo, é necessário uma caracterização mais aprofundada para definir os compostos bioativos presentes nas frações, e como eles estão envolvidos no fenótipo leishmanicida.

Ensaio de Visualização Microscópica

A morfologia do protozoário *Leishmania* desempenha um papel crucial no seu potencial infectioso (Sunter, Jack e Keith Gull, 2017). Em razão disso, mudanças na morfologia no parasita podem contribuir para o combate a esse organismo, impactando em sua viabilidade celular.

Nesses ensaios, buscamos determinar o potencial do extrato aquoso bruto (EB) da semente de *Tephrosia toxicaria* e das frações derivadas em causar alterações morfológicas na forma promastigota de *Leishmania infantum*.

Na figura 6 (A-C), podemos observar a morfologia característica do parasita *Leishmania infantum*, de conforma conservada, em um meio de cultura com ausência de amostras (Controle negativo). As células tem formado fusiforme, com flagelo na região posterior, e

afinamento do corpo celular na porção anterior. Esta morfologia está de acordo com a forma promastigota descrita por Sunter, Jack e Keith Gull (2017).

Em seguida, podemos observar os efeitos de presença do EB sob a morfologia do parasita (figura 7). No painel A, podemos observar o encurtamento do flagelo, um contraste evidente com a figura 6. Nos painéis C e CD da figura 7, podemos observar ainda a formação de pequenas vesículas nas extremidades do flagelo, e no painel B da mesma figura, vemos um exemplar do parasita com diminuição do volume celular.

Esses resultados podem sugerir um efeito inibitório sob a motilidade do parasito, impactando direta ou indiretamente em sua capacidade de sobrevivência e infectividade. Além disso, perda do volume celular pode estar relacionado a algum efeito citotóxico presente na amostra, com potencial de redução de viabilidade celular.

Alterações no flagelo comprometem a capacidade de sobrevivência *in vitro*, conforme estudos de Kelly et al. (2021). Moléculas que afetam a motilidade do parasito, dessa forma, se tornam candidatos interessantes para quimioterápicos leishmanicidas.

Podemos observar na figura 8 o efeito da fração F2 sob a morfologia do parasito. Em A, é possível observar a redução do volume celular, e no painel B, uma célula em divisão com redução do tamanho do flagelo. Segundo Erfe et al. (2012), algumas moléculas sintéticas com efeito leishmanicidas causaram efeitos similares, resultando na perda de volume celular e arredondamento do corpo celular do parasita, em contraste com a morfologia usual do parasita (figura 6). Ambos os fenótipos são semelhantes aos encontrados no extrato bruto (figura 7), o que pode sugerir que moléculas presentes no EB com capacidade de causar essas alterações foram concentradas na fração F2, e talvez nas demais frações.

Na figura 9, podemos observar o efeito da fração F3 no fenótipo do parasita. Nos painéis A e B, observamos alterações na morfologia do flagelo, onde em A há o encurtamento, e em B há a duplicação do flagelo em um único parasita. Já no painel C, observamos a formação de agrupamentos de células de leishmania.

A figura 10 exemplifica achados relacionados a fração F4. A exposição a essa fração resultou em um fenótipo semelhante às demais frações, ressaltando a possibilidade de moléculas similares estarem concentradas nas demais frações, partindo do extrato bruto. No painel A e C, vemos alterações na morfologia do flagelo, onde há encurtamentos em seu tamanho. Já em B, vemos o arredondamento e perda de volume celular do parasito.

É possível perceber o potencial que as amostras, tanto o extrato bruto como as frações derivadas, possuem de causar alterações morfológicas na forma promastigota de *Leishmania infantum*. Isso contribui para o entendimento de que extratos botânicos (Socorro et al., 2022) são bons candidatos com potencial terapêutico, servindo como adjuvantes no tratamento da leishmaniose. Conforme a literatura, o processo de fracionamento contribui para o aumento de efeito biológico de extratos botânicos (Samy et al., 2022). Diversas moléculas que foram identificadas como presentes nas amostras podem estar contribuindo para essa bioatividade, como lectinas (Grangeiro et al., 2024), inibidores de proteases (De Almeida Machado et al., 2025) e compostos fenólicos (Salazar et al., 2023; Mfopa et al., 2024).

A semelhança entre os fenótipos sugere moléculas com mecanismos em comum dentro das frações, possivelmente em concentrações diferentes. Existe ainda a possibilidade da correlação entre o fenótipo morfológico e o efeito leishmanicida observado *in vitro*.

Conclusão

Esse estudo permitiu investigar o potencial que o extrato aquoso da semente de *Tephrosia toxicaria* e frações derivadas dela trazem para o combate a *Leishmania infantum* em sua forma promastigota. Foi possível determinar a presença de diferentes classes de moléculas, como lectinas, inibidores de proteases e compostos fenólicos, avaliar o potencial leishmanicida e a capacidade das amostras de causar alterações morfológicas na membrana celular e no flagelo. Essas estruturas são fundamentais para sobrevivência do parasita, em processos de motilidade, aquisição de nutrientes e sinalização celular, e alterações nelas podem estar relacionadas ao efeito citotóxico observado *in vitro*.

A continuidade na caracterização dos compostos presentes nas frações é fundamental para investigações futuras, e a possibilidade de entender os mecanismos envolvidos no efeito leishmanicida das amostras. Além disso, avaliar a citotoxicidade e o sinergismo entre frações e outras drogas é um passo importante para estabelecer a segurança e potencial terapêutico dessas amostras.

Referências

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., et al. (2016) A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS. Negl. Trop. Dis*;10: 4349.
- Albuquerque, R., Oliveira, A. P., Ferreira, C., Passos, C., Fialho, E., Soares, D. C., Amaral, V. F., Bezerra, G. B., Esteves, R. S., Santos, M. G., Albert, A., & Rocha, L. (2020). Anti-*Leishmania amazonensis* activity of the terpenoid fraction from *Eugenia pruniformis* leaves. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(4), e20201181.
- Andrews, K.T., Fisher, G. & Skinner-Adams, T. S. 2014. Reaproveitamento de medicamentos e doenças de protozoários parasitas humanos. *Int J Parasitol Drug Resist* 4: 95-111.
- Atilaw, Y., Muiva-Mutisya, L., Bogaerts, J., Duffy, S., Valkonen, A., Heydenreich, M., Avery, V. M., Rissanen, K., Erdélyi, M., & Yenesew, A. (2020). Prenylated Flavonoids from the Roots of *Tephrosia rhodesica*. *Journal of natural products*, 83(8), 2390–2398. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00245>
- Barrett, M.P., Kyle, D.E., Sibley, L.D., Radke, J.B., Tarleton, R. L. Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Oct;17(10):607-620.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120 p.
- Burza, S., Croft, S.L. & Boelaert, M. 2018. Leishmaniose. *Lancet* 392: 951-970
- Capela R, Moreira R, Lopes F. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 15;20(22):5748.

Casgrain PA, Martel C, McMaster WR, Mottram JC, Olivier M, Descoteaux A. Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. *PLoS Pathog.* 2016 May 18;12(5):e1005658. doi: 10.1371/journal.ppat.1005658. PMID: 27191844; PMCID: PMC4871588.

Chen, Y. et al. Natural products from the genus *Tephrosia*. (2014) *Molecules*, v. 19, p. 1432-1458.

Clementino, L.C., Velásquez, A.M.A., Passalacqua, T.G., Almeida, L., Graminha, M.A.S., Martins, G.Z., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Sousa, M.C., Moreira, R.R.D. (2018) In vitro activities of glycoalkaloids from the *Solanum lycocarpum* against *Leishmania infantum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 28: 673–677

Da Silva BJM, Pereira SWG, Rodrigues APD, Do Nascimento JLM, Silva EO. In vitro antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. *J Integr Med.* 2018 Nov;16(6):404-410. doi: 10.1016/j.joim.2018.08.004. Epub 2018 Aug 25. PMID: 30195443.

Darwish, A.G.G., Samy, M.N., Sugimoto, S., Matsunami, K. Otsuka, H. (2019) In vitro antileishmanial activity of methanolic extracts for some selected medicinal plants. *Pharm. Mag*; 15 (62): 34-37.

do Socorro Silva da Veiga A, Silveira FT, da Silva EO, Júnior JAPD, Araújo SC, Campos MB, do Rosário Marinho AM, Brandão GC, Vale VV, Percário S, Dolabela MF. Activity of alkaloids from *Aspidosperma nitidum* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Sci Rep.* 2022 May 23;12(1):8662. doi: 10.1038/s41598-022-12396-x. PMID: 35606396; PMCID: PMC9126982.

Dourado, D., Silva Medeiros, T., do Nascimento Alencar, É., Matos Sales, E., & Formiga, F. R. (2024). Curcumin-loaded nanostructured systems for treatment of leishmaniasis: a review. *Beilstein journal of nanotechnology*, 15, 37–50. <https://doi.org/10.3762/bjnano.15.4>

eBioMedicine (2023). *Leishmania*: an urgent need for new treatments. *EBioMedicine*, 87, 104440. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104440>

Emiliano YSS, Almeida-Amaral EE. Apigenin is a promising molecule for treatment of visceral leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Apr 5;13:1066407. doi: 10.3389/fcimb.2023.1066407. PMID: 37091674; PMCID: PMC10113494.

Fundação Oswaldo Cruz (2024). Doenças no Portal Fiocruz - Leishmaniose. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/doenca/leishmaniose>. Acesso em: 31/05/2024

Juma, W.P., Akala, H.M., Eyase, F.L., Muiva, L.M., Heydenreich, M., Okalebo, F.A., Gitu, P.M., Peter, M.G., Walsh, D., Imbuga, M., Yenesew, A., (2011) Terpurinflavone: antiparasitodal flavones from the stem of *Tephrosia purpurea*. *Phytochem. Lett.* 4, 176–178.

Kauffmann, C., Pacheco, L.A., Buhl, B., Scheibel, T., Freitas, E.M., Hoehne, L., Machado, G.M.C., Cavaleiro, M.M.C., Gnoatto, S.C.B., Ethur, E.M. (2017) Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de espécies da família Myrtaceae, nativas do sul do Brasil. *Lajeado Rev. Dest. Acad*; 9 (3): 2176-3070.

KELLY, Felice D.; YATES, Phillip A.; LANDFEAR, Scott M. Nutrient sensing in Leishmania: Flagellum and cytosol. *Molecular microbiology*, v. 115, n. 5, p. 849-859, 2021.

Khademvatan, S., Eskandari, A., Nejad, B.S., Najafi, S. (2020) In vitro anti-leishmanial activity of *Satureja khuzestanica* jamzad and *Oliveria decumbens* Vent. extracts on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *J. Rep. Pham. Sci*; 8: 149-154.

Nigatu H, Belay A, Ayalew H, Abebe B, Tadesse A, Tewabe Y, Degu A. In vitro Antileishmanial Activity of Some Ethiopian Medicinal Plants. *J Exp Pharmacol*. 2021 Jan 15;13:15-22. doi: 10.2147/JEP.S285079. PMID: 33488126; PMCID: PMC7815069.

Paik D, Pramanik PK, Chakraborti T. Curative efficacy of purified serine protease inhibitor PTF3 from potato tuber in experimental visceral leishmaniasis. *Int Immunopharmacol*. 2020 Aug;85:106623. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106623. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32504996.

Paula, R. C., Silva, S. M., Faria, K. F., Frézard, F., Moreira, C. P. S., Foubert, K., Lopes, J. C. D., Campana, P. R. V., Rocha, M. P., Silva, A. F., Silva, C. G., Pieters, L., Almeida, V. L. (2019) In vitro antileishmanial activity of leaf and stem extracts of seven Brazilian plant species. *Journal of Ethnopharmacology* 232: 155–164.

Pradhan S, Schwartz RA, Patil A, Grabbe S, Goldust M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*. 2022 Mar;47(3):516-521. doi: 10.1111/ced.14919. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34480806.

Rottini, M.M., Amaral, A.C.F., Ferreira, J.L.P., Oliveira, E.S.C, Silva, J.R.A, Taniwaki, N.N., Dos Santos, A.R., Almeida-Souza, F., de Souza, C.D.S.F., Calabrese, K.D.S. *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) Essential Oil as a Weapon Against *Leishmania amazonensis*: In Vitro Assay. *Molecules*. 2019 Jul 10;24(14):2525

Sá GCDS, da Silva LB, Bezerra PVV, da Silva MAF, Inacio CLS, Paiva WS, E Silva VPM, Cordeiro LV, Oliveira JWF, Silva MS, Lima EO, Moreira FJC, Rocha HAO, Barra PB, Ximenes MFFM, Uchôa AF. *Tephrosia toxicaria* (Sw.) Pers. extracts: Screening by examining aedicial action under laboratory and field conditions along with its antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial activities. *PLoS One*. 2023 Jan 11;18(1):e0275835. doi: 10.1371/journal.pone.0275835. PMID: 36630475; PMCID: PMC9833590.

Scarpini, S., Dondi, A., Totaro, C., Biagi, C., Melchionda, F., Zama, D., Pierantoni, L., Gennari, M., Campagna, C., Prete, A., & Lanari, M. (2022). Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms*, 10(10), 1887.

Sreedharan V, Rao KVB. Protease inhibitors as a potential agent against visceral Leishmaniasis: A review to inspire future study. *Braz J Infect Dis*. 2023 Jan-Feb;27(1):102739. doi: 10.1016/j.bjid.2022.102739. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36603827; PMCID: PMC9871078.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis overview, 2024. Acesso em 31 de Maio de 2024. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

Zhang, P., Qin, D., Chen, J., & Zhang, Z. (2020). Plants in the Genus *Tephrosia*: Valuable Resources for Botanical Insecticides. *Insects*, 11(10), 721. <https://doi.org/10.3390/insects11100721>.

Anexos

Tabela 1 - Inibição da enzima papaína pelo extrato aquoso (EB) e frações derivadas da semente de *Tephrosia toxicaria* Pers.

Tabela 2 - Dosagem de compostos fenólicos totais do extrato aquoso (EB) e frações derivadas da semente de *Tephrosia toxicaria* Pers.

Figura 1: Efeito inibitório in vitro do Extrato Bruto (EB) de *T. toxicaria* (0,1-1000 µg/mL) sobre promastigotos de *L. infantum* após 24h de incubação

Figura 2: Efeito inibitório in vitro da Fração F1 de *T. toxicaria* (0,1-1000 µg/mL) sobre promastigotos de *L. infantum* após 24h de incubação

Figura 3: Efeito inibitório in vitro da Fração F2 de *T. toxicaria* (0,1-1000 µg/mL) sobre promastigotos de *L. infantum* após 24h de incubação

Figura 4: Efeito inibitório in vitro da Fração F3 de *T. toxicaria* (0,1-1000 µg/mL) sobre promastigotos de *L. infantum* após 24h de incubação

Figura 5: Efeito inibitório in vitro da Fração F4 de *T. toxicaria* (0,1-1000 µg/mL) sobre promastigotos de *L. infantum* após 24h de incubação

Figura 6 - Visualização por microscopia óptica de promastigotas de *Leishmania infantum* (Controle Negativo), corados com panóptico. Aumento de 1000X. Observa-se a morfologia característica da parasita, com corpo fusiforme e flagelo proeminente.

Figura 7 - Visualização por microscopia óptica de promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com EB de sementes de *Tephrosia toxicaria* por 4h, corados com panóptico. Aumento de 1000X.

Figura 8 - Visualização por microscopia óptica de promastigotas de *Leishmania infantum* tratados com a fração F2 por 4h, corados com panótico. Aumento de 1000X

Figura 9 - Visualização por microscopia óptica de promastigotas de *Leishmania infantum* expostas a fração F3 por 4 h, corados com panótico. Aumento de 1000X.

Figura 10 - Visualização por microscopia óptica de promastigotas de *Leishmania infantum* expostas a fração F4 por 4h, corados com o panótico. Aumento 1000X.

CÓDIGO: SB1516

AUTOR: AMANDA MAIA DA SILVA

COAUTOR: CAMILA ESTEFANY ALVES MOTA

ORIENTADOR: JULIANA DEO DIAS

TÍTULO: O zooplâncton que eclode do sedimento: contribuições para a diversidade em reservatórios do semiárido

Resumo

As regiões semiáridas são altamente vulneráveis a secas prolongadas, que podem levar à redução ou desidratação completa dos reservatórios, afetando processos ecológicos e a biodiversidade aquática. O zooplâncton, componente essencial da teia trófica, adota estratégias de dormência que garantem a persistência das populações, formando bancos de propágulos no sedimento. Este estudo avaliou a eclosão de formas dormentes em três reservatórios do Rio Grande do Norte (Boqueirão, Gargalheiras e Dourado), investigando sua contribuição para a manutenção da diversidade. Amostras de sedimento foram coletadas em abril de 2025, secas e incubadas em microcosmos por 51 dias, com monitoramento da eclosão a cada dois dias; a comunidade ativa foi simultaneamente amostrada na coluna d'água. Foram registradas nove espécies na comunidade passiva, com predominância de tecamebas e rotíferos Bdelloidea. O número de eclosões e a riqueza diferiram significativamente entre os reservatórios (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), com Gargalheiras apresentando os menores valores. A comparação entre ativa e passiva revelou baixa sobreposição, mas evidenciou o potencial dos bancos de propágulos em complementar a fauna zooplanctônica. Os resultados indicam que, embora não reflitam integralmente a comunidade ativa, os bancos de formas dormentes têm papel importante na resiliência e recuperação das populações em ecossistemas sujeitos a extremos hidrológicos.

Palavras-chave: Zooplâncton, Dormência, Reservatórios do semiárido.

TITLE: Zooplankton hatching from sediment: contributions to diversity in semiarid reservoirs

Abstract

Semi-arid regions are highly vulnerable to prolonged droughts, which can lead to the reduction or complete dehydration of reservoirs, affecting ecological processes and aquatic biodiversity. Zooplankton, an essential component of the food web, adopt dormancy strategies that ensure population persistence, forming propagule banks in the sediment. This study evaluated the hatching of dormant forms in three reservoirs in Rio Grande do Norte (Boqueirão, Gargalheiras, and Dourado), investigating their contribution to maintaining diversity. Sediment samples were collected in April 2025, dried, and incubated in microcosms for 51 days, with hatching monitored every two days; the active community was simultaneously sampled in the water column. Nine species were recorded in the passive community, with a predominance of thecamoebae and Bdelloidea rotifers. The number of

hatches and richness differed significantly between reservoirs (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), with Gargalheiras having the lowest values. The comparison between active and passive species revealed little overlap but highlighted the potential of propagule banks to complement the zooplankton fauna. The results indicate that, although they do not fully reflect the active community, dormant form banks play an important role in the resilience and recovery of populations in ecosystems subject to hydrological extremes.

Keywords: Zooplankton, Dormancy, Semi-arid Reservoirs.

Introdução

As regiões semiáridas estão entre as mais vulneráveis às mudanças climáticas, frequentemente sujeitas a longos períodos de seca que impactam diretamente os reservatórios. Esses eventos extremos comprometem o abastecimento de água, os serviços ecossistêmicos e a biodiversidade aquática (Braga et al., 2015). Durante secas prolongadas, os reservatórios podem sofrer reduções drásticas no volume de água ou até a desidratação completa, ocasionando o colapso temporário de suas populações biológicas (Barbosa et al., 2012). A perda desses organismos compromete processos ecológicos essenciais e dificulta a recuperação dos ecossistemas após o retorno das chuvas.

O zooplâncton desempenha um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos. Constituído principalmente por microcrustáceos (Cladocera e Copepoda), rotíferos e protozoários (amebas testáceas e ciliados), o zooplâncton é essencial no fluxo de energia e na ciclagem de nutrientes, atuando como elo entre os produtores primários, como o fitoplâncton, e os níveis superiores da teia trófica, como peixes e outros organismos aquáticos (Allan, 1976; Litchman et al., 2013; Esteves, 2011). Além de sua importância na cadeia alimentar, esses organismos contribuem para o controle da biomassa fitoplanctônica e eutrofização. Assim, desempenham papel crucial na regulação da qualidade da água e na manutenção da estabilidade ecológica em lagos, rios e reservatórios (De-Carli et al, 2018; Declerck e De Senerpont Domis, 2023).

Em ambientes sujeitos a variações extremas, como as regiões semiáridas, os organismos zooplânctônicos enfrentam desafios significativos para sua sobrevivência (Vargas et al. 2019). Alguns desenvolvem estratégias de dormência, que configuram a comunidade passiva de zooplâncton, como a produção de ovos de resistência (i.e., diapausa) ou estágios de quiescência (i.e., redução da atividade metabólica), permitindo a perpetuação das populações ou a recolonização de ambientes anteriormente desfavoráveis (Santangelo, 2009; Fialek, 2018). Essas formas dormentes ficam depositadas no sedimento, formando um banco capaz de resistir ao dessecamento, à salinidade e a altas temperaturas. Quando as condições ambientais se tornam favoráveis, essas formas eclodem, possibilitando a recuperação das populações e o restabelecimento da estrutura ecológica (Hairston, 1996; Brendonck 2017).

Considerando a relevância das formas dormentes para a persistência e resiliência das populações de zooplâncton em ecossistemas semiáridos, este estudo teve como objetivo estimular e avaliar a eclosão dessas formas a partir do sedimento de três reservatórios do Rio Grande do Norte, investigando o papel do banco na manutenção e recuperação das populações diante de variações ambientais.

Metodologia

Área de estudo

O estudo foi realizado em três reservatórios situados na bacia hidrográfica do rio Piranhas-Açu, no estado do Rio Grande do Norte: Gargalheiras, Boqueirão e Dourado. Esses reservatórios possuem grande importância socioambiental, desempenhando papel essencial no abastecimento de água para consumo humano e irrigação, além de contribuírem para a diversidade ambiental e a economia local, por meio da pesca, turismo e lazer (Rebouças, 1997; Barbosa et al., 2012). O reservatório Boqueirão, localizado no município de Parelhas, é o maior dos três, com capacidade acumulativa de 84,79 milhões de metros cúbicos e altura máxima da barragem de 29 metros. O Gargalheiras, que se encontra no município de Acari, possui capacidade de armazenamento de aproximadamente 44,42 milhões de metros cúbicos e altura de 26,5 metros, enquanto o Dourado, município de Currais Novos, apresenta capacidade de 10,32 milhões de metros cúbicos e altura de 14,5 metros (SEMARH, 2025).

Amostragem de campo e experimento em laboratório

Para a amostragem e experimento de eclosão da comunidade passiva, foram coletadas amostras de sedimento em abril de 2025, por meio de subamostragens aleatórias realizadas em diferentes pontos de cada reservatório. A coleta foi feita utilizando um tubo de PVC (75 × 100 mm) como amostrador, abrangendo da superfície até aproximadamente 10 cm de profundidade. Após a coleta, em laboratório, o sedimento foi seco à temperatura ambiente e homogeneizado. Para o experimento de eclosão, foram criados microcosmos artificiais, sendo o sedimento alocado em recipientes plásticos, na quantidade de 100g, e hidratado com 300mL de água destilada, respeitando a proporção 1:3 para simular uma inundação persistente. Os microcosmos foram mantidos à temperatura ambiente, com base na média registrada para a região (~27°C), sob fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. O experimento foi conduzido por 51 dias, com coletas realizadas a cada dois dias para a quantificação dos organismos zooplânctônicos presentes na água dos microcosmos. Esse procedimento visa garantir que os organismos registrados sejam provenientes da eclosão de formas dormentes presentes no sedimento, e não da reprodução dos organismos já eclodidos (Nielsen et al., 2013). A cada amostragem, a água dos microcosmos foi filtrada com rede de plâncton de 68 µm e substituída por nova água destilada. Os organismos coletados foram quantificados e identificados em placas de Sedgewick-Rafter, sob microscópio óptico. Em cada amostra foi considerado ao menos três subamostras de alíquotas de 2ml, sendo o máximo 10 subamostras. Para cada grupo de zooplâncton (Copepoda, Cladocera, Rotifera e Protozoa – sendo o último considerado apenas amebas testáceas), foram contabilizados ao menos 50 indivíduos. A identificação taxonômica foi realizada até o menor nível possível, com base em literatura especializada (Koste, 1978; Gomes & Souza, 2008; Deflandre, 1929).

A comunidade ativa, ou seja, a comunidade de zooplâncton presente na coluna d'água foi amostrada por meio de arrastos verticais realizados com rede de plâncton de 68µm de malha, na região limnética dos reservatórios. As amostras foram fixadas com formol a 4% e armazenadas para análise em laboratório. A quantificação e identificação dos organismos seguiram o mesmo protocolo adotado para a comunidade passiva.

Análises estatísticas

A composição das comunidades ativa e passiva de zooplâncton foi analisada por meio de uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) (Clarke e Warwick 1994) e as diferenças testadas com a Permanova (Anderson 2001) e complementadas por ANOSIM, permitindo avaliar a tendência de separação entre ativa e passiva. Para esta análise, foi calculada a similaridade de Jaccard com base na presença ou ausência das espécies zooplânctônicas. Para verificar diferenças de abundância e riqueza de zooplâncton entre os

reservatórios, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

Resultados e Discussões

Eclosões de formas dormentes de zooplâncton (comunidade passiva), foram registradas nos três reservatórios, resultando em um total de 9 táxons, sendo 3 rotíferos, 3 cladóceros e 3 amebas testáceas (Tabela 1). A abundância de organismos eclodidos variou ao longo dos dias de incubação, com um pico acentuado no dia 37, e predominância de protozoários durante grande parte do experimento (Figura 1). A riqueza de espécies também apresentou alterações ao longo do tempo, com cladócero e rotíferos exibindo valores mais baixos em comparação às tecamebas (Figura 2).

O número de eclosões de zooplâncton apresentou diferenças significativas entre os reservatórios (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 9.0$, $df = 2$, $p = 0.01$). O pós-teste de Dunn indicou que as diferenças ocorreram principalmente entre Boqueirão de Parelhas (BO) e Gargalheiras (GA) ($p = 0.05$), e entre Dourado (DO) e Gargalheiras (GA) ($p = 0.01$), com GA apresentando expressivamente menor número de indivíduos que eclodiram. BO e DO não diferiram significativamente entre si (Figura 3).

A riqueza de espécies da comunidade passiva também apresentou diferenças significativas entre os reservatórios (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 6.1$, $df = 2$, $p = 0.04$). O pós-teste de Dunn indicou diferença marginal entre BO e GA ($p = 0.06$), enquanto as demais comparações não foram significativas (Figura 4). De forma geral, GA apresentou a menor diversidade, DO a maior e BO valores intermediários.

A NMDS indicou uma tendência de separação entre as comunidades ativa (AT) e passiva (PA) ao longo dos reservatórios (Figura 5). A comunidade ativa apresentou uma tendência de composição de espécies distinta da passiva (ANOSIM: $R = 0.92$; $p = 0.10$), que pode não ter se confirmado estatisticamente devido ao baixo número amostral. De forma semelhante, 64% da variação na composição das espécies foi explicada pela comunidade (PERMANOVA: $p = 0.10$). O diagrama de Venn (Figura 6) evidenciou que a comunidade ativa apresentou maior número de espécies exclusivas (13 táxons; 59%), enquanto a passiva apresentou 4 espécies exclusivas (18%), com 5 espécies compartilhadas entre ambas comunidades (23%).

Nas comunidades ativas, observou-se diversidade expressiva de rotíferos, cladóceros e copépodes, enquanto nas passivas predominaram as tecamebas e os rotíferos Bdelloidea, que foram o grupo mais abundante e presente em todas as amostras do experimento, mas ausentes na ativa (Tabela 1). Entre as espécies, *Centropyxis aculeata* (Ehrenberg, 1831) Stein, 1859 destacou-se como a única presente tanto na ativa quanto na passiva em todos os reservatórios, evidenciando a persistência desse táxon no sedimento e na coluna d'água.

No reservatório de Boqueirão, a comunidade ativa apresentou elevada diversidade de microcrustáceos, incluindo cladóceros como *Ceriodaphnia cornuta* (Sars, 1885), *Moina minuta* (Hansen, 1899) e *Bosmina sp.*, copépodes como *Notodiaptomus iheringi* (Wright, 1935), *Thermocyclops sp.*, copepoditos e náuplios e rotíferos de diversos gêneros (e.g., *Brachionus*, *Keratella*, *Platyonus*). A comunidade passiva foi dominada principalmente por tecamebas (*Euglypha* e *C. aculeata*) e por rotíferos Bdelloidea, que se mantiveram abundantes ao longo do experimento. Entre ativa e passiva, apenas *C. aculeata* e *C. cornuta*

foram compartilhadas, enquanto os demais microcrustáceos e rotíferos permaneceram exclusivos da ativa.

No reservatório de Gargalheiras, a comunidade passiva apresentou baixa diversidade, composta principalmente por tecamebas e rotíferos Bdelloidea, com abundância constante ao longo do experimento. A comunidade ativa foi caracterizada por grande abundância de rotíferos, principalmente *Brachionus calyciflorus* (Pallas, 1766) e *Keratella tropica* (Apstein, 1907), acompanhados por cladóceros e copépodes. Entre ativa e passiva, a única espécie compartilhada foi *C. aculeata*, enquanto os demais rotíferos e microcrustáceos permaneceram exclusivos da ativa.

O reservatório de Dourado apresentou maior riqueza. A comunidade passiva foi inicialmente formada por cladóceros e rotíferos presentes tanto na passiva quanto na ativa (*Diaphanosoma*, *C. cornuta*, *Brachionus falcatus* (Zacharias, 1898) e *Filinia longiseta* (Ehrenberg, 1834), mas rapidamente passou a ser dominada por tecamebas e rotíferos Bdelloidea, sem retorno das espécies iniciais. No final do experimento, surgiram alguns indivíduos do cladóceros *Ilyocryptus sp.*, exclusivos da passiva. A comunidade ativa apresentou elevada abundância do copépode calanóide *Notodiaptomus iheringi*, acompanhada por rotíferos como *B. falcatus* e *Epiphanes clavulata* (Ehrb. 1832), além de cladóceros. Entre ativa e passiva, cinco das seis espécies que eclodiram nesse reservatório foram compartilhadas (*Diaphanosoma*, *C. cornuta*, *B. falcatus*, *Filinia longiseta* e *C. aculeata*), evidenciando a importância do banco de propágulos para complementar a fauna aquática ao longo do tempo.

Esse padrão indica que o banco de formas dormentes não representa completamente a comunidade ativa, mas contribui com uma fração importante das espécies. As diferenças podem refletir variações nas condições ambientais entre os períodos amostrados, como disponibilidade de nutrientes, volume de água e temperatura, que influenciam tanto a composição do banco de propágulos quanto à probabilidade de eclosão (Cáceres, 1998; Vandekerckhove et al. 2004). Dessa forma, o banco de formas dormentes funciona como um reservatório parcial da diversidade zooplânctônica, atuando como fonte e complemento da comunidade ativa em condições ambientais favoráveis, além de servir como uma memória do ambiente (Fialek, 2018).

Conclusão

O estudo demonstrou que o banco de formas dormentes do zooplâncton contribui para a manutenção da diversidade nos reservatórios do semiárido, funcionando como uma reserva biológica capaz de sustentar a resiliência das comunidades diante de condições ambientais adversas. As diferenças observadas entre os reservatórios indicam que fatores locais podem influenciar tanto a composição quanto a eclosão das formas dormentes, reforçando a relevância de investigar esses mecanismos adaptativos para compreender a persistência e a dinâmica do zooplâncton em ecossistemas sujeitos a variações hidrológicas extremas.

Referências

ALLAN, J. David. Life history patterns in zooplankton. **The American Naturalist**, v. 110, n. 971, p. 165-180, 1976.

BARBOSA, José Etham de Lucena et al. Aquatic systems in semi-arid Brazil: limnology and management. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, p. 103-118, 2012.

BRAGA, Gustavo Girão et al. Influence of extended drought on water quality in tropical reservoirs in a semiarid region. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 27, n. 1, p. 15-23, 2015.

BRENDONCK, Luc; PINCEEL, Tom; ORTELLS, Raquel. Dormancy and dispersal as mediators of zooplankton population and community dynamics along a hydrological disturbance gradient in inland temporary pools. **Hydrobiologia**, v. 796, n. 1, p. 201-222, 2017.

CÁCERES, Carla E. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. **Ecology**, v. 79, n. 5, p. 1699-1710, 1998.

DECLERCK, Steven AJ; DE SENERPONT DOMIS, Lisette N. Contribution of freshwater metazooplankton to aquatic ecosystem services: an overview. **Hydrobiologia**, v. 850, n. 12, p. 2795-2810, 2023.

DE-CARLI, Bruno P. et al. Comunidade zooplanctônica e sua relação com a qualidade da água em reservatórios do Estado de São Paulo. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 108, p. e2018013, 2018.

ESTEVES, F. de A. Fundamentos de limnologia. 3. ed. **Rio de Janeiro: Interciência**, 2011.

FIALEK, Cláudia Golec. **Restabelecimento da comunidade zooplanctônica em uma lagoa temporária Neotropical: regime hidrológico e formas de dormência**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

HAIRSTON JR, Nelson G. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 5, p. 1087-1092, 1996.

LITCHMAN, Elena; OHMAN, Mark D.; KIØRBOE, Thomas. Trait-based approaches to zooplankton communities. **Journal of plankton research**, v. 35, n. 3, p. 473-484, 2013.

NIELSEN, Daryl L. et al. Empirical evidence linking increased hydrologic stability with decreased biotic diversity within wetlands. **Hydrobiologia**, v. 708, n. 1, p. 81-96, 2013.

REBOUÇAS, Aldo da C. Água na região Nordeste: desperdício e escassez. **Estudos avançados**, v. 11, p. 127-154, 1997.

SEMARH - Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos do Rio Grande do Norte. Disponível em: <<http://www.semarh.rn.gov.br/>>. Acesso em: 07 ago. 2025.

SANTANGELO, J. M. Produção, eclosão e implicações ecológicas e evolutivas dos estágios dormentes do zooplâncton. **Limnotemas**, v. 7, p. 1-26, 2009.

VANDEKERKHOVE, Jochen et al. Hatching rate and hatching success with and without isolation of zooplankton resting stages. **Hydrobiologia**, v. 526, n. 1, p. 235-241, 2004.

VARGAS, Anderson L.; SANTANGELO, Jayme M.; BOZELLI, Reinaldo L. Recovery from drought: viability and hatching patterns of hydrated and desiccated zooplankton resting eggs. **International Review of Hydrobiology**, v. 104, n. 1-2, p. 26-33, 2019.

Anexos

Figura 1. Número de organismos eclodidos do sedimento ao longo do experimento nos três reservatórios do semiárido nordestino (Gargalheiras, Dourado e Boqueirão).

Figura 2. Riqueza total de espécies de zooplâncton que eclodiram do sedimento ao longo do experimento nos reservatórios Gargalheiras, Dourado e Boqueirão.

Tabela 1. Lista de táxons de zooplâncton das comunidades ativa (AT) e passiva (PA) de reservatórios do semiárido nordestino.

Figura 3. Abundância total de zooplâncton que eclodiu do sedimento em cada reservatório (BO, GA e DO) ao longo do experimento.

Figura 4. Riqueza de espécies de zooplâncton eclodido do sedimento em cada reservatório (BO, GA e DO) ao longo do experimento.

Figura 5. Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), representando a composição de espécies de zooplâncton das comunidades ativa (AT) e passiva (PA) nos reservatórios Boqueirão (BO), Gargalheiras (GA) e Dourado (DO).

Figura 6. Diagrama de Venn ilustrando o número de espécies exclusivas e compartilhadas entre as comunidades ativa (AT) e passiva (PA) nos reservatórios estudados.

CÓDIGO: SB1519

AUTOR: SARA MARIANA DOS SANTOS

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Influência de métricas da paisagem nos parâmetros reprodutivos de *Coryphospingus pileatus*

Resumo

Apesar de o tico-tico-rei-cinza (*Coryphospingus pileatus*) ser uma espécie relativamente comum na Caatinga, informações detalhadas sobre sua biologia reprodutiva ainda são escassas. O presente estudo descreve características dos ninhos, ovos e o sucesso reprodutivo da espécie em uma floresta tropical sazonalmente seca, na Floresta Nacional de Açu (RN). Foram realizados levantamentos entre dezembro de 2024 e julho de 2025 em 19 sítios de amostragem. Registramos cinco ninhos ativos entre fevereiro e abril de 2025, a maioria na fase de ovos. Os ninhos apresentaram formato semiesférico (tigela), construídos com fibras vegetais entrelaçadas, medindo em média $7,2 \pm 0,6$ cm de diâmetro externo, $5,8 \pm 0,6$ cm de diâmetro interno, $3,4 \pm 0,5$ cm de profundidade e localizados a $71,0 \pm 34,8$ cm do solo. Os ovos eram ovóides, brancos e sem manchas, com comprimento médio de $18,88 \pm 0,56$ mm, largura de $13,46 \pm 0,44$ mm e peso de $1,77 \pm 0,14$ g. O tamanho da postura foi de dois ovos ($n=4$). Dos quatro ninhos monitorados, dois tiveram sucesso reprodutivo, enquanto os demais foram predados, totalizando uma taxa de sucesso de 50%. Foram documentados como predadores a gralha-cancã (*Cyanocorax cyanopogon*) e a serpente *Leptophis dibernardoi*, sendo este o primeiro registro de predadores de ninhos para o gênero *Coryphospingus*. Nossos resultados reforçam a importância de estudos básicos sobre a história natural de aves da Caatinga, destacando a predação como fator chave no insucesso reprodutivo da espécie e

Palavras-chave: Caatinga. Conservação. História natural. Nidificação. Predação.

TITLE: Reproductive aspects of *Coryphospingus pileatus* in a Seasonally Dry Tropical Forest

Abstract

Although the Grey Pileated Finch (*Coryphospingus pileatus*) is a relatively common species in the Caatinga, detailed information on its reproductive biology remains scarce. This study describes nest characteristics, egg morphology, and reproductive success of the species in a seasonally dry tropical forest, at the Açu National Forest (RN, Brazil). Fieldwork was conducted between December 2024 and July 2025 across 19 sampling sites. We recorded five active nests between February and April 2025, most of them in the egg stage. The nests were hemispherical cup-shaped, built with interwoven plant fibers, averaging 7.2 ± 0.6 cm in external diameter, 5.8 ± 0.6 cm in internal diameter, 3.4 ± 0.5 cm in depth, and located 71.0 ± 34.8 cm above ground. Eggs were ovoid, white, and unspotted, with an average length of 18.88 ± 0.56 mm, width of 13.46 ± 0.44 mm, and weight of 1.77 ± 0.14 g. Clutch size was two eggs ($n=4$). Of the four monitored nests, two were successful while the others were predated, resulting in a reproductive success rate of 50%. Predators documented included the

White-naped Jay (*Cyanocorax cyanopogon*) and the snake *Leptophis dibernardoi*, the latter being the first record of nest predation for the genus *Coryphospingus*. Our results highlight the importance of natural history studies on Caatinga birds, emphasizing predation as a key factor limiting reproductive success, and reinforcing the need for further research on adaptive strategies in semi-arid environments.

Keywords: Caatinga. Conservation. Natural History. Nesting. Predation.

Introdução

A reprodução é um dos processos centrais na história de vida das aves, pois garante a continuidade das espécies e influencia diretamente sua sobrevivência e sucesso evolutivo (Marini et al. 2009; Ricklefs, 1990). No entanto, significa uma fase que demanda alto custo energético e envolve riscos, exigindo que os indivíduos realizem escolhas estratégicas ao longo do ciclo reprodutivo (Williams, 1966; Ricklefs, 2000). Entre essas decisões, estão aspectos como a seleção do local de nidificação, o investimento no cuidado parental e a defesa do território, que variam de acordo com as pressões ambientais e as características da espécie (Pough et al. 2003; Stutchbury e Morton, 2022). Essas estratégias são moldadas pela seleção natural, de forma a potencializar a aptidão reprodutiva em diferentes contextos ecológicos (Mason, 1985).

O estudo da biologia reprodutiva permite compreender não apenas como as aves se reproduzem, mas também como elas respondem a pressões ambientais, interações ecológicas e mudanças no habitat (Brown, 1987; Bennett e Owens, 2012). Parâmetros como tamanho da ninhada, formato e composição dos ninhos, duração da incubação e cuidados parentais são fundamentais para desvendar padrões evolutivos e comportamentais (Medeiros e Marini, 2007).

No entanto, a escassez de informações sobre a biologia reprodutiva de aves ainda representa um grande desafio para a compreensão completa da história de vida das espécies. De acordo com Xiao et al. 2017, apenas cerca de 30% das quase 10.000 espécies de aves conhecidas no mundo possuem dados completos sobre os principais parâmetros reprodutivos (tamanho da ninhada, período de incubação e período de permanência no ninho) e aproximadamente 30% das espécies não possuem qualquer dado sobre esses parâmetros. Isso evidencia a urgência de estudos voltados à descrição básica da reprodução dessas aves, não apenas para preencher a falta de dados taxonômicos e geográficos, mas também para fortalecer dados sobre padrões evolutivos e estratégias reprodutivas ao redor do mundo (Xiao et al. 2017).

O tico-tico-rei-cinza (*Coryphospingus pileatus*), é um Passeriforme pertencente à família Thraupidae (Pacheco et al. 2021), uma espécie de pequeno porte, medindo cerca de 13,5 cm de comprimento (de Moura et al. 2018). Destaca-se por cauda curta, crista evidente e bico robusto e curvado, características ligadas à dieta granívora-insetívora (Jaramillo, 2020; Poulin et al., 1993; Araújo, 2019). Apresenta dimorfismo sexual: o macho exibe crista vermelha com faixa preta em “V” no centro, enquanto a fêmea possui plumagem discreta, com dorso e píleo acastanhados e restante do corpo acinzentado (Burns e Racicot, 2009; (Ridgely e Tudor, 1994; Tavares-Damasceno et al., 2017; Moura, 2016). Habita regiões áridas e de baixa altitude, geralmente em bosques abertos e matagais, ocorrendo do norte da América do Sul (incluindo Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa) a grande parte do Brasil, especialmente no Nordeste, onde é amplamente distribuída (Santos 2004; Olmos et al. 2005; Silva et al. 2012), Centro-Oeste, Leste e parte do Sudeste (Stotz et al. 1996; Ridgely e Tudor 2009; Cestari e Pacheco, 2010). A espécie constrói ninhos em formato de tigela semi-esférica, onde

suas ninhadas variam de dois a cinco ovos brancos e sem manchas, podendo realizar até três ninhadas por temporada reprodutiva (Jaramillo, 2020). Apenas as fêmeas incubam os ovos, enquanto os machos participam dos cuidados com os ninhegos (Jaramillo, 2020; Zima e Francisco, 2016). Apesar dessas informações básicas, ainda há lacunas na literatura sobre aspectos mais detalhados de sua biologia reprodutiva.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo ampliar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva de *Coryphospingus pileatus*, contribuindo para a compreensão de seus padrões ecológicos e fornecendo subsídios para ações de conservação da espécie e de seu habitat.

Metodologia

Área de estudo

O estudo foi realizado na Floresta Nacional de Açu (FLONA), uma Unidade de Conservação Federal (UC), localizada no município de Açu, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil (5° 32' 8" S e 5° 35' 4" S e 36° 56' 02" O e 36° 57' 56"). A FLONA de Açu possui uma área total de 225,02 hectares (ICMBIO 2019) e está inserida na margem da bacia sedimentar Potiguar (Maia e Bezerra, 2015), integrando portanto, a parte da maior floresta tropical sazonalmente seca nos Neotrópicos, a Caatinga (Miles et al. 2006).

O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo "BswH", caracterizando-se como seco e muito quente (Dubreuil et al., 2018). A temperatura média anual é de 28,1°C, e a umidade relativa do ar gira em torno de 70% (IDEMA, 2008). A precipitação anual é em torno de 646 mm, e a vegetação predominante é do tipo arbórea-arbustiva densa (IDEMA, 2018). Apresenta predominância de solos rasos, inteperizados e pedregosos, com baixa capacidade de retenção de água através do regime de chuvas, entretanto, ainda assim, demonstram fertilidade e adequação para agricultura em alguns locais (Araújo, 2019).

Coleta de dados

As buscas por ninhos foram realizadas no período de dezembro de 2024 à julho de 2025 em 19 buffer com raio de 80 m², cada buffer foi espaçado por no mínimo 500 metros. Para a localização dos ninhos dentro dos buffers, foi utilizada a metodologia de Martin e Geupel (1993) onde toda vegetação foi vasculhada, além disso o comportamento das aves adultas também foi observado, especialmente o transporte de material para construção de ninhos ou alimentação dos ninhegos (Marini et al., 2010). Cada ninho localizado foi inspecionado imediatamente para verificar seu status (vazio, ovo ou ninhego) e classificado como ativo ou inativo. Todos os ninhos foram georreferenciados com o uso do GPS Garmin Oregon 650 e numerados sequencialmente. Durante o monitoramento, foram registrados dados sobre o período reprodutivo, tamanho da ninhada, tempo de incubação e sucesso reprodutivo. Nos ninhos ativos foram utilizadas câmeras trap posicionadas horizontalmente entre 1 e 3 metros de cada ninho, de acordo com a disponibilidade de galhos adequados. As câmeras foram programadas para captar vídeos de 30 segundos. Independentemente das gravações dos equipamentos, a predação foi considerada quando os ovos ou os filhotes desapareceram do ninho. Apresentamos as medidas como média $\pm$ desvio padrão.

Resultados e Discussões

Iniciamos o período de busca ativa de ninhos na Floresta Nacional de Açu entre dezembro de 2024 a julho de 2025. Registramos um total de cinco ninhos ativos de *Coryphospingus pileatus*, entre fevereiro e março de 2025. Os ninhos foram encontrados no mês de março ($n = 3$), os meses de fevereiro e abril tiveram apenas um ninho. A quantidade de ninhos encontrados no presente estudo foi semelhante ao encontrado para *C. cucullatus*, que em quatro estações reprodutivas, encontraram 16 ninhos (Zima e Francisco, 2016).

O início do período reprodutivo de muitas espécies de aves na Caatinga está intimamente associado ao início das chuvas, uma vez que esse fator ambiental influencia diretamente a disponibilidade de recursos necessários à reprodução (Cavalcanti et al. 2016; Rodrigues e Pichorim, 2022). Segundo dados da EMPARN (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte), os primeiros meses do ano de 2024, fevereiro, março e abril, correspondem ao pico do período chuvoso na região. Em 2025, os índices pluviométricos registrados na mesorregião Oeste Potiguar, que abrange o município de Assú (RN), foram de 101,2 mm, 144,5 mm e 83,1 mm, respectivamente. Esses valores confirmam a tendência de maior volume de chuvas no início do ano. Esse padrão pode explicar a sobreposição entre o período reprodutivo da maioria das aves e o auge das chuvas, justamente nos meses em que foram encontrados os ninhos na área estudada.

A maioria dos ninhos foram encontrados na fase de ovos ($n = 3$). Os ninhos apresentavam uma forma semiesférica (formato de tigela), com paredes densas e bem compactadas. As construções eram predominantemente compostas por fibras vegetais bem entrelaçadas. Pedacos de folhas secas e outros pedacos de estruturas vegetais estavam aderidos principalmente à camada externa do ninho, formando um revestimento bem definido. Embora o uso de teias de aranha tenha sido documentado para *C. cucullatus*, até o momento não foi possível confirmar a presença desse material nos ninhos observados no presente estudo (Zima e Francisco, 2016) (Fig. 01).

As medidas médias dos ninhos foram: diâmetro externo de $7,2 \pm 0,6$ cm, diâmetro interno de $5,8 \pm 0,6$ cm, profundidade interna de $3,4 \pm 0,5$ cm e altura total do ninho em relação ao solo de $71,0 \pm 34,8$ cm ($n = 4$). Esses dados são semelhantes ao encontrado para *C. cucullatus* (Zima e Francisco 2016), cujos ninhos apresentaram diâmetro externo médio de $7,41 \pm 0,50$ cm, diâmetro interno de $5,29 \pm 0,42$ cm, altura externa de $4,22 \pm 0,47$ cm, altura interna de $3,19 \pm 0,40$ cm e altura em relação ao solo de $2,04 \pm 0,59$ cm ($n = 7$) (Zima e Francisco, 2016).

Os ovos eram em formato ovóide, brancos e sem manchas, medindo em média $18,88 \pm 0,56$ mm de comprimento por $13,46 \pm 0,44$ mm de largura, com peso médio de $1,77 \pm 0,14$ g ($n = 5$). O tamanho da ninhada foi de dois ovos ($n = 4$) (Fig. 02).

Essas medidas são também semelhantes às observadas para *C. cucullatus*, cujos ovos mediram, em média, $19,26 \pm 0,70$ mm de comprimento, $14,03 \pm 0,23$ mm de largura e $1,9 \pm 0,17$ g de peso ($n = 8$ ovos de quatro ninhos) (Zima e Francisco, 2016).

Os ninhegos nascem com os olhos fechados e cobertos por uma penugem cinza-escura. Na imagem (Fig. 03) o ninhego possui poucos dias de vida, apresenta comissura labial de coloração amarelada, plumas e canhões de penas visíveis nas pterílias capital, umeral, alar, ventral, espinal, femoral e crural, com coloração cinza-escura.

Dos quatro ninhos monitorados de *C. pileatus*, dois apresentaram sucesso reprodutivo, enquanto dois foram predados ainda na fase de ovos. Durante o período de nidificação, ovos

e filhotes, muitas vezes imóveis e indefesos, tornam-se presas nutritivas e vulneráveis à predação, sendo alvos recorrentes de uma diversidade de predadores (Sotherland e Rahn 1987).

Ao longo do monitoramento, foram registrados dois predadores de ninhos, a gralha-cancã (*Cyanocorax cyanopogon*), uma ave da família Corvidae, de médio porte, endêmica do Brasil, habita áreas de matagal seco e florestas secas no Cerrado e na Caatinga, alimentando-se de recursos tanto animais quanto vegetais, incluindo eventualmente a predação de ovos e filhotes de outras aves (Sick, 1997; Ten Caten et al., 2007; Rodrigues e Pichorim, 2022; Olmos e Albano, 2012; Barbosa da Silva, 2020). O outro predador aqui documentado, foi a serpente *Leptophis dibernardoi*, da família Colubridae, uma serpente diurna de médio porte que pode ser encontrada tanto no solo quanto em árvores, onde se alimenta de anfíbios, lagartos e aves (Vitt e Vangilder, 1983; de Albuquerque et al., 2007; Ribeiro et al., 2014). Vale ressaltar que o presente trabalho é o primeiro a apresentar informações sobre predadores de ninhos para o gênero *Coryphospingus*.

Os registros dos predadores foram documentados por meio de armadilhas fotográficas (câmeras trap), que atualmente constituem o método mais preciso e eficaz para a identificação de predadores de ninhos (Menezes e Marini, 2017). Vale destacar que essas espécies pertencem a famílias reconhecidas como entre as principais responsáveis pela predação de ninhos, conforme também apontado por Menezes e Marini (2017). A presença desses predadores reforça sua importância como agentes de predação de ninhos na Caatinga, embora sejam ainda escassos os registros específicos de predação sobre o gênero *Coryphospingus*. Dessa forma, conhecer quais são os predadores é essencial para entender a dinâmica e os padrões associados aos eventos de predação (Weatherhead e Blouin-Demers, 2004).

Apesar da predação ter sido a principal causa de insucesso reprodutivo, como já observado em diversos estudos com aves tropicais, nossos dados reforçam a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os fatores que afetam a reprodução de aves em ambientes secos. A Caatinga, permanece como um dos biomas menos investigados sob essa perspectiva (Leal et al. 2003). Trabalhos de história natural, como o presente, são fundamentais para diminuir a falta de informações sobre os aspectos biológicos básicos da ecologia das espécies. Considerando que poucos estudos com biologia reprodutiva com aves vêm sendo realizados nesse bioma (Vilas-bôas, 2013; Medeiros e Marini, 2007), reforçamos a importância e urgência de ampliar esforços de pesquisa sobre a avifauna da Caatinga, com foco em aspectos reprodutivos e nas ameaças que impactam diretamente o sucesso de nidificação das espécies.

Conclusão

Finalmente, neste estudo apresentamos novos dados sobre a biologia reprodutiva de *C. pileatus*, contribuindo para o entendimento de sua história natural e dos aspectos ecológicos desta espécie na Caatinga. Aqui, descrevemos características estruturais dos ninhos, além de parâmetros como tamanho das posturas, medidas dos ninhos e ovos, bem como o período reprodutivo. O sucesso reprodutivo foi limitado, sendo a predação identificada como a principal causa de insucesso. A gralha-cancã *C. cyanopogon* e a serpente *L. dibernardoi* foram registradas como predadores de ninhos da espécie. Esses registros reforçam a importância de investigações sobre a interação entre aves e seus predadores naturais, especialmente em paisagens fragmentadas. Os dados obtidos podem fornecer contribuições

importantes para pesquisas posteriores sobre ecologia reprodutiva de *C. pileatus* e destacam a necessidade de estratégias de conservação voltadas à mitigação da pressão da predação sobre aves que nidificam em regiões tropicais sazonalmente secas como a Caatinga.

Referências

- Araújo, João Paulo Rodrigues de. Vulnerabilidade natural, ambiental e uso e ocupação no município de Assú/RN. 2019. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2019.
- Araújo, O. Á. M. D. (2019). Impacto da seca sobre a vegetação da floresta nacional de Açú-RN.
- Barbosa da Silva, L. (2020). Vocal mimicry of raptor by the White-naped Jay (*Cyanocorax cyanopogon*) during a dispute over food resources. *Atualidades Ornitológicas*, (217).
- Bennett, P. M., e Owens, I. P. (2002). *Evolutionary ecology of birds: life histories, mating systems, and extinction*. Oxford University Press.
- Brown, J. L. (1987). *Helping and communal breeding in birds* Princeton University Press. Princeton, NJ.
- Burns, K. J., e Racicot, R. A. (2009). Molecular phylogenetics of a clade of lowland tanagers: Implications for avian participation in the Great American Interchange. *The Auk*, 126(3), 635-648.
- Cavalcanti, L. M. P., Paiva, L. V. D., e França, L. F. (2016). Effects of rainfall on bird reproduction in a semi-arid Neotropical region. *Zoologia (curitiba)*, 33(06), e20160018.
- Cestari, C., e Pacheco, J. F. (2010). Aves, *Emberizidae*, *Coryphospingus pileatus* (Wied, 1821): a new gathered bird species to São Paulo state and evidences of southern geographic expansion in Brazil.
- de Albuquerque, N. R., Galatti, U., e Di-Bernardo, M. (2007). Diet and feeding behaviour of the Neotropical parrot snake (*Leptophis ahaetulla*) in northern Brazil. *Journal of Natural History*, 41(17-20), 1237-1243.
- de Moura, P.T.S., de Paiva, L.V., de Oliveira Silva, C.C. et al. Rainfall and population dynamics of Grey Pileated Finch *Coryphospingus pileatus* (Aves: Passeriformes) in a Neotropical dry forest. *Popul Ecol* 60, 223–235 (2018).
- Dubreuil, V., Fante, K. P., Planchon, O., e Neto, J. L. S. A. (2018). The types of annual climates in Brazil: an application of the classification of Köppen from 1961 to 2015. *Confins-Revue franco-brésilienne de géographie/Revista franco-brasileira de geografia*, (37).
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIO DO RIO GRANDE DO NORTE (EMPARN). Relatório pluviométrico Disponível em: <https://meteorologia.emparn.rn.gov.br/relatorios/relatorios-pluviometricos>. Acesso em 10 de maio de 2025.

ICMBio. (2019). Plano de Manejo da Floresta Nacional de Açu. Disponível em:
<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/caatinga/lista-de-ucs/flona-de-acu>.

IDEMA (Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente - RN). 2008. Perfil do seu município. Disponível em <http://www.idema.rn.gov.br/Conteudo.asp?TRAN=PASTACeTARG=875eACT=ePAGE=ePARM=eLBL>.

Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte – IDEMA. Perfil do seu município - Assú. [cited 2018 abr. 5] Available from: <http://adcon.rn.gov.br/ACERVVO/idema/DOC/DOC000000000016656.PDF>.

Jaramillo, A. (2020). versão 1.0. In *Aves do Mundo* (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D. A. Christie e E. de Juana, Editores). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, EUA.
<https://doi.org/10.2173/bow.pilfin1.01>.

Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC, Barros, MLB. 2003. *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife, PE: Ed. Universitária da UFPE, 822 p.

Maia, R. P., e Bezerra, F. H. R. (2015). Potiguar Basin: diversity of landscapes in the Brazilian equatorial margin. *Landscapes and landforms of Brazil*, 147-156.

Mason, P. (1985). The nesting biology of some passerines of Buenos Aires, Argentina. *Ornithological monographs*, 954-972.

Medeiros, R. D., e Marini, M. Â. (2007). Biologia reprodutiva de *Elaenia chiriquensis* (Lawrence)(Aves, Tyrannidae) em Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24, 12-20.

Marini, M. Â., Lobo, Y., Lopes, L. E., França, L. F., e Paiva, L. V. D. (2009). Breeding biology of *Tyrannus savana* (Aves, Tyrannidae) in cerrado of central Brazil. *Biota Neotropica*, 9, 55-63.

Marini, M. Â., Duca, C., Manica, L. T. Técnicas de pesquisa em biologia reprodutiva de aves. In: Matter, S. V., Straube, F. C., Accordi, I., Piacentini, V., Cândido Jr., J. F. *Ornitologia e Conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento*. Rio de Janeiro: Editora Technical Books, 2010. p. 295-312.

Menezes, João CT; Marini, Miguel Ângelo. Predators of bird nests in the Neotropics: a review. *Journal of Field Ornithology*, v. 88, n. 2, p. 99-114, 2017.

Miles, L., Newton, A. C., DeFries, R. S., Ravilious, C., May, I., Blyth, S., ... e Gordon, J. E. (2006). A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of biogeography*, 33(3), 491-505.

Moura, P. T. S. D. (2016). Sazonalidade climática e dinâmica populacional de *Lanio pileatus* (Aves: Passariformis) em um semiárido Neotropical.

Olmos, F., Silva, W. A. D. G., e Albano, C. G. (2005). Aves em oito áreas de Caatinga no sul do Ceará e oeste de Pernambuco, nordeste do Brasil: composição, riqueza e similaridade. *Papéis avulsos de Zoologia*, 45, 179-199.

Olmos, F., e Albano, C. (2012). THE BIRDS OF THE SERRA DA CAPIVARA NATIONAL PARK AREA (PIAUI, BRAZIL). *REVISTA BRASILEIRA DE ORNITOLOGIA*, 20(3), 173-187.

Pacheco, J. F., Silveira, L. F., Aleixo, A., Agne, C. E., Bencke, G. A., Bravo, G. A., ... e PIACENTINI, Q. (2021). Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos—segunda edição. *Ornithology Research*, 29(2), 94-105.

Poulin, B., Lefebvre, G., e McNeil, R. A. Y. M. O. N. D. (1993). Variations in bird abundance in tropical arid and semi-arid habitats. *Ibis*, 135(4), 432-441.

Pough, F. H., Heiser, J. B., e McFarland, W. N. (2003). *A vida dos vertebrados (Vol. 3)*. São Paulo: Atheneu.

Ribeiro, M. M., Lima, G. S. T., Oliveira, D. V., e Freire, E. M. X. (2014). *Leptophis ahaetulla* (Parrot Snake). *Diet. Herpetological Review*, 45, 339.

Ricklefs, R.E. 1990. *The economy of nature: a textbook in basic ecology*. New York, Chiron Press, 470p.

Ricklefs, R. E. (2000). Density dependence, evolutionary optimization, and the diversification of avian life histories. *The Condor*, 102(1), 9-22.

Ridgely, R. S., e Tudor, G. (1994). *The birds of South America. Volume II. The suboscine passerines*. UNIVERSITY OF TEXAS PRESS, AUSTIN, TX(USA). 1994.

Ridgely, R. S., e Tudor, G. (2009). *Field guide to the songbirds of South America: the passerines*. University of Texas Press.

Rodrigues, M. C., e Pichorim, M. (2022). Uso do habitat por *Cyanocorax cyanopogon* (Aves, Corvidae) em uma floresta tropical sazonalmente seca no Brasil: inferindo estratégia usando modelos de ocupação. *CENTRO DE BIOCIÊNCIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLÓGIA*, 41.

Santos, M. P. D. (2004). As comunidades de aves em duas fisionomias da vegetação de Caatinga no estado do Piauí, Brasil. *Ararajuba*, 12(2), 113-123.

Sick H (1997) *Ornitologia brasileira*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

Silva, M. D., França, B. D. A., Irusta, J. B., Souto, G. H. B. O., Oliveira-Júnior, T. M., Rodrigues, M. C., e Pichorim, M. (2012). Aves de treze áreas de caatinga no Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 20(3), 312-328.

Sotherland, P. R., & Rahn, H. (1987). On the composition of bird eggs. *The Condor*, 89(1), 48-65.

Stotz, D. F., Fitzpatrick, J. W., & Parker, T. A., and DK Moskovits 1996. Neotropical Birds: Ecology and conservation.

Stutchbury, B. J., e Morton, E. S. (2022). Behavioral ecology of tropical birds. Academic press.

Tavares-Damasceno, J. P., de Souza Silveira, J. L. G., Câmara, T., de Castro Stedile, P., Macario, P., Toledo-Lima, G. S., e Pichorim, M. (2017). Effect of drought on demography of Pileated Finch (*Coryphospingus pileatus*: Thraupidae) in northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments*, 147, 63-70.

Ten Caten, H., de Oliveira, J. P. F., e Pascotto, M. C. (2007). Alimentação de *Cyanocorax cyanopogon* (Corvidae, Passeriformes, Aves) em uma área de Cerrado na região leste de Mato Grosso.

Vilas-Bôas, M. D. M. (2013). Dinâmica reprodutiva de aves da caatinga em uma área próxima ao rio São Francisco.

Anexos

Figura 01. Ninho ativo do tico-tico-rei-cinza (*Coryphospingus pileatus*), na Floresta Nacional de Açu, Assu, RN, 26 de fevereiro de 2025.

Figura 02. Ovos do Tico-tico-rei-cinza (*Coryphospingus pileatus*), na Floresta Nacional de Açu, Assu, RN, 7 de março de 2025.

Figura 3. Filhote do Tico-tico-rei-cinza (*Coryphospingus pileatus*), na Floresta Nacional de Açu, Assu, RN, em 21 de abril de 2025. Foto: Melo 2025.

CÓDIGO: SB1530

AUTOR: DIANA ANDRADE SAFIEH

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Análise dos níveis séricos de desidroepiandrosterona em pacientes com depressão resistente sujeitos a tratamento com cetamina

Resumo

Introdução: Potenciais biomarcadores podem representar uma elevada importância clínica para o diagnóstico e seguimento dos pacientes com transtorno depressivo maior. No entanto, ainda não há um biomarcador isolado capaz de fornecer informações sobre a resposta terapêutica do paciente.

Metodologia: Foi dosada a dehidroepiandrosterona (DHEA) em pacientes com transtorno depressivo maior (TDM) submetidos ao tratamento experimental com Cetamina após a sua aplicação nas 1ª, 4ª e 8ª semanas do tratamento, comparando os grupos submetidos somente à infusão da cetamina e àqueles submetidos à aplicação de cetamina associada a psicoterapia assistida.

Resultados: Foi observada uma redução dos níveis de DHEA sérico no grupo PAC, comparando à 8ª e a 4ª semana e nenhuma mudança foi observada no grupo Cetamina. Nenhuma diferença foi encontrada quando os grupos foram comparados entre as diferentes sessões (p-valores > 0,050).

Conclusão: A pequena amostra populacional e os resultados ainda pouco expressivos não são suficientes para definir o DHEA como marcador isolado para diagnóstico e prognóstico do TDM.

Palavras-chave: Dehidroepiandrosterona, Ketamina, Biomarcadores.

TITLE: Analysis of serum dehydroepiandrosterone (DEA) levels in patients with resistant depression undergoing ketamine treatment

Abstract

Introduction: Potential biomarkers may be of great clinical importance for the diagnosis and monitoring of patients with major depressive disorder. However, there is still no single biomarker capable of providing information on patient therapeutic response.

Methodology: Dehydroepiandrosterone (DHEA) levels were measured in patients with major depressive disorder (MDD) undergoing experimental ketamine treatment after administration in the first, fourth, and eighth weeks of treatment. The groups receiving ketamine infusion alone were compared with those receiving ketamine infusion combined with psychotherapy.

Results: A reduction in serum DHEA levels was observed in the CAP group compared to the eighth and fourth weeks, while no change was observed in the ketamine group. No differences were found when the groups were compared between the different sessions (p-values > 0.050).

Conclusion: The small population sample and the still insignificant results are not sufficient to define DHEA as an isolated marker for the diagnosis and prognosis of MDD.

Keywords: Dehidroepiandrosterona, Ketamina, Biomarcadores.

Introdução

O termo “depressão” apareceu pela primeira vez em 1960 para designar um estado de desânimo e de falta de interesse pela vida (QUEVEDO; GERALDO, 2013). Apesar disso, é um transtorno crônico bastante comum na sociedade e que interfere na vida diária de quem a possui. É caracterizada por um conjunto de fatores sociais, genéticos, psicológicos, biológicos e ambientais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que mais de 300 milhões de pessoas no mundo sofram com essa condição. No Brasil, a prevalência da depressão é de 15,5%, sendo mais incidente em mulheres.

A depressão possui diagnóstico clínico pelo psiquiatra a partir da presença de determinados sintomas e da frequência e intensidade com que aparecem, os quais os manuais psiquiátricos mundialmente reconhecidos e em vigor (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - DSM-IV, 1995; Organização Mundial de Saúde, CID-10, 1996-1997) relatam (RODRIGUES, 2000).

Atualmente, muitos estudos sobre o transtorno depressivo maior (TDM) focam na pesquisa de biomarcadores que possam indicar o estado biológico do paciente e a sua resposta ao tratamento (SCHMIDT, 2011). O uso de biomarcadores para transtornos mentais podem ser um forte aliado no diagnóstico e prognóstico desses pacientes, bem como para o seu acompanhamento terapêutico (LI, 2007). No entanto, ainda acredita-se que nenhum biomarcador por si só pode fornecer informações suficientes para auxiliar no diagnóstico de TDM ou apoiar a investigação de sua gravidade de forma isolada, sendo ainda uma avaliação eminentemente clínica (HACIMUSALAR, 2018).

A análise sérica de algumas substâncias em pacientes com TDM, como é o caso da dehidroepiandrosterona (DEA) um hormônio esteróide presente no sangue e que, dentre seus efeitos, vem sendo atribuída a remissão de alguns sintomas da depressão. É sabido, assim, que seus níveis em pacientes diagnosticados com depressão são inferiores. A DEA é produzida nas glândulas adrenais e atravessa a barreira hematoencefálica, onde pode ser convertida em hormônios sexuais ou pode agir diretamente em sistemas de neurotransmissores.

As ações biológicas do DHEA no cérebro envolvem neuroproteção, crescimento de neuritos, neurogênese e sobrevivência neuronal, apoptose, síntese e secreção de catecolaminas, bem como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiglicocorticoides. Além de influenciar na neuroesteroidogênese e a síntese/liberação de endorfinas (PLUCHINO, 2015)

A depressão resistente ao tratamento (DRT) é entendida como uma falha em responder a dois ou mais ensaios de monoterapia com fármaco antidepressivo ou ainda uma ausência de resposta a quatro ou mais ensaios de diferentes terapias antidepressivas (JOHNSTON K.M., 2019).

A administração da cetamina no homem promove o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e antagoniza os receptores de acetilcolina nicotínicos e muscarínicos, bem como os receptores monoaminérgicos e opióides (VASCONCELOS, S.M.M et al, 2005). Dessa forma, algumas pesquisas já indicaram que a cetamina, infundida em doses baixas, apresentou rápido efeito antidepressivo (MOHAMMED A., 2020).

Este estudo objetiva analisar os níveis de dehidroepiandrosterona (DEA) no sangue de pacientes com depressão resistente ao tratamento e que foram submetidos ao tratamento experimental com cetamina.

Metodologia

PARTICIPANTES E RECRUTAMENTO: : Recrutamos 48 pacientes com idade entre 18 e 65 anos com depressão resistente ao tratamento e com indicação para terapia com cetamina pela equipe de psiquiatria do HUOL. Os participantes serão identificados e recrutados no ambulatório de depressão do HUOL, e encaminhados para o estudo. Após fornecerem consentimento informado (TCLE), os participantes serão examinados inicialmente para determinar a elegibilidade para participar do estudo.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO: O estudo será restrito a pacientes em episódio depressivo moderado/severo atual, ocorrendo há pelo menos 4 semanas, e que já tenham feito uso de pelo menos dois medicamentos antidepressivos, em dose e duração adequadas. Os critérios de exclusão incluem condições físicas e mentais que impeçam o uso seguro de cetamina: hipertensão não controlada, insuficiência cardíaca congestiva ou outras evidências de comprometimento do estado cardíaco, DPOC, obesidade grave, aumento da pressão intracraniana ou cerebrospinal, gravidez, hipertireoidismo, resposta adversa prévia à cetamina, sintomas psicóticos presentes ou passados, 8 distúrbio de identidade dissociativo, distúrbio do espectro do autismo e sintomas prodrômicos da esquizofrenia. Indivíduos que não são elegíveis ou decidem não participar, retornarão ao tratamento padrão.

GRUPOS: Após inclusão no estudo, os participantes serão alocados aleatoriamente para dois diferentes grupos: o grupo que será submetido à PAC (n=24) e o grupo que será submetido exclusivamente à cetamina (n=24). Os pacientes serão distribuídos aleatoriamente entre os grupos e mediante disponibilidade de terapeutas para realização da PAC.

DESENHO EXPERIMENTAL: Dados demográficos e clínicos relacionados à doença serão registrados no início do estudo por meio de instrumentos de avaliação e de diferentes escalas. Todos os instrumentos serão aplicados de maneira similar em ambos os grupos terapêuticos. Serão coletados dados demográficos e clínicos da doença no encontro inicial do estudo. Sintomas de depressão serão monitorados pela escala clínica de Montgomery-Åsberg (MADRS, Montgomery-Asberg Depression Rating Scale). A coleta de amostras sanguíneas será conduzida antes das sessões inicial, quarta e oitava. Todas essas determinações serão efetuadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do HUOL. Os pacientes que serão submetidos à cetamina, terão 8 sessões de administração de cetamina subcutânea na forma de Dextrocetamina, à dose recomendada de 0,5 mg/kg na primeira infusão. Caso não haja resposta adequada, a segunda infusão deve ser realizada com dose de 0,75 mg/kg e as subseqüentes 1 mg/kg. Nesse processo de escalonamento, a dose mais baixa para a qual observarmos resposta (e.g., 0,5 ou 0,75 mg/kg) deve ser repetida ao longo do tratamento. O grupo submetido à PAC fará, além das aplicações de cetamina, uma terapia que consiste em três etapas conduzidas pelo Psicoterapeuta: Preparação, Experiência e Integração. A primeira fase consiste na preparação do paciente para vivência com a cetamina e ocorre logo que o paciente é incluído no estudo e dura, aproximadamente, 2 horas. A fase da experiência ocorre durante as aplicações da cetamina, quando o participante será também continuamente monitorado por um psicólogo treinado para manejar efeitos físicos, dissociativos, desregulação emocional e/ou somático pela evocação de experiências traumáticas. A fase 3, a de integração, ocorre um dia após a aplicação de cetamina e o objetivo principal é aproveitar a abertura da consciência para abordar de forma não diretiva a experiência.

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Nesse estudo, o DHEA foi utilizado como variável dependente, a sessão de dosagem de cetamina como variável de medida repetida, enquanto o grupo de tratamento (Cetamina ou Psicoterapia Assistida por Cetamina [PAC]) foi utilizado como variável independente e a idade como covariável. Antes de serem utilizados na estatística, os valores de DHEA foram transformados em $\log_{10}$. Para análise dos dados, foi utilizada a estratégia de intenção de tratar, no qual os casos ausentes foram substituídos pela média do grupo na respectiva sessão. Para testar o efeito dos tratamentos no DHEA ao longo das sessões, foi realizada uma análise de covariância de medidas repetidas (ANCOVA-MR) e pós-hoc de Holm. O tamanho de efeito relatado foi o d de Cohen. O nível de significância estatística foi $p < 0,050$.

Resultados e Discussões

Depois da análise do DHEA no sangue, coletado após as 1^a, 4^a e 8^a sessões de cetamina, dos 48 pacientes recrutados para o trabalho, foi encontrada uma interação entre sessão e grupo ($F(1,5, 71) = 5,625$, $p = 0,010$), no qual houve uma redução do DHEA na 8^a semana no grupo PAC, com relação à 1^a ($t = 4,207$, $p < 0.001$, $d = 0,453$) e à 4^a ($t = 5,654$, $p < 0.001$, $d = 0,608$) semana. Nenhuma mudança foi observada para o grupo Cetamina (p -valores $> 0,050$). Nenhuma diferença foi encontrada quando os grupos foram comparados entre as diferentes sessões (p -valores $> 0,050$).

A análise sérica do DHEA realizada nos pacientes dos dois diferentes grupos do nosso estudo foi feita considerando os resultados após as 1^a, 4^a e 8^a aplicações de cetamina nesses pacientes. Apesar de discretos, os resultados demonstraram uma evolução temporal dos níveis séricos de DHEA que diferiu entre o grupo PAC e o grupo Cetamina. Os participantes

do grupo PAC apresentaram uma maior variação dos níveis séricos de DHEA, com destaque para o intervalo entre a sessão quatro e a oito, quando houve a maior queda. Já os participantes do grupo Cetamina, não apresentaram variações significativas nos níveis séricos do DHEA ao longo das sessões. Vale salientar, contudo, que apesar da importante variação analisada no grupo PAC, não foram encontradas diferenças entre os grupos em nenhuma das sessões.

O DHEA possui influência por todo o nosso corpo e alterações em sua função podem ter implicações para a nossa saúde física e psicológica (Kamin, 2016). Por isso, esse estudo destaca a importância da sua análise sérica como um possível biomarcador para o TDM. Assim, os resultados sugerem que o protocolo aplicado no grupo PAC promoveu alterações significativas no DHEA ao longo do tempo, em contraste ao grupo Cetamina, mas sem diferenças claras entre grupos.

Estudos demonstram que o DHEA aumenta em resposta a estresses agudos, como o estresse psicossocial. Em um estudo realizado com adolescentes, por exemplo, foi constatado o aumento do DHEA salivar após o desafio de terem que falar em público (SHIRTCLIFF, 2007). Por outro lado, estudos pré-clínicos sugerem que níveis mais elevados de DHEA possuem propriedades antidepressivas, mas seu papel endógeno no transtorno depressivo maior e nos desfechos antidepressivos permanece incerto. Um estudo clínico evidenciou níveis mais elevados de DHEA sérico antes e depois do tratamento da depressão com inibidores seletivos da inibição da serotonina (HOUGH, 2016).

Evidências de ensaios clínicos randomizados, estudos longitudinais, experimentais e transversais sugerem um papel para a dehidroepiandrosterona na depressão, mas os dados permanecem conflitantes. Em alguns estudos como Assies et al, 2014 foram considerados positivos e em outros, como Souza-Teodoro et al., 2016, negativos (SOUZA-TEODORO, 2024).

No presente estudo, então, tanto no grupo Cetamina quanto no grupo PAC observamos, mesmo que discreta, uma diminuição dos níveis séricos de DHEA após a aplicação da cetamina. Por isso, ainda não é possível fazer uma relação entre o DHEA e o seu uso eficaz como biomarcador para acompanhamento clínico da depressão.

Essa pesquisa, por sua vez, pode apresentar melhorias futuras, como o aumento da população de pacientes analisadas, para que se possa estudar o impacto do valor do DHEA basal na resposta ao tratamento. Além disso, poderá ser feita uma análise sobre a relação dos níveis séricos do DHEA com a intensidade dos sintomas depressivos apresentados pelos pacientes.

Conclusão

Portanto, por meio desse estudo, ainda não se pode falar que o DHEA é um biomarcador específico para a depressão, isso porque seria necessário um grande estudo populacional em vários países. Porém, tem importante relevância clínica uma vez que estuda um possível biomarcador capaz de auxiliar no manejo do paciente com transtorno depressivo maior.

Referências

BAULIEU, E.E.; ROBEL, P. 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 4089-4091.

CATALINA, F.; SPECIALE, S.G.; KUMAR, V.; MILEWICH, L; BENNETT, M. 2001. Food restriction-like effects of dietary dehydroepiandrosterone. Hypothalamic neurotransmitters and metabolites in male C57BL/6 and (C57BL/6 x DBA/2) F1 mice. *Exp Biol Med.* 226:208-215.

Cooper MD, Rosenblat JD, Cha DS, Lee Y, Kakar R, McIntyre RS. Strategies to mitigate dissociative and psychotomimetic effects of ketamine in the treatment of major depressive episodes: a narrative review. *World J Biol Psychiatry.* 2017;18(6):410-23. 10

DIAS I. K. S., et al. Uso da cetamina na depressão resistente ao tratamento: uma revisão sistemática. *J Bras Psiquiatr.* 2022;71(3):247-52.

DUMAN, R.S. 2004. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry.* Aug;156(3):140-145.

FLECK M.; BERLIM M. et al. Revisão das diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (Versão integral). *Rev Bras Psiquiatr.* 2009;31(Supl I):S7-17

GRUBITS, S.; GUIMARÃES, M. A. L. Psicologia da saúde. Especificidades e diálogo interdisciplinar. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.145-146.

HACIMUSALAR Y, EŞEL E. Suggested biomarkers for major depressive disorder. *Archives of Neuropsychiatry.* 2018; 55: 280–290. <https://doi.org/10.5152/npa.2017.19482> PMID: 30224877

HENN, F.A. e VOLLMAYR, B. 2004. Neurogenesis and depression: etiology of epiphenomenon? *Biol Psychiatry.* Aug.;1:56(3):146-150.

HOUGH CM, LINDQVIST D, EPEL ES, DENIS MS, REUS VI, BERSANI FS, ROSSER R, MAHAN L, BURKE HM, WOLKOWITZ OM, MELLON SH. Higher serum DHEA concentrations before and after SSRI treatment are associated with remission of major depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2017 Mar;77:122-130. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.11.035. Epub 2016 Dec 5. PMID: 28038403; PMCID: PMC5336487.

Johnston KM, Powell LC, Anderson IM, Szabo S, Cline S. The burden of treatment-resistant depression: A systematic review of the economic and quality of life literature. *J Affect Disord.* 2019;242:195-210.

KAMIN HS, KERTES DA. Cortisol and DHEA in development and psychopathology. *Horm Behav.* 2017 Mar;89:69-85. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.018. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27979632.

LI Z, WANG Z, ZHANG C, CHEN J, SU Y, HUANG J, ET AL. Reduced ENA78 levels as novel biomarker for major depressive disorder and venlafaxine efficiency: Result from a prospective longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology.* 2017; 81:113–121. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.03.015> PMID: 28441588

MÉNDEZ, F. X.; OLIVARES, J.; & ROS, M. C. Características clínicas e tratamento da depressão na infância e adolescência. In V. E. Caballo & M. A. Simón, Manual de Psicología Clínica Infantil e do Adolescente: Transtornos gerais (pp.139-185). 2005. São Paulo, SP: Santos.

Mohammed A, Mansour IA. Could ketamine be the answer to treating treatmentresistant major depressive disorder? Gen Psychiatr. 2020;33(5):e100227

PLASSART-SCHIESS, E. e BAULIEU, E.E. 2001. Neurosteroids: recent findings. Brain Res. Rev. 37:133-140.

PLUCHINO N, DRAKOPOULOS P, BIANCHI-DEMICHELI F, WENGER JM, PETIGNAT P, GENAZZANI AR. Neurobiology of DHEA and effects on sexuality, mood and cognition. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Jan;145:273-80. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.012. Epub 2014 Jun 2. PMID: 24892797.

QUEVEDO, J.; GERALDO, S. A. Depressão: [recurso eletrônico] Teoria e Clínica. Porto Alegre: Artmed, 2013. • REINES, A.; CERESETO, M.; FERRERO, A.; BONAVIDA, C.; WIKINSKI, S. 2004. Neuronal cytoskeletal alterations in an experimental model of depression. Neurosci. 129(3):529-38 11

RODRIGUES, M. J. S. F. O diagnóstico de depressão. Psicol. USP, v. 11, n. 1, p. 155-187, 2000.

SHIRTCLIFF E, ZAHN-WAXLER C, KLIMES-DOUGAN B, SLATTERY M. Salivary dehydroepiandrosterone responsiveness to social challenge in adolescents with internalizing problems. J Child Psychol Psychiatry. 2007 Jun;48(6):580-91. doi: 10.1111/j.1469-7610.2006.01723.x. PMID: 17537074.

SCHMIDT HD, SHELTON RC, DUMAN RS. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. Neuropsychopharmacology. 2011; 36: 2375–2394. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.151> PMID: 21814182

SCHUMACHER, M.; AKWA, Y.; GUENNOUN, R.; ROBERT, F.; LABOMBARDA, F.; DESARNAUD, F.; ROBEL, P.; DE NICOLA, A.F.; 93 BAULIEU, E.E. 2000. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. J Neurocytol. 29:307-326

SOARES C. N. et al. Ocorrência e tratamento de quadros Ocorrência e tratamento de quadros depressivos por hormônios sexuais depressivos por hormônios sexuais. Rev Bras Psiquiatr 2002;24(Supl I):48-54.

SOUZA-TEODORO LH, DAVIES NM, WARREN HR, ANDRADE LHSG, CARVALHO LA. DHEA and response to antidepressant treatment: A Mendelian Randomization analysis. J Psychiatr Res. 2024 May;173:151-156. doi: 10.1016/j.jpsychires.2024.02.049. Epub 2024 Feb 28. PMID: 38531145.

Stahl SM. Natural Estrogen as an antidepressant for women. J Clin Psychiatry 2001;62:404-5.

VASCONCELOS, S.M.M.; ANDRADE, M.M et al. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. Rev. Psiqu. Clín. 32 (1); 10-16, 2005.

Anexos

Variação temporal do DHEA nos grupos.

Variação temporal do DHEA nos grupos.

CÓDIGO: SB1567

AUTOR: SAMIA ELLEN ALVES FERNANDES

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Análise In Silico das Propriedades Físico-Químicas, Farmacocinéticas, Farmacodinâmicas e Toxicológicas dos Ácidos Fenólicos encontrados na Operculina Macrocarpa

Resumo

A Operculina macrocarpa, conhecida como batata de purga, é tradicionalmente utilizada no Nordeste do Brasil por suas propriedades laxativas, purgativas e anti-helmínticas. Seus principais constituintes bioativos são ácidos fenólicos, como o ácido cafeico, clorogênico, dicafeico, ferúlico, metil-ferúlico e o ácido operculínico K, cuja atividade farmacológica tem despertado interesse científico. Este estudo realizou predição in silico das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas desses compostos utilizando diferentes plataformas (ADMETlab3.0, PreADMET, admetSAR2, SwissADME, FAFDrug4, entre outras). Os resultados indicaram baixa permeabilidade em modelos Caco-2, MDCK e PAMPA, sugerindo biodisponibilidade oral limitada (<50%). Além disso, observou-se alta probabilidade de inibição de transportadores (OATPB1, OATPB3 e MRP1), o que pode impactar a absorção e distribuição. Em relação à toxicidade, destacaram-se riscos de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e irritação cutânea/ocular, com maior gravidade para os ácidos clorogênico e dicafeico. Por outro lado, a interação com receptores nucleares NR-AR e NR-PPAR-gamma sugere potencial aplicação em pesquisas sobre câncer de próstata, metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina. Apesar dos riscos toxicológicos e da baixa biodisponibilidade, os achados reforçam o potencial da O. macrocarpa como fonte de novos fármacos, demandando estudos adicionais para otimização da eficácia e segurança.

Palavras-chave: Operculina macrocarpa, Ácidos fenólicos, Predição in silico, toxicida

TITLE: In Silico Analysis of the Physicochemical, Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Toxicological Properties of Phenolic Acids Found in Operculina Macrocarpa

Abstract

Operculina macrocarpa, known as purging potato, is traditionally used in Northeastern Brazil for its laxative, purgative, and anthelmintic properties. Its main bioactive constituents are phenolic acids, such as caffeic, chlorogenic, dicaffeic, ferulic, methylferulic, and operculinic acid K, whose pharmacological activity has aroused scientific interest. This study performed in silico predictions of the physicochemical, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicological properties of these compounds using different platforms (ADMETlab3.0, PreADMET, admetSAR2, SwissADME, FAFDrug4, among others). The results indicated low permeability in Caco-2, MDCK, and PAMPA models, suggesting limited oral

bioavailability (<50%). Furthermore, a high probability of transporter inhibition (OATPB1, OATPB3, and MRP1) was observed, which may impact absorption and distribution. Regarding toxicity, the risks of hepatotoxicity, nephrotoxicity, and skin/eye irritation were highlighted, with greater severity for chlorogenic and dicaffeic acids. On the other hand, the interaction with nuclear receptors NR-AR and NR-PPAR-gamma suggests potential application in research on prostate cancer, lipid metabolism, and insulin sensitivity. Despite the toxicological risks and low bioavailability, the findings reinforce the potential of *O. macrocarpa* as a source of new drugs, requiring further studies to optimize efficacy and safety.

Keywords: *Operculina macrocarpa*, Phenolic acids, In silico prediction, toxicity

Introdução

A *Operculina macrocarpa*, popularmente conhecida como batata de purga ou jalalapa, pertence à família de plantas vasculares Convolvulaceae, presentes no cerrado brasileiro (SILVA; CALAÇA; FIGUEIREDO, 2012). Ela é amplamente empregada na medicina popular do Nordeste devido às suas propriedades laxantes, purgativas e depurativas (MICHELIN et al., 2010). De fato, estudos demonstraram que o extrato hidroetanólico de *O. macrocarpa* possui ação antioxidante e efeito laxante comprovado em diferentes modelos experimentais de trânsito intestinal (PAGANOTTE et al., 2016). Além disso, a *O. macrocarpa* é utilizada para tratar infecções helmínticas em animais de produção (bovinos, ovinos e caprinos), com eficácia comprovada contra tais parasitas (FERREIRA DA SILVA et al., 2021). Esses animais são parte importante da economia, contribuindo com o fornecimento de alimentos e matérias-primas, além de desempenharem um papel significativo na geração de empregos e no desenvolvimento rural. Estudos sugerem que as ações laxativas em humanos e anti-helmínticas em animais de produção exercidas pela *O. macrocarpa* estejam relacionadas aos ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido 3,4-desidrodicafeico), principais constituintes fitoquímicos encontrados nos extratos desta planta (PAGANOTTE et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre as características farmacocinéticas (absorção, metabolismo, distribuição e eliminação) e toxicológicas de tais substâncias. Desta forma, embora possua interesse clínico como laxante em humanos e seja considerada um aditivo nutricional na dieta de animais de produção, estudos adicionais sobre as características físico-químicas, farmacocinéticas, farmacológicas e toxicológicas dos constituintes fitoquímicos ativos da *O. macrocarpa* se fazem necessários para garantir a segurança do uso desta planta, assim como também dar base para o desenvolvimento de derivados químicos com melhor perfil de eficácia e segurança.

Metodologia

As estruturas químicas dos ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido di-cafeico, ácido felúrico, ácido metil-felúrico e ácido operculínico K foram obtidas a partir do Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Os parâmetros físico-químicos (peso molecular, HBDs, HBAs, coeficiente de partição, lipofilicidade, constante de ionização, entre outros) dos ácidos fenólicos em estudo foram calculados através dos servidores ADMETlab3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/>), PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>). A predição in silico das propriedades farmacocinéticas (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção) e toxicológicas dos ácidos fenólicos em estudo será realizada por meio de servidores e ADMETlab3.0. Quando necessário, será complementada com admetSAR2

(<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>), PreADMET, FAFDrug4 (<https://fafdrugs4.rpbs.univ-paris-diderot.fr/index.html>), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) e o Althotas - Virtual Laboratory. Em cada um desses servidores, o módulo 'Absorção' forneceu a predição teórica de ensaios com células Caco2 e MDCK (rim canino Madin-Darby), as quais são largamente utilizadas como modelos in vitro confiáveis para predição da absorção intestinal de fármacos ingeridos por via oral. Por fim, a biodisponibilidade oral em humanos dos compostos foi predita através das ferramentas FAFDrug4 e admetSAR2 (módulo HOB - Human Oral Bioavailability). Ainda com o ADMETlab3.0, FAFDrug4 e o admetSAR2. Através do módulo 'Distribuição', avaliou-se a penetração na barreira hemato-encefálica (módulo BBB - Blood-brain barrier penetration) e na placenta (BPB - blood-placenta barrier), como também à capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas (PPB - Plasma protein binding e P-glycoprotein substrate/inhibitor); Em termos de 'Metabolismo', foi avaliado a capacidade dos compostos de inibir ou ser metabolizado (substrato) pelo citocromo P450 (Substrate: CYP2C9, 2D6, 3A4 Inhibitor: CYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4) pelas plataformas admetSAR e Althotas - Virtual Laboratory e pkCSM server (se necessário, as análises foram complementadas com Althotas - Virtual Laboratory). Considerando o aspecto 'Excreção' do ADME, foi predito os aspectos de meia-vida (half time - $t_{1/2}$) e clearance renal (Renal clearance) pelo ADMETlab3 e admetSAR2. O clearance total também foi predito pelo pkCSM server. Por fim, foi validado os dados obtidos com a avaliação qualitativa da estabilidade metabólica (meia-vida e clearance) nos modelos rato, camundongo e humano através da plataforma online ADMETlab3.

A predição farmacodinâmica dos compostos em estudo foi realizada no software servidor Swisstargetprediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Neste servidor é possível estimar os alvos macromoleculares (receptores, enzimas, canais iônicos) mais prováveis para moléculas bioativas. A previsão é baseada em uma combinação de similaridade 2D e 3D com uma biblioteca de 37.000 compostos conhecidos como ativos em mais de 3000 proteínas de três espécies diferentes (ratos, camundongos e humanos).

Uma extensa predição de 'Toxicidade' foi executada por intermédio do admetSAR2 e ADMETlab3. Ainda, para validação dos resultados de 'Toxicidade', verificaremos [i] a interrupção metabólica e endócrina, [ii] a cardiotoxicidade, [iii] neurotoxicidade e a [iv] carcinogenicidade dos compostos através do software VirtualToxLab. Não menos importantes, [v] a presença de toxiforos, [vi] a hepatotoxicidade e [vii] a toxicidade cardíaca via inibição do hERG também avaliados pelos servidores WEB FAFDrug4, pkCSM server e Pred-hERG (<http://predherg.labmol.com.br/>), respectivamente.

Resultados e Discussões

A Tabela 1 apresenta a predição in silico das propriedades moleculares dos seis compostos derivados da Operculina macrocarpa: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido dicafeico, ácido ferúlico, ácido metil-ferúlico e ácido operculínico K. Destaca-se o ácido operculínico K, que apresenta alta flexibilidade e elevado número de centros estereogênicos, além do ácido clorogênico, que apresentou valores de TPSA (>140) e $\log D_{7.4}$ (>3). A análise preditiva in silico da relação entre o número de carbonos hibridizados sp^3 e o número total de carbonos dos compostos esteve abaixo do desejado, exceto para o ácido operculínico K. As análises também identificaram a presença de grupos tiol reativos e alta probabilidade de interação dos

compostos com múltiplos alvos farmacológicos, à exceção do ácido operculínico K (Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta a predição *in silico* de diferentes propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) dos compostos da *O. macrocarpa*. A análise de permeabilidade em Caco-2, MDCK e PAMPA indicou baixa permeabilidade a membranas biológicas, podendo ser a via oral ineficaz segundo os dados obtidos. A predição da propriedade F50% demonstrou que todos os compostos apresentam biodisponibilidade oral inferior a 50%. Além disso, verificou-se alta probabilidade de inibição dos transportadores OATPB1 e OATPB3. O ácido operculínico K, o ácido ferúlico e o ácido metil-ferúlico também apresentam elevada probabilidade de inibir o transportador MRP1.

A predição de toxicidade *in silico* indicou probabilidades de moderada a alta para características tóxicas. Destacam-se o risco de lesão hepática e hepatotoxicidade, com maior probabilidade para os ácidos clorogênico e dicafeico, enquanto os ácidos cafeico, operculínico K, ferúlico e metil-ferúlico apresentaram toxicidade moderada. Observou-se ainda alta probabilidade de corrosão, irritação ocular e sensibilização cutânea nos ácidos cafeico, ferúlico e metil-ferúlico. A nefrotoxicidade induzida por fármacos variou de moderada a grave.

Na predição Tox21, os ácidos cafeico e dicafeico apresentaram alta probabilidade de interação com NR-AR e NR-PPAR-gamma. Os receptores NR-AR são proteínas nucleares que se ligam a receptores androgênicos, atuando como fatores de transcrição na regulação da expressão gênica. Já os receptores NR-PPAR-gamma regulam genes relacionados ao metabolismo lipídico.

As figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ilustram os alvos farmacológicos com potencial interação com os compostos, destacando que apenas o ácido operculínico K não apresentou interação com proteases. Nos demais compostos (ácidos cafeico, dicafeico, clorogênico, metil-ferúlico e ferúlico), observou-se essa possibilidade. As proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas, promovendo a degradação proteica.

Os achados ressaltam o potencial desses compostos para o desenvolvimento de fármacos. Entretanto, alguns desafios precisam ser superados, como a via de administração, uma vez que os modelos Caco-2, MDCK e PAMPA indicam baixa biodisponibilidade oral. Alternativas de administração devem ser consideradas em estudos futuros. A interação com NR-AR abre perspectivas de investigação sobre a regulação da expressão gênica mediada por esse receptor como em casos de câncer prostático (VAN-DUYNE et al., 2023), enquanto a interação com NR-PPAR-gamma pode indicar atividade no metabolismo lipídico e na sensibilidade à insulina (JANANI E RANJITHA KUMARI, 2015).

Conclusão

O estudo *in silico* permitiu prever potenciais usos e desafios dos compostos investigados. A *Operculina macrocarpa*, já utilizada tradicionalmente em comunidades do interior do Brasil, revelou compostos distintos com potencial farmacológico relevante. Os resultados sugerem aplicações futuras relacionadas à expressão gênica, metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina, estudos esses que já usam ligantes para esses receptores como alvo. Embora os

desafios toxicológicos e de biodisponibilidade também precisem ser desenvolvidos, para novos estudos.

Referências

FERREIRA DA SILVA, C. et al. Effects of purge potato (*Operculina macrocarpa*) in multnutritional blocks on sheep naturally infected with gastrointestinal helminth. *Veterinária Notícias*, v. 27, n. 2, p. 18–18, 10 maio 2021.

JANANI, C.; RANJITHA KUMARI, B. D. PPAR gamma gene—a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>.

MICHELIN, D. C. et al. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., *Convolvulaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 1, p. 18–22, 2010.

PAGANOTTE, D. M. et al. *Operculina macrocarpa*: chemical and intestinal motility effect in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 4, p. 427–432, 2 abr. 2016.

SILVA, S. O.; CALAÇA, F. J. S.; FIGUEIREDO, A. D. L. Anatomia foliar de *Operculina macrocarpa* L. Urban (*Convolvulaceae*). *Heringeriana*, v. 6, n. 1, p. 90–92, 14 nov. 2012.

VAN-DUYNE, G. et al. The androgen receptor. *Vitamins and Hormones*, v. 123, p. 439-481, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2023.01.001>.

Anexos

Tabela 1 – Predição in silico das propriedades moleculares e físico-químicas de compostos da *Operculina macrocarpa* utilizando o servidor ADMETlab3.0.

Tabela 2 – Predição in silico das propriedades químico-medicinais de compostos da *Operculina macrocarpa* utilizando o servidor ADMETlab3.0.

Tabela 3 – Predição in silico das propriedades farmacocinéticas de compostos da *Operculina macrocarpa* utilizando o servidor ADMETlab3.0.

Tabela 4 – Predição in silico das propriedades toxicológicas de compostos da *Operculina macrocarpa* utilizando o servidor ADMETlab3.0.

Tabela 5 – Predição in silico de preditores toxicológicos da Tox21 para compostos da Operculina macrocarpa utilizando o servidor ADMETlab3.0.

Figura 1. Gráfico em pizza sobre os receptores que se ligam ao Ácido Clorogênico

Figura 2. Gráfico em pizza sobre os receptores que se ligam ao Ácido Di-caféico

Figura 3. Gráfico de pizza sobre os receptores que se ligam ao Ácido operculínico K

Figura 4. Gráfico de pizza sobre os receptores que se ligam ao Ácido Caféico

Figura 5. Gráfico de pizza sobre os receptores que se ligam ao Ácido metil felúrico.

Figura 6. Gráfico de pizza sobre os receptores que se ligam ao Ácido Felúrico

CÓDIGO: SB1580

AUTOR: ISADORA MEDEIROS LOPES

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Influência da estrutura da paisagem em macro escala no uso do espaço pelas espécies de aves ameaçadas e endêmicas da Caatinga

Resumo

A fragmentação e a degradação de habitats têm provocado declínios populacionais e ameaçado espécies endêmicas da Caatinga, como o pintassilgo-do-nordeste (*Spinus yarrellii*), classificado como vulnerável à extinção. Este estudo avaliou a influência da estrutura da paisagem em macroescala sobre a ocupação e detecção da espécie. Foram compilados registros de ocorrência de *S. yarrellii* em um período de 10 anos (2013–2022), obtidos em bases de dados de ciência cidadã e literatura, os quais foram relacionados a variáveis ambientais, socioeconômicas e de uso do solo. Utilizamos modelos de ocupação estática (single-season) para estimar a probabilidade de ocupação (ψ) e de detecção (ρ) em 1.062 municípios da Caatinga. Os resultados indicaram baixa ocupação ($\psi = 0,04$), influenciada positivamente pela elevação, declividade e porcentagem de unidades de conservação integral. A detecção esteve associada ao esforço amostral, à densidade demográfica e ao tamanho da população residente, evidenciando a relevância da ciência cidadã na obtenção de dados. O mapa de calor revelou maior concentração da espécie no extremo sul da Caatinga e hotspots isolados no litoral leste e em áreas do norte do bioma. Este trabalho amplia o conhecimento sobre a ecologia de *S. yarrellii* e identifica áreas prioritárias para sua conservação, reforçando a necessidade de ampliar unidades de conservação integral e promover a conectividade dos habitats para garantir a persistência da espécie.

Palavras-chave: Caatinga; conservação; *Spinus yarrellii*

TITLE: Influence of Large-Scale Landscape Structure on Space Use by Threatened and Endemic Bird Species of the Caatinga

Abstract

Habitat fragmentation and degradation have caused population declines and threatened endemic species of the Caatinga, such as the yellow-faced siskin (*Spinus yarrellii*), currently listed as Vulnerable. This study assessed the influence of landscape structure at a macro scale on the occupancy and detection of the species. We compiled 10 years of occurrence records (2013–2022) from citizen science databases and literature, relating them to environmental, socioeconomic, and land-use variables. Single-season occupancy models were applied to estimate occupancy probability (ψ) and detection probability (ρ) across 1,062 municipalities within the Caatinga. Results indicated low occupancy ($\psi = 0.04$), positively influenced by elevation, slope, and the proportion of strictly protected areas. Detection probability was associated with sampling effort, human population size, and demographic density, highlighting the relevance of citizen science in data acquisition. Heatmaps revealed higher

concentrations of the species in the southern Caatinga and isolated hotspots along the eastern coast and northern areas of the biome. This study expands the ecological knowledge of *S. yarrellii* and identifies priority areas for its conservation, emphasizing the importance of expanding strictly protected areas and ensuring habitat connectivity to support the species' long-term persistence.

Keywords: Keywords: Caatinga; conservation; *Spinus yarrellii*

Introdução

Nos dias atuais, é cada vez mais comum nos depararmos com paisagens fragmentadas, onde a vida selvagem se encontra isolada em pequenos remanescentes de habitat (Pükttter, 2020). Esse processo resulta em uma significativa perda e degradação dos ecossistemas, desencadeando a redução das populações de diversas espécies e comprometendo a biodiversidade, podendo gerar uma “cascata de extinções” (Almeida et al., 2014). As consequências dos processos de fragmentação e da perda de habitats são o isolamento de determinadas áreas e a perda da conectividade da paisagem, fatores essenciais para a manutenção e sobrevivência das populações a longo prazo (Fahrig, 2003; Da Silva et al., 2014).

Essas perturbações causadas à vegetação podem levar a diminuição da qualidade do habitat, o que força os indivíduos a aumentarem suas áreas de vida para obter os recursos necessários (Mitchell e Powell, 2004). Hodson et al. (2009) observaram que a área, a qualidade e a agregação do habitat são componentes-chave da conservação em escala de paisagem, e que priorizar a área e a qualidade do habitat seria uma maneira robusta de facilitar a conectividade e a persistência da biodiversidade diante das mudanças climáticas.

Compreender como os indivíduos interagem com o ambiente, e quais são os resultados dessas interações, é fundamental para explorar os problemas centrais que influenciam a abundância e a distribuição de animais e populações, em diferentes habitats e escalas espaciais, especialmente no caso de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (Brown, 1984; Jones, 2001; Lele et al., 2013; Matthews e Whittaker, 2015).

As paisagens áridas e semiáridas são particularmente mais suscetíveis a essas alterações devido à heterogeneidade espacial e temporal de seus recursos. A degradação e fragmentação dessas paisagens comprometem diretamente a disponibilidade e obtenção de água e alimento, dificultando a sobrevivência de diversas espécies e afetando o equilíbrio ecológico (Haddad et al., 2015)

A Caatinga, localizada na região nordeste do Brasil, é o maior e mais biodiverso bloco de FTSS (Florestas Tropicais Sazonalmente Secas) da região Neotropical (Prado, 1992; Prado e Gibbs, 1993; Werneck e Colli, 2006). Apesar de apresentar uma ampla variação climática (Prado, 2003), a Caatinga representa um dos ambientes mais vulnerável a perdas de habitats e às mudanças climáticas (Miles et al., 2006). Além disso, é o bioma com o menor número de Unidades Conservação do Brasil, onde apenas 1,2% de seu território encontra-se protegido integralmente (MMA, 2016).

Vale ressaltar que nada é conhecido sobre o efeito da paisagem sobre o uso do hábitat por aves da Caatinga. Portanto, este trabalho visa preencher lacunas de conhecimento sobre o efeito da paisagem nas aves em ambiente de Florestas Tropicais Sazonalmente Secas. Além

disso, o presente estudo pode servir de subsídio tanto para realização de plano de manejo e conservação adequados para espécie endêmicas e/ou ameaçadas de extinção, como para realização de outros trabalhos tanto na Caatinga como em outras áreas de Florestas Tropicais Sazonalmente Secas do planeta.

Metodologia

Área de estudo

Este foi realizado na Caatinga, bioma endêmico do Brasil e que corresponde a 11% do território nacional (Prado, 1991; Prado e Gibbs, 1993; Werneck e Colli, 2006). O bioma abrange grande parte da área do Nordeste, com cerca de 800.000 km², englobando os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (De Brito Chaves et al., 2008).

A Caatinga está localizada principalmente numa extensa depressão interplanáltica, constituída predominantemente por formações arbóreas e arbustivas decíduas, xerófitas e espinhosas, sendo composta principalmente por espécies vegetais lenhosas, cactáceas, bromeliáceas e ervas de crescimento lento (Andrade Lima, 1982; Da Costa et al., 2007). Devido a sua grande alteração, o bioma já perdeu metade de sua cobertura original, sua degradação implica significativamente na redução de chuvas e consequentemente afeta todo o ciclo de vida do seu ecossistema (MapBiomias, 2019).

Além disso, apresenta um dos piores índices sociais, ecológico e econômico do continente. A vulnerabilidade social dos seus 27,6 milhões de habitantes faz com que dependam, pelo menos parcialmente, dos recursos da Caatinga (Silva et al., 2017). Desde a colonização brasileira a Caatinga foi constantemente alterada pela agricultura de corte, queima, extração de madeira e lenha, causando tanto a perda como a degradação do habitat (Silva et al., 2017). Tais degradações ao bioma já desencadearam a desertificação do solo de diversos fragmentos. Vale ressaltar que extensas atividades da agricultura vem causando forte impacto na vegetação (Melo, 2017). O fácil acesso às áreas remanescentes de Caatinga também foi descrito como um fator-chave na superexploração da biodiversidade (Alves et al., 2009; Barbosa et al., 2016; Gariglio et al., 2010).

Espécies de interesse

Spinus yarrellii (pintassilgo-do-nordeste) é uma ave passeriforme da família Fringillidae, endêmica da Caatinga. Ocorre principalmente no Nordeste do Brasil, com registros também nas regiões Norte e Centro-Oeste do país, além de ter sido introduzida no norte da Venezuela (Clement e Sharpe 2020). No Brasil, *S. yarrellii* é a única espécie da família Fringillidae classificada como ameaçada de extinção, na categoria Vulnerável, tanto em nível nacional quanto global (Araujo et al., 2025; BirdLife International, 2018). Sua população vem sofrendo declínio contínuo, com poucos registros de indivíduos na natureza. As principais ameaças à espécie são o comércio ilegal e a perda de habitat (Costa et al., 2018). Sua dieta é composta predominantemente por sementes de herbáceas. Habita áreas na margem de floresta de várzeas, florestas secundárias, caatinga, ao redor de margens de cultura, em plantações de café e próximo a áreas urbanas (Clement e Sharpe, 2020, Studes et al., 2025). Até o presente momento não se sabe nada sobre o efeito da estrutura da paisagem na ocupação e detecção do pintassilgo-do-nordeste.

Coleta de dados

Para obter os dados de ocupação histórica do pintassilgo-do-nordeste, foram compilados registros de ocorrência em 10 anos de observação (2013–2022) disponíveis em diversas bases de dados (WikiAves, wikiaves.com.br; xeno-canto, xeno-canto.org; Global Biodiversity Information Facility - GBIF, gbif.org; SpeciesLink, specieslink.net; e eBird, ebird.org) e na literatura (Google Acadêmico, scholar.google.com.br; e Atlas de Registros de Aves, ara.cemave.gov.br).

Dados ambientais

Os dados ambientais utilizados para a análise da ocupação histórica em macroescala foram obtidos a partir de diferentes fontes. Do banco de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foram extraídas informações sobre quantidade de habitantes no município, densidade demográfica, Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM), salário médio mensal dos trabalhadores formais, Produto Interno Bruto (PIB), Índice de Desenvolvimento da Educação Básica (IDEB) e área do município. Também foi considerada a variável Índice de Perturbação Crônica (CDI) (Antongiovanni et al., 2018). Dados de elevação e declividade foram obtidos na base de Amatulli et al., (2020). A porcentagem de unidades de conservação de uso sustentável e de proteção integral no município foi obtida a partir de (MMA). Por fim, informações sobre cobertura e uso do solo, incluindo cobertura florestal, cobertura savânica, cobertura agropecuária, variação da cobertura florestal, variação da cobertura savânica, variação da cobertura agropecuária e variação da urbanização, foram obtidas do MapBiomas (2023).

Análise de dados - utilizamos o modelo de ocupação estática single-season (MacKenzie et al., 2002) para verificar a influência das covariáveis na probabilidade de ocupação do *S. yarrellii* no programa MARK (White e Burnham, 1999). Utilizamos os 10 anos de amostragem como ocasiões, a fim de compor um histórico de ocupação nos municípios de amostragem. Esses modelos consideram dois parâmetros: a probabilidade do município ser ocupado (ψ) pela espécie e a probabilidade da espécie ser detectada (ρ) quando presente. A probabilidade de ocupação foi modelada em função das covariáveis ambientais para compreender o efeito do habitat sobre a espécie estudada.

Resultados e Discussões

Durante o estudo obtivemos 171 registros da ocorrência de *S. yarrellii* em toda sua área de ocorrência na Caatinga, distribuídos em 19 municípios dentre 1062 analisados (1,79% do total de municípios da Caatinga).

Na modelagem obtivemos 128 modelos, onde os seis modelos com $\Delta AICc < 2$ tinham 55% do peso do conjunto final de modelos (Tabela 1). O modelo melhor ranqueado apresenta a seguinte estrutura ' ψ (elev + decliv + UC_Int) ρ (E + pop_resid + dens_dem)' e tem 8% do peso do conjunto final de modelos (Tabela 1). Portanto, este modelo foi usado para descrever o que influencia a probabilidade de ocupação e detecção da *S. yarrellii*.

A ocupação total da *S. yarrellii* foi considerada baixa na área de estudo ($\psi = 0,04$). As variáveis de elevação ($\beta = 0,0042$, peso = 0,97), declividade ($\beta = 0,2430$, peso = 0,64) e a porcentagem de UC integral no município ($\beta = 2,2838$, peso = 0,86) influenciaram positivamente a ocupação da espécie (Figura 1). Vale ressaltar que o índice de perturbação

antropogênica crônica também influenciou positivamente na ocorrência da espécie, porém não obteve um resultado significativo ($\beta = 3.5227$, peso = 0.42).

As variáveis de declividade e elevação influenciaram significativamente a ocupação de *S. yarrellii* na Caatinga. Áreas mais inclinadas e elevadas tendem a ser menos acessíveis a atividades humanas, dificultando agricultura, criação de animais e extração vegetal, o que favorece a manutenção de vegetação menos degradada e com maior oferta de sementes e abrigo, recursos essenciais para *S. yarrellii* (Sick, 1997; Da Silva et al., 2014).

A elevação também afeta o microclima, a composição vegetal e a disponibilidade de recursos; regiões mais altas da Caatinga apresentam temperaturas mais amenas, maior umidade e mosaicos de vegetação, incluindo enclaves úmidos e matas serranas, que oferecem refúgios e locais de reprodução mais seguros (Da Silva et al., 2014; Ribeiro et al., 2015). Esses fatores indicam que a conservação de ambientes topograficamente acidentados é estratégica para manter populações viáveis, especialmente diante de pressões como a captura e a perda de habitat.

A ocupação do pintassilgo-do-nordeste também apresentou associação positiva com a porcentagem de unidades de conservação de proteção integral. Esse resultado provavelmente se deve ao fato de que essas áreas atuam como importantes instrumentos para mitigar os impactos das mudanças climáticas sobre a biodiversidade (Virkkala et al., 2013), além de funcionarem como refúgios para espécies sensíveis à perda e fragmentação de habitat (Watson et al., 2014). Unidades de conservação de uso integral mantêm ecossistemas relativamente intactos, garantindo a continuidade de processos ecológicos, a disponibilidade de recursos e a conectividade entre habitats (Brasil, 2000; Watson et al., 2014). Esses fatores são essenciais para a persistência de populações de aves endêmicas e ameaçadas, como *S. yarrellii* (Araújo et al., 2025).

Probabilidade de Detecção

A variável de esforço amostral ($\beta = 0,0096$, peso = 1), população residente ($\beta = 0,1796$, peso = 0,52) e densidade demográfica ($\beta = 0,0025$, peso = 0,70) tiveram uma influência positiva na detecção da espécie na área de estudo (Figura 2).

No presente estudo a probabilidade de detecção esteve associada ao esforço amostral que pode ser explicado pelo aumento de dados de ciência cidadã. O crescimento desses dados é impulsionado pela disponibilidade de infraestruturas de tecnologia da informação, como telefones celulares e sensores de baixo custo para coletar e relatar dados, internet para compartilhar dados e armazenamento em nuvem para hospedar e armazenar dados (Lemmens et al., 2021; Wynn, 2017).

A detecção do pintassilgo-do-nordeste também foi influenciada positivamente pela densidade demográfica e o tamanho da população residente no município. Municípios mais populosos tendem a apresentar um maior número de observadores de aves, o que aumenta a chance de registros das espécies (Callaghan et al., 2021). Essa relação entre densidade demográfica e esforço amostral está bem documentada em estudos que analisam padrões de ciência cidadã, os quais demonstram que áreas mais populosas concentram um volume maior de observações, especialmente quando há acessibilidade e presença de habitats atrativos (Tubelis, 2023). A ciência cidadã tem se consolidado como uma importante aliada para pesquisadores (Mamede et al., 2017), com plataformas como WikiAves, Xeno-Canto e eBird contribuindo significativamente para o mapeamento da ocorrência e da abundância de

espécies ao longo dos anos. Esses bancos de dados aumentam a cobertura espacial e temporal da amostragem, permitindo inferências mais robustas sobre padrões de distribuição (Diana et al., 2021)

Mapa de calor

O mapa de calor, elaborado a partir das estimativas de ocupação por município, destaca áreas estratégicas para a investigação de hotspots de ocorrência de *S. yarrellii* na Caatinga. Observa-se que as maiores concentrações de ocupação estão localizadas principalmente no extremo sul do bioma, abrangendo municípios com valores elevados no sudoeste, bem como pontos isolados de alta ocorrência ao longo do litoral leste e em áreas pontuais do norte.

A distribuição estimada de *S. yarrellii* na Caatinga indica concentração de ocupação no extremo sul, região ecotonal com o Cerrado, caracterizada por maior heterogeneidade ambiental e disponibilidade de recursos (Velloso et al., 2002). Hotspots isolados no litoral leste e no norte sugerem populações remanescentes em habitats fragmentados, possivelmente associadas a refúgios ecológicos (Leal et al., 2005; Santos et al., 2011). Esses padrões ressaltam a importância de priorizar tanto áreas de alta concentração, que funcionam como núcleos populacionais, quanto áreas isoladas, mais suscetíveis à perda de conectividade (Metzger, 2000). Lacunas em regiões pouco amostradas também indicam a necessidade de esforços adicionais para confirmar ocupação e compreender os efeitos dos fatores ambientais e antrópicos na persistência da espécie.

Conclusão

Dessa forma, esta pesquisa possibilitou compreender a influência da estrutura da paisagem em macroescala sobre o uso do espaço por *Spinus yarrellii*, espécie endêmica e ameaçada de extinção. Os resultados obtidos neste trabalho ampliam os conhecimentos sobre sua ecologia, revelando que determinadas variáveis da paisagem e índices sócio-econômico exercem influência positiva na probabilidade de ocupação e detecção. O presente estudo permitiu identificar áreas prioritárias para a conservação de *S. yarrellii* na Caatinga, evidenciando que municípios com maior porcentagem de unidades de conservação de uso integral apresentaram maior ocupação da espécie. Esses resultados reforçam a importância de ampliar e implementar novas áreas protegidas desse tipo, especialmente nos principais núcleos de ocorrência e nos hotspots isolados, assegurando a conectividade e a proteção a longo prazo.

Referências

ALMEIDA, T. S. et al. Impactos antrópicos e efeitos eco-evolutivos sobre a biodiversidade. *Ensino de Biologia: uma perspectiva evolutiva*, v. 2, p. 349-396, 2014.

AMATULLI, G. et al. Geomorpho90m: empirical evaluation and accuracy assessment of global high-resolution geomorphometric layers. *Scientific Data*, v. 7, n. 162, 2020. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41597-020-0479-6>

ANTONGIOVANNI, Marina; VENTICINQUE, Eduardo M.; FONSECA, Carlos Roberto. Fragmentation patterns of the Caatinga drylands. *Landscape Ecology*, v. 33, n. 8, p. 1353-1367, 2018.

ANTONGIOVANNI, M. et al. Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. *Journal of Applied Ecology*, v. 57, p. 2064-2074, 2020.

ARAÚJO, H. F. P. et al. *Spinus yarrellii* (Audubon, 1839). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE, 2025. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br>. DOI: 10.37002/salve.ficha.20041.3. Acesso em: 15 jul. 2025.

BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de ação nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos campos sulinos e espinilho: 2021–2026. Brasília, DF: ICMBio, 2021. 160 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC: Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000; Decreto nº 4.340, de 22 de agosto de 2002. Brasília: MMA, 2002.

BROWN, J. H. On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist*, 124: 255–279, 1984.

CALLAGHAN, C. T. et al. Large-bodied birds are over-represented in unstructured citizen science data. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 19073, 2021.

CLEMENT, P.; SHARPE, C. J. Yellow-faced Siskin (*Spinus yarrellii*), version 1.0. In: BILLERMAN, S. M. (ed.). *Birds of the World*. Ithaca: Cornell Lab of Ornithology, 2020.

COSTA, F. J. V. et al. Espécies de aves traficadas no Brasil: uma meta-análise com ênfase nas espécies ameaçadas. *Fronteira: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, v. 7, n. 2, p. 324-346, 2018.

DA SILVA, F. K. G. et al. Patterns of species richness and conservation in the Caatinga along elevational gradients in a semiarid ecosystem. *Journal of Arid Environments*, v. 110, p. 47-52, 2014.

DE BRITO CHAVES, I. et al. Uma classificação morfo-estrutural para descrição e avaliação da biomassa da vegetação da caatinga. *Revista Caatinga*, v. 21, n. 2, 2008.

DE KLERK, H. M. et al. Gaps in the protected area network for threatened Afrotropical birds. *Biological Conservation*, v. 117, n. 5, p. 529-537, 2004.

DIANA, Alex et al. Fast Bayesian inference for large occupancy datasets. *Biometrics*, v. 79, n. 3, p. 2503-2515, 2023.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 34, n. 1, p. 487-515, 2003.

GUETTÉ, A. et al. Who and where are the observers behind biodiversity citizen science data? Effect of landscape naturalness on the spatial distribution of French birdwatching records. *Land*, v. 11, n. 11, p. 2095, 2022.

HADDAD, Nick M. et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science advances*, v. 1, n. 2, p. e1500052, 2015.

HARGIS, C. D.; BISSONETTE, J. A.; TURNER, D. L. The influence of forest fragmentation and landscape pattern on American martens. *Journal of Applied Ecology*, v. 36, n. 1, p. 157-172, 1999.

HODSON, D. et al.. Climate impacts of recent multidecadal changes in Atlantic Ocean Sea Surface Temperature: a multimodel comparison. *Climate Dynamics*, 34: 1041- 1058, 2009.

JIMÉNEZ-FRANCO, M. V. et al. Evaluating temporal turnover in avian species richness in a Mediterranean semiarid region: different responses to elevation and forest cover. *Diversity and Distributions*, v. 30, n. 1, p. 106-118, 2024.

JONES, J. P. G. Monitoring species abundance and distribution at the landscape scale. *Journal of Applied Ecology*, 48: 9–13, 2011.

LASGORCEUX, F. et al. Space-time species distribution modeling for opportunistic presence-only data: a case study of passerines in a protected area. 2024.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; LACHER JR, T. E. Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern Brazil. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 701-706, 2005.

LELE, S. R. et al. Selection, use, choice and occupancy: Clarifying concepts in resource selection studies. *Journal of Animal Ecology*, 82: 1183– 1191, 2013.

LEMMENS, R.; ANTONIOU, V.; HUMMER, P.; POTSIU, C. In: VOHLAND, K. et al. (eds.). *The science of citizen science*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 461–474.

MACKENZIE, D. I. et al. Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology*, v. 83, p. 2248-2255, 2002.

MACKENZIE, D. I. et al. *Occupancy estimation and modeling: inferring patterns and dynamics of species occurrence*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2018.

MALLET-RODRIGUES, F.; PARRINI, R.; RENNÓ, B. Bird species richness and composition along three elevational gradients in southeastern Brazil. *Atualidades Ornitológicas*, v. 188, p. 39-58, 2015.

MAMEDE, S.; BENITES, M.; ALHO, C. J. R. Ciência cidadã e sua contribuição na proteção e conservação da biodiversidade na reserva da biosfera do Pantanal. *Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)*, v. 12, n. 4, p. 153-164, 2017.

MATTHEWS, T. J.; WHITTAKER, R. J. On the species abundance distribution in applied ecology and biodiversity management. *Journal of Applied Ecology*, 52: 443–454, 2015.

METZGER, J. P. Tree functional group richness and landscape structure in a Brazilian

tropical fragmented landscape. *Ecological Applications*, v. 10, n. 4, p. 1147–1161, 2000.

MILES, Lera et al. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of biogeography*, v. 33, n. 3, p. 491-505, 2006.

MITCHELL, M. S.; POWELL, R. A. A mechanistic home range model for optimal use of spatially distributed resources. *Ecological Modelling*, 177:209-232, 2004.

Ministério do Meio Ambiente [Ministry of the Environment], Unidades de Conservação por Bioma (CNUC/MMA, Brasília-DF, Brasil, 2016);
www.mma.gov.br/images/arquivo/80112/CNUC_PorBiomaFev16.pdf

PASINELLI, G. et al. Rodent-avoidance, topography and forest structure shape territory selection of a forest bird. *BMC Ecology*, v. 16, n. 1, p. 24, 2016.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. p. 3-73. In: Leal, I. R., Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (eds.) *Ecologia e conservação da Caatinga*. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PRADO, D. E., GIBBS, P.E. Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80, 902, 1993.

PRADO, Darien Eros. A critical evaluation of the floristic links between Chaco and Caatingas vegetation in South America. University of St. Andrews (United Kingdom), 1992.

PÜTTKER, Thomas et al. Indirect effects of habitat loss via habitat fragmentation: A cross-taxa analysis of forest-dependent species. *Biological Conservation*, v. 241, p. 108368, 2020.

RIBEIRO, E. M. S. et al. Chronic anthropogenic disturbance drives the biological impoverishment of the Brazilian Caatinga vegetation. *Journal of Applied Ecology*, v. 52, p. 611-620, 2015.

SANTOS, A. M. M.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (eds.). *The ecology and conservation of seasonally dry forests*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 229–248.

SHANNON, G.; LEWIS, J. S.; GERBER, B. D. Recommended survey designs for occupancy modelling using motion-activated cameras: insights from empirical wildlife data. *PeerJ*, v. 2, p. e532, 2014.

SICK, Helmut. *Ornitologia brasileira*. 2. ed. rev. e aum. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

SILVA, José Maria Cardoso da et al. The Caatinga: understanding the challenges. In: *Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America*. Cham: Springer International Publishing, 2017.

Anexos

Tabela 1.

Figura 1. Resposta da ocupação de *Spinus yarrellii* em relação a (a) elevação, (b) declividade e (c) porcentagem de Unidade de conservação no município.

Figura 2. Resposta a detecção de *Spinus yarrellii* em relação a (a) esforço amostral, (b) população residente e (c) densidade demográfica.

Figura 3. Ocupação por *S. yarrellii* utilizando as estimativas obtidas nos modelos de ocupação single-season.

CÓDIGO: SB1586

AUTOR: DANIEL PACHECO PENHA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Biofísica quântica da interação energética entre o complexo proteína PD-1 e o ligante

Resumo

A monkeypox (Mpox) é uma doença que afetou amplamente o planeta no ano de 2022, e um dos principais fatores que aumentam ainda mais a virulência dela e de vírus da sua família (Orthopoxvirus) é a metiltransferase, enzima responsável pelo capeamento de fitas de RNA-viral, estado no qual torna o material genético do vírus indetectável para sensores intracelulares, sendo um mecanismo de evasão imune muito eficiente. Essa enzima é alvo de muitos inibidores, como a sinefungina (SFG). Com isso, buscamos comparar um análogo que utiliza iodo e enxofre com ela, com o objetivo de explorar e caracterizar suas interações a partir de uma ótica de mecânica quântica, com o uso da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e a aplicação dos cálculos do Método de Fracionamento de Capas Conjugadas (MFCC), para fornecer maior assertividade. Nos resultados, cálculos MFCC-DFT (M06-2X) sobre VP39 mostraram modo de ligação conservado para a SFG e reorganização de solvatação no análogo halogenado, com maior densidade de contatos $<3,0 \text{ \AA}$ e energias de interação mais favoráveis sob ambientes biomiméticos eletrostaticamente, com a decomposição por resíduo apontando contribuições dominantes de sítios ácidos e aromáticos na fenda catalítica. Concluimos que a modificação de farmacóforos desse tipo com iodo e enxofre pode potencializar a afinidade e oferece diretrizes para otimização de inibidores de MTases ortopoxvirais, demonstrando a necessidade de mais estudos, a fim de contribuir com o tratamento viral.

Palavras-chave: Drug-design, In silico, Física Quântica, MFCC, Varíola dos macacos

TITLE: Quantum Characterisation of Interactions between Inhibitors and the Monkeypox Virus VP39 Methyltransferase

Abstract

Monkeypox (Mpox) is a disease that widely affected the planet in 2022, and one of the main factors that further increases its virulence and that of viruses in its family (Orthopoxvirus) is methyltransferase, an enzyme responsible for capping viral RNA strands, a state in which it makes the virus's genetic material undetectable to intracellular sensors, making it a very efficient immune evasion mechanism. This enzyme is the target of many inhibitors, such as sinefungin (SFG). With this, we sought to compare an analogue that uses iodine and sulfur with it, with the aim of exploring and characterizing their interactions from a quantum mechanics perspective, using Density Functional Theory (DFT) and applying Conjugate Layer Fractionation Method (CLFM) calculations to provide greater accuracy. In the results, MFCC-DFT (M06-2X) calculations on VP39 showed a conserved binding mode for SFG and

solvation reorganization in the halogenated analog, with higher contact density ≤ 3.0 Å and more favorable interaction energies under electrostatic biomimetic environments, with residue decomposition pointing to dominant contributions from acidic and aromatic sites in the catalytic cleft. We conclude that the modification of pharmacophores of this type with iodine and sulfur can enhance affinity and offers guidelines for the optimization of orthopoxviral MTase inhibitors, demonstrating the need for further studies to contribute to viral treatment.

Keywords: Drug-Design, In silico, Quantum physics, MFCC, Monkeypox

Introdução

O Monkeypox vírus (MPXV) da subfamília Orthopoxvirus, da família Poxviridae, causa zoonose semelhante à varíola humana e bovina (Mitjà et al., 2023). Em 1958 o vírus foi isolado em macacos de laboratório em Copenhagen e, em 1970, identificou-se o primeiro caso humano na República do Congo (Harapan et al., 2022). Até recentemente, o MPXV circulou sobretudo entre animais na África Central e Ocidental, com poucos casos humanos em áreas rurais (Shulman, 2023). Sendo assim, os casos permaneceram na República Democrática do Congo (RDC) e países vizinhos se restringindo à animais e poucos indivíduos humanos nessas regiões. Em maio de 2022 teve início o maior surto global acima de 80 000 casos em mais 100 países, com transmissão predominantemente interpessoal, especialmente entre homens que fazem sexo com outros homens (HSH) (Sah et al., 2022). Graças à rápida mobilização de vacinas contra varíola e MPXV, o pico epidêmico em 2022–2023 reverteu-se significativamente em 2024 (OMS 2024). Clinicamente, o surto de 2022 destacou a doença com a ocorrência de sintomas como lesões cutâneas e linfadenopatia, frequentemente acompanhadas de febre, fadiga, mialgia e cefaleia. A janela de incubação varia de 5 a 21 dias, com os primeiros indícios da doença entre o quinto e o sétimo dia, sendo o rash cutâneo um marcador de diagnóstico confiável, apesar do exame de reação em cadeia de polimerase (PCR) precoce ainda ser o mais indicado (Li et al., 2023; Karagoz et al., 2023). A nível estrutural, o MPXV é um ortopoxvírus de duas fitas de DNA de 200–250 nm que completa seu ciclo de replicação inteiramente no citoplasma, utilizando um conjunto próprio de proteínas enzimáticas (Zhao et al., 2016; Alakunle et al., 2020). Quatro clados principais (Ia, Ib, IIa e IIb) foram identificados, dos quais o IIb impulsionou o surto recente por combinar letalidade reduzida e mutações de evasão imune que prolongam o período de transmissibilidade (WHO, 2024; Américo et al., 2023). Dentre essas proteínas responsáveis pela evasão, a metiltransferase VP39 capta o cofator S-adenosil-L-metionina para metilar o cap 5' do RNA viral, escapando da detecção por sensores celulares. Inibidores como a sinefungina (SFG), um medicamento utilizado no tratamento da doença, competem por esse sítio de ligação, revelando potencial terapêutico (Silhan et al., 2023). Contudo, o desenvolvimento de ligantes mais eficazes, como o UG9 descrito por Silhan et al. (2023), requer compreensão detalhada das energias de interação envolvidas, apesar de ter sido relatado um grande potencial pan-viral pelo próprio autor. Portanto, nesse trabalho buscamos entender melhor a interação entre o medicamento e a enzima visando a caracterização dos complexos VP39-SFG e VP39-UG9, comparando ambas sob a óptica da mecânica quântica. Para isso foram empregadas técnicas determinadas pela teoria funcional da densidade (DFT) e o fracionamento molecular de capas conjugadas, para calcular a contribuição energética de cada aminoácido nos complexos. O trabalho objetiva diferenciar ambos os complexos, caracterizando cada uma das interfaces com base em número de interações intermoleculares relevantes, força de repulsão-atração, número de interações por aminoácidos e energia por raio em angstrom.

Metodologia

Os cálculos de mecânica quântica foram realizados em estruturas pré-ajustadas e as energias de interação entre os inibidores de S-adenosil-metionina, o análogo de purina 7-deaza e metiltransferase VP39 foram definidas através da Teoria Funcional da Densidade por meio da técnica de Fracionamento Molecular de Capas Conjugadas. As estruturas estão disponíveis em um repositório amplamente utilizado chamado Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank (RCSB - PDB), no qual elas se encontram como estruturas obtidas por meio da cristalografia de raio X, sendo seus códigos: 8CEV e 8B07, e suas resoluções 2.14 Å e 2.05 Å (Silhan et al., 2023). Antes de realizar cálculos, deve-se realizar a averiguação de resíduos pendentes na estrutura, por meio de programas de modelagem computacional e bioinformática estrutural, capazes de prever a estrutura por meio de homologia, através do meio do alinhamento da sequência com as mais similares disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information), como o software de predição estrutural do MODELLER (versão 10.7) integrado à interface do ChimeraX (versão 1.9), um programa dedicado à visualização e edição de estruturas moleculares. A adição de átomos de hidrogênios deve ser realizada por serem negligenciados pela cristalografia, devido à sua baixa densidade eletrônica, realizado no Discovery Studio (versão 3.1) em concordância com parâmetros de campo de força CharMm (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics) (versão 22). O estado de protonação da estrutura é fundamental para definição de cargas e do ambiente eletrônico entre ligante e proteína. Dessa maneira, foram previstas estruturas dos ligantes no programa MarvinSketch e do cristal no PropKa, ambos em um pH de 8 utilizado na cristalografia de acordo com o estudo de referência de Silhan et al. 2023,. Dito isso, e com a estrutura principal fixada, foi realizada a otimização dos átomos em interação e livres, e com isso, as águas em interação com os aminoácidos são explicitadas na estrutura de cada aminoácido para que sejam incluídas também nos cálculos. O Fracionamento Molecular com Caps Conjugados (MFCC) promove a segmentação da macromolécula em resíduos de aminoácidos, interrompendo cada ligação peptídica e completando as valências resultantes com pares de grupos conjugados (capas conjugadas), o que mantém a integridade do ambiente químico local. A seguir, procede-se ao cálculo ab initio da energia de cada fragmento em interação com o ligante, empregando a abordagem DFT com o funcional M06-2X e uma série de conjunto de bases escolhidos para cada átomo, def2TZVP para H, C, N, O e S; e LANL2DZ exclusivamente para o átomo de iodo (Robidas; Legault, 2024) - metodologia cuja eficácia na descrição de interações não-covalentes em sistemas biomoleculares foi evidenciada por Hohenstein et al. (2008). Para determinar a energia total de interação do sistema, somam-se linearmente as contribuições energéticas de cada fragmento, descontando-se as parcelas atribuídas às capas conjugadas (concaps), conforme proposto por He et al. (2014). Mediante essa teoria e na equação: $E(L - Ri) = E(L - Ci - 1RiCi + 1) - E(L - Ci - 1Ci + 1) - E(Ci - 1RiCi + 1) + E(Ci - 1Ci + 1)$, consideramos UG9 e a Sinefungina como ligantes (L) e os resíduos da Metiltransferase VP39 como (Ri), sendo $E(L - Ci - 1RiCi + 1)$ a energia do sistema das capas conjugadas com o resíduo e o ligante, $E(L - Ci - 1Ci + 1)$ a energia do ligante com as capas e ligante, $E(Ci - 1RiCi + 1)$ a energia de capas e o resíduo iésimo, e $E(Ci - 1Ci + 1)$ sendo a energia das capas com ligações ocupadas por hidrogênios. Com essa fragmentação, os resíduos agora submetidos à cálculos de mecânica quântica embasados na Teoria do Funcional da Densidade utilizando o software Gaussian (G09) (GAUSSIAN, 2013). O M06-2X foi escolhido por sua elevada fração de troca não local ($\approx 54\%$) e desempenho superior em interações não-covalentes em biomoléculas (benchmarks S22, GMTKN30), com erro médio $<1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Devido a natureza aquosa da

fenda de interação, estudos anteriores utilizam constantes dielétricas (ϵ), para simular a permissividade desse meio conforme modelo de solvatação universal SMD, descrito para compostos com a presença do átomo de iodo (Marenich; Cramer; Truhlar, 2009), admitindo $\epsilon=20$ e $\epsilon=40$. Em maioria dos nossos trabalhos são utilizado $\epsilon=10$ e $\epsilon=40$, no entanto os cristais apresentam quantidades muito distintas de águas para análise, o que pode impactar no posicionamento e no número de interações com o hidrogênio (Hsiao et al., 2010). Com a finalidade de preservar as interações mais relevantes, procedeu a análise da estabilidade da energia total de ligação em função do raio r da cavidade de interação do ligante, limitando-se o número de resíduos de aminoácidos considerados no raio limitado. Para tal, definiram-se esferas concêntricas hipotéticas (com $r=n/2r = n/2r=n/2$, onde $n=1,2,3,4,\dots$) para representar distâncias progressivas em relação ao ligante, permitindo o cálculo acumulativo das energias individuais dos resíduos localizados em cada uma dessas regiões, a fim de avaliar a convergência.

Resultados e Discussões

Com a realização da metodologia, foram obtidas as características do perfil de interação dos cristais 8B07 e 8CEV de modo a compará-los e discutir a relevância disso do ponto de vista terapêutico, sendo o potencial desses inibidores demonstrado no artigo de referência um motivador para essa pesquisa. A proteína-alvo tem como características muito importantes seus dobramentos e domínios. As estruturas secundárias caracterizam essa proteína pela presença de um núcleo com dobramento tipo Rossmann (Silhan et al., 2023), é o caso de uma beta folha central em formato de “jota” estabilizada por alfa hélices, um arranjo conservado dentre enzimas metabólicas que possuem relação com ácidos nucleicos e nucleotídeos (Hanukoglu, 2015). Seu domínio de ligação do cofator, nesse caso, uma S-adenosil metionina, é delimitado por resíduos hidrofóbicos e polares, e o ligante TO1119 afasta parte da rede de solvatação, alterando a conformação da proteína perceptivelmente (Figura 1). Nenhum aminoácido em ambos os cristais demonstrou-se fora do pH habitual no resultado da análise do propKa. Quanto à protonação do ligante, conforme o pH experimental de 8.0 (Silhan et al. 2023), a sinefungina do 8B07 se mantém carregada positivamente e o UG9 neutro. Na análise do ambiente aquoso, observou-se uma diferença entre os dois complexos cristalográficos. O cristal 8B07 (SFG–VP39MTase) apresentou 224 moléculas de água, enquanto o 8CEV (UG9-VP39MTase) apresentou apenas 79, correspondendo a uma redução de 145 moléculas no segundo. No 8B07, 157 moléculas de água estabeleceram interações com 116 resíduos da proteína, destacando-se ASP187 e ASP252 como os que exibiram o maior número de contatos. Já no 8CEV, 55 moléculas de água interagiram com 46 resíduos, sem aminoácidos se sobressaindo com mais interações. Em ambos os complexos, nenhuma molécula de água se ligou diretamente ao ligante. Esses resultados indicam que a substituição do ligante induz um rearranjo significativo da rede de solvatação, o que pode contribuir para diferenças na afinidade observada entre os dois compostos. A energia de interação encontrada ao longo dos raios das esferas concêntricas, levando em consideração a constante dielétrica de $\epsilon=40$, a convergência ocorreu para a SFG no raio 4,0 Å, possuindo um total de 91 interações dentro de valores de até 10 Å, e no 9,0Å para TO1119, totalizando 84 interações. Com isso as energias totais foram adquiridas por meio da soma das energias dos raios individualmente, o cristal 8B07 obteve -68,18 kcal/mol ($\epsilon=40$) e -81,09 kcal/mol ($\epsilon=10$) e o 8CEV -83,04 kcal/mol ($\epsilon=40$) e -359,15 kcal/mol ($\epsilon=10$), sendo ele o sistema mais energético. A partir disso, as interações não-covalentes são de suma importância para a atividade e correlação de moléculas no contexto biológico. Portanto, elas devem ser caracterizadas individualmente com mais especificidade, em detrimento dos aminoácidos

mais importantes na cavidade de ligação entrando em contraste com os mais relevantes do ponto de vista energético. A cavidade de interação do cofator da proteína VP39-MTase configura-se como um cânion hidrofóbico e polar, formado por PHE115, VAL116, VAL139, LEU159, ASP95, ARG97, GLN39 e ASP138, onde ocorre a catalisação do cofator. Dentre os resíduos com maior expressividade energética, em constante $\epsilon=40$, as interações foram selecionados 6 para a SFG, sendo eles 4 de energia atrativa e 2 de energia repulsiva: ILE94 (1,022), ASP95 (-10,410), PHE115 (-5,289), ASP138 (-9,613), VAL139 (-7,649) e ARG209 (1,562) e 7 para o TO1119, com 2 de energia repulsiva e 5 de energia atrativa, ASP95 (-6,325), GLY96 (0,702), ARG97 (-5,540), PHE115 (-5,333), VAL116 (0,138), ASP138 (-6,080) e ARG140 (-4,342). Conforme o mostrado, foram observados 3 aminoácidos relevantes comuns à ambos: ASP95, PHE115 e ASP138, o primeiro realiza 4 interações com o TO1119 e 5 interações com a SFG, justificando sua queda de energia, principalmente com a perda de interações de ponte salina, as quais contribuem muito com a afinidade com resíduo de aspartato (Schiebel et al., 2018). PHE115, forma uma interação com o anel de adenina em ambas as moléculas, gerando uma interação pi-pi, a qual é uma das mais importantes no que diz respeito à interação de adeninas com proteínas virais (Mao et al., 2004) além de ser altamente conservado em vírus que precisam interagir com esses compostos para se replicar, como no caso do SARS-CoV2 (Kerr et al., 2024). Investigando mais a fundo sobre a influência do deslocamento de águas diante das diferenças estruturais da SFG em UG9 a alteração da posição e da interação de aminoácidos deve-se levar em consideração de acordo com a presença delas nos raios de esferas concêntricas. Ambos apresentaram quantidades de aminoácidos integrantes parecidos, 25 para o 8CEV e 27 para o 8B07, no entanto percebe-se uma maior concentração de interações em raios inferiores ou igual a 3,0 angstrom com o ligante otimizado (2,0 Å: 7 aa, 2,5 Å: 7 aa, 3,0 Å: 6 aa, 3,5 Å: 2 aa e 4,0 Å: 3 aa) apresentando uma molécula de água interagindo com os aminoácidos, diferentemente da SFG que não apresentou quedas bruscas no número de interações através dos raios (2,0 Å: 5 aa, 2,5 Å: 7 aa, 3,0 Å: 6 aa, 3,5 Å: 4 aa e 4,0 Å: 5 aa), além de que há a presença de 10 moléculas de água, confirmando que acontece uma movimentação de águas com a mudança do ligante.

Conclusão

Diante das informações obtidas do levantamento de literatura e dos resultados dos cálculos de experimentos em biofísica quântica, é possível retirar algumas conclusões. Em primeiro plano, as diferenças estruturais dentre os inibidores apesar de poucas foram relevantes para a mudança na afinidade com a proteína. A substituição de dois átomos de nitrogênio por um de iodo na posição 7-deaza em um dos anéis de adenina e outro de enxofre após o grupo adenossil, mudando-o de N-adenossil para S-adenossil, pode ter contribuído com o aumento de hidrofobicidade dessas regiões promovendo o deslocamento de águas do sítio de ligação, mas ainda enfraquecendo interações possivelmente importantes com aminoácidos da região. Dessa forma, a investigação de funções de regiões da estrutura pode se tornar um grande passo para o desenvolvimento de mais fármacos e até mesmo de pan-antivirais, influenciando e impactando totalmente no âmbito do tratamento de viroses em geral, ao explorar homologias na estrutura de MTases e entendendo o comportamento da interação em detrimento da estrutura de pan-inibidores, como foi descrito nesse trabalho. No entanto, a análise aqui descrita ainda é pouco suficiente e de caráter exploratório, necessitando ainda de estudos mais abrangentes que contribuam para a elucidação desses farmacóforos na interação proteína-ligante

Referências

MITJÀ, Oriol et al. Monkeypox. *The Lancet*, v. 401, n. 10370, p. 60–74, 7 jan. 2023.

HARAPAN, H. et al. Monkeypox: A Comprehensive Review. *Viruses*, v. 14, 2022.

SHULMAN, Stanford T. Monkeypox Emergence and the Eradication of Smallpox: An Historical Review. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, v. 12, n. 2, p. 73–75, 1 fev. 2023.

SAH, Ranjit et al. Monkeypox and Its Possible Sexual Transmission: Where Are We Now with Its Evidence? *Pathogens*, v. 11, n. 8, p. 924, ago. 2022.

LI, Heng et al. The land-scape of immune response to monkeypox virus. *EBioMedicine*, v. 87, p. 104424, jan. 2023.

KARAGOZ, Aysel et al. Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. *Journal of Infection and Public Health*, v. 16, n. 4, p. 531–541, abr. 2023.

ZHAO, Kun; WOHLHUETER, Robert M.; LI, Yu. Finishing monkeypox genomes from short reads: assembly analysis and a neural network method. *BMC Genomics*, v. 17, n. 5, p. 497, 31 ago. 2016.

ALAKUNLE, Emmanuel et al. Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. *Viruses*, v. 12, n. 11, p. 1257, 5 nov. 2020.

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: 20 ago. 2025.

AMÉRICO, Jeffrey L.; EARL, Patricia L.; MOSS, Bernard. Virulence differences of mpox (monkeypox) virus clades I, IIa, and IIb.1 in a small animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 120, n. 8, p. e2220415120, 21 fev. 2023.

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, n. 1, p. 2259, 20 abr. 2023.

MATIAS, Érika Geicianny de Carvalho. Abordagem em bioquímica quântica aplicados à modulação de SIRT6 e PIM1: desvendando novas estratégias terapêuticas com flavonoides. 24 jan. 2025.

ROBIDAS, Raphaël; LEGAULT, Claude Y. How to obtain accurate results with molecular iodine and density functional theory? *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 124, n. 1, p. e27277, 2024.

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, 9 dez. 2008.

HE, Xiao et al. Fragment Quantum Mechanical Calculation of Proteins and Its Applications. *Accounts of Chemical Research*, v. 47, n. 9, p. 2748–2757, 16 set. 2014.

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, 7 maio 2009.

HSIAO, Y. et al. Quantum refinement of protein structures: implementation and application to the red fluorescent protein DsRed.M1. *The journal of physical chemistry. B*, v. 114 46, p. 15413–23, 2010.

HANUKOGLU, Israel. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 43, n. 3, p. 206–209, 2015.

SCHIEBEL, J. et al. Intriguing role of water in protein-ligand binding studied by neutron crystallography on trypsin complexes. *Nature Communications*, v. 9, 2018.

MAO, L. et al. Molecular determinants for ATP-binding in proteins: a data mining and quantum chemical analysis. *Journal of molecular biology*, v. 336 3, p. 787–807, 2004.

KERR, Catherine M. et al. Mutation of a highly conserved isoleucine residue in loop 2 of several β -coronavirus macrodomains indicates that enhanced ADP-ribose binding is detrimental for replication. *Journal of Virology*, v. 98, 2024.

Interações_TO1119

Figura1_Comparativo

Figura_TO1119_pH8

Figura_SFG_pH8

Interações_SFG

CÓDIGO: SB1590

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 recrudescence 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 (locomoto 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-1 β e IL-6 por ELISA/CBA. Além disso, avaliou-se a expressão gênica de marcadores inflamatórios (TLR2, TLR9, NLRP3, ASC, Caspase-1, Myd88, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 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 seções 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-1 β , 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-1 β , 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-1 β 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.

DESRUISSEAU, 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

Figura 5 – Efeito de tratamentos com ART e AQ por gavagem

Figura 6 – Eficácia de diferentes regimes com ART ip e combinações

Figura 7 – Tratamento eficaz com ART + AQ

Tabela 1: Análise da eficácia dos tratamentos antimaláricos após infecção de camundongos C57BL/6 por PbNK65.

CÓDIGO: SB1613

AUTOR: MARIA ELOISA GOMES TEIXEIRA PEIXOTO

ORIENTADOR: ANAMARIA DAL MOLIN

TÍTULO: Levantamento Preliminar de Vespas Parasitoides de Áreas da Mata Atlântica do Rio Grande do Norte

Resumo

Inimigos naturais de insetos fitófagos, incluindo predadores, parasitoides e patógenos, são essenciais para manter populações sob controle e evitar que se tornem pragas. A ordem Hymenoptera abriga muitas vespas que são representantes importantes de parasitoides. Estima-se que existam entre 300 mil e 3 milhões de Hymenoptera, a maior parte ainda desconhecida, principalmente nas regiões tropicais. Assim, conservar habitats que abrigam essas espécies e realizar inventários básicos é tão importante quanto estudar cada sistema hospedeiro-parasitoide. O presente estudo tem enfoque na superfamília Ichneumonoidea e foi realizado no Parque Estadual das Dunas de Natal (RN), a primeira Unidade de Conservação do Rio Grande do Norte, composto em grande parte por vegetação característica da Mata Atlântica. Utilizou-se armadilha Malaise, redes de varredura e busca no inventário do LABMOSCA por amostras com vespas parasitoides. Os insetos foram triados, montados e depositados na Coleção Entomológica UFRN (CE-AAVF DMP/UFRN), onde estão sendo identificados a níveis mais precisos e ficarão disponíveis para estudos futuros. Registrou-se 484 indivíduos de Ichneumonoidea: 383 Braconidae e 101 Ichneumonidae. Dos que já foram identificados a espécie, há representantes de *Opius bellus*, *Doryctobracon areolatus*, *Diachasmimorpha longicaudata*. O estudo amplia o inventário faunístico local e reforça a conservação de habitats e coleções científicas.

Palavras-chave: Entomofauna. Hymenoptera. Ichneumonoidea.

TITLE: Preliminary Survey of Parasitoids in Areas of Atlantic Forest of the State of Rio Grande do Norte

Abstract

The natural enemies of the phytophagous insects, including predators, parasitoids and pathogens, are essential to keep the populations under control and avoid them becoming plague. The order Hymenoptera includes many wasps that are important parasitoids. It is estimated that there are between 300 thousand and 3 million of Hymenoptera, the largest part is still unknown, especially in tropical regions. That being said, conserving habitats that house those species and fulfill the basic inventories is just as important as studying each system of the parasitoid-host. This study focuses on the superfamily Ichneumonoidea and it was held at the Parque Estadual das Dunas de Natal (RN), largely composed of Atlantic

Forest vegetation. We used a Malaise trap, sweeping nets field collections and active searches for samples of parasitoid wasps on the LABMOSCA's inventory. The insects were sorted, prepared and deposited at the UFRN Entomological Collection (CE-AAVF DMP/UFRN), where they are being identified to a more accurate level and will be available for future research. In total, 484 Ichneumonoidea individuals were recorded: 383 Braconidae e 101 Ichneumonidae. Of those who have already been identified to species level, their representants are: *Opius bellus*, *Doryctobracon areolatus*, *Diachasmimorpha longicaudata*. This study amplifies the local faunal inventory and reinforces the conservation of habitats and scientific collections.

Keywords: Entomofauna. Hymenoptera. Ichneumonoidea.

Introdução

Em 1760, Linnaeus já afirmava que todo organismo vivo tem seu inimigo natural. No âmbito do controle biológico, os inimigos naturais são referidos como predadores, parasitas e patógenos (BERTI FILHO; MACEDO, 2010). Predadores matam suas presas, necessitando de mais de uma delas ao longo da vida. Parasitas podem utilizar um ou mais hospedeiros, mas em geral não os matam. Autores podem distinguir também parasitoides, que possuem seu desenvolvimento inicial como parasitas e podem atacar hospedeiros durante diferentes fases do ciclo de vida, porém matando seu hospedeiro ao emergir, sendo o adulto de vida livre (PARRA et al., 2002). Inimigos naturais de insetos fitófagos são importantes na regulação das populações de seus hospedeiros e presas, para que não se tornem pragas (BERTI FILHO; MACEDO, 2010).

As vespas, assim como as abelhas e as formigas, compõem o táxon Hymenoptera, uma das mais vastas ordens de insetos, com atualmente mais de 150.000 espécies descritas (RAFAEL, et al., 2024). Este grupo é extremamente relevante tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico, uma vez que inclui não só polinizadores e insetos sociais, como a absoluta maioria das espécies de insetos que são utilizadas no controle biológico de pragas agrícolas e florestais. Entre elas estão importantes exemplos, como os parasitoides inimigos naturais das moscas-das-frutas, de pulgões e de cochonilhas (FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2006), todos de grande relevância para atividades como a fruticultura, que é uma parte significativa do setor primário no estado do Rio Grande do Norte (GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, 2014). Inicialmente, decidiu-se por focar esforços para a superfamília Ichneumonoidea, considerando sua relevância e boa amostragem neste tipo de armadilha. Ichneumonoidea é formada pelas famílias Braconidae, parasitoide de larvas de besouros, lepidópteros, e himenópteros basais, a maioria internos, mas muitas emergem para pupar fora dos hospedeiros; e Ichneumonidae, parasitoides externos ou internos, atacam larvas e pupas da maioria dos insetos (FLINT; DREISTADT, 1998). As armadilhas Malaise estão entre as mais importantes para coletar insetos de voo diurno, em geral a primeira escolha para pesquisas de Inventário da Biodiversidade de Todos os Táxons (VAN ACHTERBERG, 2009).

Uma parte significativa da ordem Hymenoptera são inimigos naturais de insetos fitófagos. Porém, ainda existe um grande número de espécies desconhecidas, principalmente nas regiões tropicais. Estima-se que existam entre 300 mil e 3 milhões de espécies de Hymenoptera vivas (Gaston et al. 1996). Por isso, muitas vezes a conservação de habitats que

abrigam essas espécies e trabalhos de inventário acabam sendo tão importante quanto o estudo de cada sistema hospedeiro-parasitoide.

O controle biológico depende da pesquisa ecológica (BERTI FILHO; MACEDO, 2010). E a preservação precisa de inventários ao menos num nível básico. Em parceria com o projeto Lifeplan, da Universidade de Helsinki, armadilhas Malaise foram instaladas no ano de 2022 na Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta e no ano de 2023, no Parque Estadual das Dunas de Natal, havendo coletas semanais. O principal foco daquele projeto são estudos em ambientes expostos a diferentes graus de influência urbana (LIFEPLAN, 2023); porém, abre a oportunidade para inventário, uma vez que trata-se de áreas subamostradas para os táxons aqui enfocados.

Neste trabalho enfocamos coletas do Parque Estadual das Dunas de Natal, criado em 1977 como a primeira Unidade de Conservação do Rio Grande do Norte, que inclui elementos peculiares à vegetação da Mata Atlântica, algumas espécies de Caatinga e da Formação de Tabuleiro Litorâneo (RIO GRANDE DO NORTE, 1989).

Assim, o principal objetivo deste trabalho é contribuir para iniciar a caracterização de alfa e beta biodiversidade de parasitoides da superfamília Ichneumonoidea presentes do Parque Estadual das Dunas de Natal, contribuindo deste modo para o inventário faunístico local.

Metodologia

Coletas: Os estudos foram conduzidos no Parque Estadual das Dunas do Natal, situado na parte oriental do Estado do Rio Grande do Norte, na região da Grande Natal, no Município de Natal, entre as coordenadas: Latitude 5°48'S a 5°53'S e Longitude 35°09'W a 35°12'W, com uma área de 1.172,80ha (FREIRE, 1990). As coletas foram realizadas em áreas planas próximas ao centro de amostragem do projeto principal, cercadas por vegetação alta, característica de uma floresta ombrófila (RADAMBRASIL, 1981), e grande quantidade de serrapilheira. Com o clima Tropical Chuvoso (As'), caracterizado por apresentar verão seco e temperatura média mensal acima de 18°C em todos os meses do ano (COSTA, 2018).

Utilizou-se armadilha do tipo Malaise para interceptação de voo, localizada com o frasco de álcool direcionado para o Norte (Lifeplan, 2022). A amostragem foi complementada com coleta ativa na vegetação adjacente, ou seja, rede de varredura. O material amostrado foi recolhido em álcool etílico 95% e trazido ao laboratório. As amostras foram pré-triadas a nível de ordem, posteriormente realizou-se uma nova triagem para separação, identificação e montagem dos espécimes da superfamília Ichneumonoidea a serem estudados. Também foram utilizados espécimes provenientes de criação em laboratório, a partir de pupários de moscas-das-frutas presentes em amostras recolhidas de frutos do Parque e depositadas previamente no Laboratório de Pesquisas em Moscas-das-Frutas (LABMOSCA).

Inventário: Os espécimes foram tabulados em planilha segundo as datas dos campos e métodos de coleta.

Montagem: Os insetos foram montados conforme Almeida, Ribeiro-Costa e Marinoni (2012), seguindo a montagem em alfinete entomológico para os de tamanhos maiores ou a dupla montagem em triângulos ou cartões retangulares para os menores, de tal forma que a face e as mandíbulas permanecessem visíveis. O armazenamento a longo prazo em álcool não é recomendado, por causar o deterioramento mais rápido, especialmente dos indivíduos muito

pequenos (NOYES, 1982).
Identificação: A identificação foi realizada com auxílio das chaves Hymenoptera of The Wold: An Identification Guide to Families (GOULET, H.; HUBER, J.T., 1993); Parasitoids of Fruit-Infesting Tephritidae (Wharton, RA; Yoder, MJ., 2025); Key to the Subfamilies of North and Central American Ichneumonidae (Wahl, 2002). Em seguida, a composição de morfoespécies de insetos por grupo taxonômico tabulada, e compilada em uma lista dos táxons representados e identificados até o menor nível taxonômico possível. O material coletado está sendo depositado ao final dos experimentos na Coleção Entomológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CE-AAVF DMP/UFRN).

Resultados e Discussões

Das amostras obtidas, foi possível triar e identificar até o nível de família todas aquelas provenientes de rede de varredura e aquelas obtidas de pupas de moscas-das-frutas, assim como parte do material capturado por malaise, para um total de 484 vespas parasitoides da superfamília Ichneumonoidea até o momento. Dessas, 383 da família Braconidae e 101 da família Ichneumonidae.

O total de indivíduos obtidos por método de coleta e família está resumido na tabela 1. As vespas de armadilhas Malaise encontram-se ainda em processo de triagem; nestas, já contabilizam 100 Ichneumonidae e 191 Braconidae. Dentre as vespas associadas a frutos foram identificados 288 representantes de Braconidae (34 *Opius* sp., 192 *Doryctobracon areolatus* 2 *Diachasmimorpha longicaudata*). As vespas dos gêneros *Opius*, *Doryctobracon* e *Diachasmimorpha*, como outros membros da subfamília Opiinae, são endoparasitoides cenobiontes de moscas (Diptera Cyclorrhapha), que fazem a oviposição nos ovos ou larvas do hospedeiro, e emergem a partir do pupário. Desta forma, é possível inferir que os parasitoides criados são confirmadamente de cada uma das localidades, considerando-se o protocolo de criação, uma vez que os frutos foram mantidos em isolamento com sacos de voal a partir da coleta e os pupários foram removidos a partir da vermiculita periodicamente, conforme protocolo (MALAVASI; ZUCCHI, 2000). Estes resultados estão de acordo com o esperado com relação a parasitoides associados a Tephritidae (Diptera) frugívoros.

Nas amostras de varredura, o grupo mais bem representado também foi Braconidae (92). Braconidae (Ichneumonoidea) é uma das maiores famílias de parasitoides, possuindo quase 20000 espécies descritas. Afetam uma vasta gama de hospedeiros, a maioria deles atacando larvas de Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (WHARTON, 1997). Vários são utilizados no controle biológico, sendo um dos maiores exemplos no Brasil a vespa *Cotesia* (Microgastrinae), usada no controle da broca-da-cana, importante praga da cana-de-açúcar e milho.

Conclusão

Este trabalho contribui para a caracterização dos parasitoides de regiões de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte, que continuam pouco exploradas. É importante também não só

registrar, mas estabelecer os espécimes em coleções científicas onde estejam mantidos em condições ideais para a preservação prolongada e disponibilidade para estudos. Por isso é indispensável depositar as vespas na Coleção Entomológica UFRN (CE-AAVF DMP/UFRN), que conforme Rodrigues e Dal Molin (2022), não apresentava nenhuma braconidae. Bem como na Coleção Taxonômica do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCAR (UFSCAR/São Carlos, SP), para estudos mais aprofundados.

Referências

ALMEIDA, L. M; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, L. Coleta, montagem, preservação e métodos para estudo. In: Rafael, A. J. et al (eds). Insetos do Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2012, p. 176-190.

BERTI FILHO, Evoneo; MACEDO, Luciano Pacelli Medeiros. Fundamentos de controle biológico de insetos-praga. Natal: IFRN Editora, 2010. 108 p. ISBN 978-85-8161-012-2.

COSTA, Priscila Machado da. Balanço hídrico como contribuição ao estudo de impactos socioambientais na cidade de Natal/RN: um estudo de caso. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018.

FERNÁNDEZ, F.; SHARKEY, M.J. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Colombia, Bogotá: Serie Entomologia Colombiana, Sociedade Colombiana de Entomologia, 2006. 896 p.

FLINT, Mary Louise; DREISTADT, Steve H. Natural enemies handbook: the illustrated guide to biological pest control. Illustrated ed. Berkeley: University of California Press, 1998. 154 p. ISBN 9780520218017.

FREIRE, M. S. B. Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas do Natal. Acta Botanica Brasilica, v. 4, n. 2, p. 41–59, 1990.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE. PERFIL DO RIO GRANDE DO NORTE. Natal: Secretaria de Estado do Planejamento e das Finanças, 2014. 197 p. Disponível em: . Acesso em 08 Jun. 2023.

GOULET, H.; HUBER, J.T. Hymenoptera of the world: an identification guide to families. Ontario: Agriculture Canada Publication, 1993. 668p.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. Fundamentos da entomologia: 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2017. 912 p.

LIFEPLAN, A Planetary Inventory of Life. University of Helsinki. Disponível em: <https://www2.helsinki.fi/en/projects/lifeplan/about>. Acesso em maio, 2022.

LIFEPLAN, A Planetary Inventory of Life. University of Helsinki, 2023. Disponível em: . Acesso em 08 set. 2023.

MELO, G.A.R.; AGUIAR, A.; GARCETE-BARRET. Hymenoptera. In: Rafael, J. A. et al (eds.) Insetos do Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2012, p. 554-612.

NOYES, John S. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea), Journal of Natural History, 16:3, 315-334, 1982.

OLIVEIRA, M. L. et al. Hymenoptera in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: . Acesso em: 08 Set. 2023.

PARRA, José Roberto Postali; BOTELHO, Pericles Sant’Ana; CORRÊA-FERREIRA, Benedito Simões; BENTO, José Maurício Simões. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. 635 p.

RADAMBRASIL. Folhas SB 24/25: Jaguaribe/Natal: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, v.23, p. 485-535, 1981.

RAFAEL, José Albertino, et al. Insecta. in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: . Acesso em: 30 Ago. 2023.

RAFAEL, J. A. et al. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 2º Edição ed. Manaus - AM: Editora INPA, 2024.

RIO GRANDE DO NORTE. Secretaria do Planejamento. Plano de Manejo do Parque Estadual do Rio Grande do Norte. Natal. 1989.

RODRIGUES, S. H. L.; DAL MOLIN, A. Análise preliminar do estado de conhecimento da himenopterofauna do Rio Grande do Norte a partir de dados primários de ocorrência em coleções entomológicas. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2022, Fortaleza. Anais eletrônicos. Viçosa: Sociedade Entomológica do Brasil, 2022. p. 251.

VAN ACHTERBERG, Kees. Can Townes type Malaise traps be improved? Some recent developments. Entomologische berichten, v. 69, n. 4, p. 129-135, 2009.

WAHL, David B. Key to the subfamilies of North and Central American Ichneumonidae. 2002. Disponível em: http://www.amentinst.org/Subfamily_Key.php. Acesso em: 29 ago. 2025.

WHARTON, R. A.; YODER, M. J. Parasitoids of fruit-infesting Tephritidae. Disponível em: <http://paroffit.org/public/site/paroffit/home>. Acesso em: 29 ago. 2025.

Anexos

Tabela 1 - Vespas parasitoides da superfamília Ichneumonoidea do Parque Estadual das Dunas, Natal/RN

CÓDIGO: SB1635

AUTOR: CLEDSTON MATHEUS ANDRADE MACÁRIO

COAUTOR: ANAMARIA DAL MOLIN

COAUTOR: TITO AURELIANO

ORIENTADOR: ALINE MARCELE GHILARDI

TÍTULO: Insetos fósseis da Bacia do Araripe nas coleções de paleontologia da UFRN

Resumo

Fósseis de insetos provenientes da Formação Crato (Aptiano) da Bacia do Araripe, Nordeste do Brasil, são componentes frequentes de coleções paleontológicas no Brasil e no exterior e constituem material-chave para estudos sobre a evolução dos insetos e suas relações ecológicas. Neste trabalho, realizamos um levantamento dos fósseis de insetos da Formação Crato depositados nas coleções de Paleontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), com o objetivo de identificar sua diversidade taxonômica e contribuir para a curadoria do material. Ao todo, foram mapeados 37 espécimes, sendo 26 pertencentes à coleção do Laboratório de Paleontologia e Paleoecologia (LPP) do Departamento de Geologia e 11 ao Setor de Paleontologia do Museu Câmara Cascudo (MCC). Os materiais foram identificados até o nível taxonômico menos inclusivo possível, com base em guias de entomologia e comparação com exemplares previamente descritos na literatura. Foram reconhecidos representantes das ordens Orthoptera, Hymenoptera, Odonata, Blattaria, Ephemeroptera, Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Neuroptera e Raphidioptera. Dos 37 fósseis, pelo menos 4 representam espécies potencialmente novas para a ciência, ressaltando o alto potencial taxonômico das coleções da UFRN e a importância de sua adequada curadoria e estudo sistemático.

Palavras-chave: Curadoria . Grupo Santana . Taxonomia . Geodiversidade

TITLE: Fossil insects from the Araripe Basin on paleontological collections of the UFRN

Abstract

Insect fossils from the Crato Formation (Aptian) of the Araripe Basin, Northeast Brazil, are common components of paleontological collections in Brazil and abroad, and constitute key material for studies on insect evolution and their ecological relationships. In this study, we surveyed insect fossils from the Crato Formation deposited in the paleontology collections of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), with the aim of identifying their taxonomic diversity and contributing to the curation of the material. A total of 37 specimens

were mapped, 26 belonging to the collection of the Paleontology and Paleoecology Laboratory (LPP) of the Department of Geology and 11 to the Paleontology Sector of the Câmara Cascudo Museum (MCC). The materials were identified to the least inclusive taxonomic level possible, based on entomology guides and comparison with specimens previously described in the literature. Representatives of the orders Orthoptera, Hymenoptera, Odonata, Blattaria, Ephemeroptera, Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Neuroptera, and Raphidioptera were recognized. Of the 37 fossils, at least four represent species that are potentially new to science, highlighting the high taxonomic potential of the UFRN collections and the importance of their proper curation and systematic study.

Keywords: Curatorship . Santana Group. Taxonomy . Geodiversity

Introdução

Insetos compõem cerca de 50% de toda a diversidade de espécies viventes descritas (Ritchie, 2022). São importantes para diversas funções ecossistêmicas, incluindo polinização, decomposição de matéria orgânica, controle biológico de outros organismos considerados “pragas” etc. A origem do grupo é estimada em ~479 Ma, entre os períodos Ordoviciano e Siluriano (Misof et al., 2014), porém, os fósseis pré-Carbonífero são extremamente escassos (Garrouste et al., 2012; Wang et al., 2016). Por outro lado, os fósseis encontrados no Cretáceo são muito mais numerosos, especialmente devido à diversificação dos insetos associada ao surgimento e diversificação das plantas com flores (Peris & Condamine, 2024).

O Nordeste Brasileiro é particularmente rico em formações do Período Cretáceo encontradas em diversas bacias sedimentares, como a Potiguar, Sergipe-Alagoas, Recôncavo, Tucano, Araripe, entre outras (Garcia, 1991; Goes & Júnior, 2017). Dentre as unidades cretáceas, a Formação Crato se destaca mundialmente por conta de seu conteúdo fossilífero (Assine, 2007; Assine et al., 2014; Martill et al., 2007). É uma importante unidade geológica localizada na Bacia do Araripe, entre os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí. Ela é conhecida por sua qualidade excepcional de preservação, sendo considerada um dos mais importantes Fossilagerstätte do Cretáceo do mundo (Storari et al., 2024), contendo registros de fósseis de vertebrados (Gallo et al., 2009; Pinheiro et al., 2012), plantas (Conceição et al., 2024), invertebrados (Barling et al., 2020; Barros et al., 2021; Moura-Júnior et al., 2018), entre outros organismos. A idade Aptiana da Formação (125-113 Ma) coincide com picos de diversidade de insetos, tornando-a um importante depósito para estudos da diversidade pretérita desse grupo (Schachat et al., 2019). Os insetos fósseis dessa unidade são estudados e documentados desde 1950 (Costa Lima, 1950). Desde então, 379 espécies de insetos já foram descritas até o ano de 2018 (Moura-Júnior et al., 2018).

Devido à elevada diversidade de insetos encontrados nessa unidade, é comum que eles sejam parte importante de coleções científicas no Brasil e no exterior (Grimaldi, 1990; Martill et al., 2007; Osés & Petri, 2012; Sousa et al., 2016). Entretanto, a maior parte dessas coleções não disponibiliza catálogos ou inventários taxonômicos, e muitos materiais sequer são identificados (Sousa et al., 2016). Os motivos desse problema podem ser atribuídos ao alto número de espécies descritas, à escassez de especialistas em taxonomia de insetos fósseis e pela dificuldade de acesso à literatura descritiva. Outro fator relevante é a origem dos espécimes, sobretudo em coleções estrangeiras, uma vez que a compra de fósseis brasileiros é proibida e a posse dentro e fora do Brasil, é regulamentada (SBP, 2025). Ainda assim, não é incomum que coleções particulares e de instituições de pesquisa mantenham e pesquise

esses fósseis, mesmo que tenham sido levados de forma ilegal (Cisneros et al., 2022; Kashani et al., 2024; Stewens, 2023).

Na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), duas coleções paleontológicas preservam insetos fósseis da Formação Crato: o Laboratório de Paleontologia e Paleoecologia do Departamento de Geologia (LPP-DG) e o Setor de Paleontologia do Museu Câmara Cascudo (MCC) (Macário & Ghilardi, 2022) (Figura 1).

Metodologia

Primeiramente foi conduzida uma busca bibliográfica sistemática por artigos de descrição de insetos fósseis na plataforma Periódicos Capes (periodicos.capes.gov.br). As buscas foram realizadas usando uma combinação do nome das ordens de insetos, acrescido dos termos “Crato Formation”, ou “Santana Formation”, ou “Araripe Basin”. Junto a isso, foi consultada a bibliografia de revisões sistemáticas anteriores (e.g., Martins-Neto, 2005; Moura-Júnior et al., 2018).

A preparação dos espécimes foi conduzida por meio de técnicas mecânicas, removendo o excesso de matriz rochosa com alfinetes entomológicos de diferentes calibres sob estereomicroscópio. Cada fóssil foi examinado em busca de características morfológicas diagnósticas, sendo sua identificação taxonômica realizada com auxílio de guias entomológicos e por comparação direta com espécies previamente descritas na literatura, dado que não existem chaves dicotômicas abrangentes para todos os insetos fósseis da Formação Crato. Notações de nomenclatura aberta seguiram Bengtson (1988).

A documentação fotográfica dos espécimes foi feita com smartphone Samsung Galaxy S25 Ultra (para os espécimes do LPP-DG e com câmera Canon EOS Rebel T7+ (para os espécimes do MCC).

Os espécimes analisados têm origens diversas. Parte foi coletada por professores ou alunos de graduação em Geologia durante a disciplina Mapeamento Geológico de Terrenos Sedimentares (GEO0561) e doada para o LPP. Outros foram obtidos em atividades de campo conduzidas pelos membros do laboratório nos anos de 2012 e 2022. Em 2025, novos exemplares foram doados ao MCC por meio de um acordo institucional com o Museu de Paleontologia Plácido Cidade Nuvens (MPPCN) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Para fins de curadoria provisória, foi estabelecido um sistema de numeração temporária: os fósseis do LPP receberam o prefixo “LPP-Ins” e os do MCC, o prefixo “MCC-P-Ins”.

Resultados e Discussões

Revisão Bibliográfica

A revisão bibliográfica encontrou um total de 191 artigos e capítulos de livros que descrevem insetos fósseis da Bacia do Araripe. Com exceção do *Araripegryllus romualdoi* Freitas, Moura & Saraiva, 2016, todos são provenientes da Formação Crato, totalizando 452 espécies descritas até agora, um aumento de 25,9 % em relação à última revisão, realizada por Moura-Júnior et al. (2018).

Foram encontradas 18 ordens de insetos descritas para a Formação Crato; as mais numerosas sendo Neuroptera (92; 20,4%), Orthoptera (66; 14,6%), Hemiptera (62; 13,7%) e Odonata (58; 12,8%). Esses resultados foram usados para desenvolvimento de um artigo com uma nova lista de espécies para a unidade, o artigo foi submetido à revista *Palaeontologia Electronica* (ISSN: 1094-8074) e está atualmente na 2ª rodada de revisão por pares.

Preparação dos fósseis

A preparação dos materiais foi necessária em praticamente todos os espécimes. A Formação Crato possui dois tipos de calcários laminados: um de coloração amarelo-creme, e outro rosado-acinzentado (Bezerra et al., 2021). O calcário mais acinzentado foi mais difícil de ser preparado. Em alguns casos, não foi possível devido à alta cimentação da matriz rochosa. O calcário amarelo, por outro lado, é mais macio e pode ser retirado com mais facilidade.

Identificação dos espécimes

Foram identificados 26 espécimes na coleção do LPP, distribuídos em 10 ordens. A maioria pertence a Orthoptera (8), seguido por Hymenoptera (3) e Odonata (3). As ordens Blattaria, Ephemeroptera, Lepidoptera, Hemiptera e Diptera estão representadas por 2 exemplares cada, enquanto Neuroptera e Raphidioptera apresentam 1 exemplar cada.

Dos 26 fósseis, 22 estão preservados em apenas uma das faces e 4 apresentam parte e contraparte. Dois desses últimos estavam originalmente na mesma amostra de rocha e precisaram ser separados com auxílio de uma micro retífica. Outro espécime encontra-se preservado em uma laje contendo um peixe fóssil da espécie *Dastilbe crandalli*, e, portanto, estava catalogado como um ictiofóssil, sem que fosse percebido o fóssil de inseto.

Na coleção do MCC, foram identificados 11 espécimes, distribuídos em 5 ordens: Blattaria (5), Orthoptera (2), Hemiptera (2), Odonata (1) e Coleoptera (1). Entre eles, 7 já haviam sido listados por Macário & Ghilardi (2023), porém sem identificação taxonômica detalhada. Os outros 4 exemplares foram doados recentemente pelo MPPCN.

Dos 11 espécimes do MCC, apenas 1 está preservado em parte e contraparte. Uma descrição completa de todos os exemplares pode ser encontrada nas Tabelas 1 e 2.

Sete espécimes não puderam ser identificados em nível de gênero ou espécie: **LPP-Ins - 05, 08, 10, 14, 15, 21**; e **MCC-P-Ins - 07**. Os seis exemplares do LPP apresentam baixo grau de preservação ou ausência de caracteres diagnósticos. O espécime do MCC, embora relativamente bem preservado, exibe baixo contraste, sendo difícil a sua visualização mesmo sob estereomicroscópio. Apesar da possibilidade de representar uma nova espécie, optou-se mantê-lo como *incertae sedis*.

Entre os demais fósseis, duas das espécies puderam ser determinadas até o nível de subfamília, duas ao nível de superfamília, duas até subordem e uma até o nível de ordem. Apenas dois exemplares foram identificados em nível de gênero: **LPP-Ins - 12** e **LPP-Ins - 24**. No primeiro, a estrutura responsável pela diferenciação específica não se encontra

preservada. Já no segundo, o exemplar possivelmente está completo, mas encontra-se preservado no calcário cinzento, cuja maior cimentação impossibilitou a preparação mecânica que viabilizaria a identificação de estruturas diagnósticas para a espécie.

Espécies novas

Pelo menos 4 espécimes analisados representam espécies ainda não descritas para a Formação Crato:

LPP-Ins - 06B: Exemplar pertencente à subordem Culicomorpha, semelhante a um mosquito. mede menos de 1,5 mm de comprimento, sendo potencialmente a menor espécie de inseto (em sua forma adulta) já encontrada para a Formação Crato, mesmo em comparação a espécies diminutas como *Cretomanota gondwanica* Amorim & Oliveira, 2023. O espécime possui boa preservação de detalhes da cabeça, das pernas e do abdome.

LPP-Ins - 23: Material composto por parte e contraparte, pertencente à subordem Ensifera com ótimo grau de preservação. Detalhes do corpo e da asa anterior permitiram diferenciá-lo de outros representantes da família Baissogryllidae (Martins-Neto, 1991, 1995, 1999). O fóssil está preservado por incarbonização em calcário acinzentado.

LPP-Ins - 25: Exemplar pertencente a uma linhagem basal de mariposas chamada *Incurvariidae* (Zhang et al., 2013). Distingue-se de todas as espécies já descritas na unidade, mas apresenta afinidades com o espécime AMNH SF46441, depositado no American Museum of Natural History, Nova Iorque (Grimaldi & Engel, 2005, p. 562).

MCC-P-Ins - 05: Exemplar atribuído à família Corixidae, ainda não descrita para a Formação Crato. Está preservado em vista ventral, exibindo detalhes das pernas anteriores e do abdome. Diferencia-se de outras linhagens pelo formato da terminália e pela morfologia do aparelho bucal e das pernas anteriores (Hungerford, 1948).

Por que tantas espécies novas em uma coleção pequena?

Diversos pesquisadores da área de biodiversidade vêm alertando para a redução progressiva do número de profissionais interessados em taxonomia, fenômeno que impacta diretamente a compreensão da diversidade biológica, tanto atual quanto pretérita (Al-Asif & Nerurkar, 2024; Raposo et al., 2021). No caso específico dos insetos da Formação Crato, observa-se que os picos de descrições taxonômicas ocorreram por volta dos anos de 1990 e 2000, com declínio perceptível a partir de 2010 (Moura-Júnior et al., 2018). Uma das razões para essa queda é a morte do paleontólogo Rafael Gioia Martins-Neto (Hessel et al., 2010), responsável pela descrição de dezenas de espécies de insetos fósseis do Araripe. Cerca de 60% de seus 246 artigos publicados abordavam insetos da Formação Crato. Sua atuação foi determinante para a intensificação do interesse científico no tema.

Nos últimos anos, entretanto, a maioria dos estudos envolvendo insetos fósseis do Brasil tem se concentrado em questões tafonômicas ou paleoecológicas, muitas vezes impulsionadas pelo crescimento da área da paleometria (Santos et al., 2023). Embora relevantes, essas pesquisas não abordam questões “básicas” a respeito da diversidade taxonômica da biota cretácea Nordestina.

Esse quadro ajuda a explicar por que, mesmo em coleções pequenas, o potencial de descoberta de novas espécies ainda é elevado. Evidências recentes corroboram essa subestimação: em 2025 foi descrita formalmente a ocorrência da ordem Mecoptera na Formação Crato (Machado et al., 2025), bem como a formiga fóssil mais antiga já registrada (Lepeco et al., 2025). Além disso, grupos considerados relativamente bem estudados

continuam a revelar novas espécies, como demonstram as contribuições recentes de Batelka et al. (2025) e Bueno et al. (2025). Parte desses espécimes estavam depositados em uma coleção particular sob tutela da Dr^a Maria Aparecida Vulcano, porém, foram, recentemente, transferidos para a Coleção Entomológica do Museu de Zoologia da USP (Duarte & Silveira, 2023).

Em conjunto, esses dados reforçam que a diversidade de insetos da Formação Crato permanece significativamente subestimada, e que a reavaliação taxonômica sistemática, aliada a investimentos em curadoria e formação de especialistas, é essencial para ampliar a compreensão da paleobiodiversidade do Araripe.

Conclusão

Os insetos fósseis da Formação Crato constituem um componente relevante das coleções paleontológicas da UFRN, revelando não apenas o valor científico dessas coleções, mas também seu potencial de contribuir de forma significativa para o conhecimento da paleobiodiversidade do Cretáceo brasileiro. O levantamento realizado identificou 37 espécimes fósseis de insetos, a maioria com bom estado de preservação, incluindo pelo menos quatro exemplares que representam espécies potencialmente novas para a ciência. Esses resultados reforçam a ideia de que, mesmo em coleções relativamente pequenas, é possível revelar uma diversidade fóssil subestimada. O déficit de taxonomistas é um dos grandes entraves ao avanço da sistemática, e afeta não apenas a compreensão da biodiversidade atual, mas também a do passado geológico.

Referências

- Al-Asif, A.-, & Nerurkar, S. (2024). Taxonomy in crisis: Addressing the shortage of taxonomists in a biodiversity hotspot era. *Journal of Aquatic Research and Sustainability*, 1(2), 1–4.
- Amorim, D. de S., Oliveira, S. S., do Carmo, D. D. D., & Ribeiro, G. C. (2023). The oldest Gondwanan fossil of Leiinae (Diptera, Mycetophilidae): Phylogenetic and evolutionary implications. *Cladistics*, 39(1), 43–57.
- Assine, M. L. (2007). Bacia do Araripe. *Boletim de Geociências da Petrobras*, 15(2), 371–389.
- Assine, M. L., Perinotto, J. A. de J., Custódio, M. A., Neumann, V. H., Varejão, F. G., & Mescolotti, P. C. M. (2014). Sequências deposicionais do Andar Alagoas da Bacia do Araripe, Nordeste do Brasil. *Boletim de Geociências da Petrobras*, 22(1), 03–28.
- Barling, N., Martill, D. M., & Heads, S. W. (2020). A geochemical model for the preservation of insects in the Crato Formation (Lower Cretaceous) of Brazil. *Cretaceous Research*, 116, 104608.
- Barros, O. A., Viana, M. S. S., Viana, B. C., Silva, J. H. da, Paschoal, A. R., & Oliveira, P. V. de. (2021). New data on *Beurlenia araripensis* Martins-Neto & Mezzalana, 1991, a

lacustrine shrimp from Crato Formation, and its morphological variations based on the shape and the number of rostral spines. PLOS ONE, 16(3), e0247497. 97

Bengtson, P. (1988). Open nomenclature. Palaeontology, 31(1), 223–227.

Bezerra, F. I., Solórzano-Kraemer, M. M., & Mendes, M. (2021). Distinct preservational pathways of insects from the Crato Formation, Lower Cretaceous of the Araripe Basin, Brazil. Cretaceous Research, 118, 104631.

Cisneros, J. C., Ghilardi, A. M., Raja, N. B., & Stewens, P. P. (2022). The moral and legal imperative to return illegally exported fossils. Nature Ecology & Evolution, 6(1), Artigo 1.

Conceição, D. M., Gobo, W. V., Batista, M. E. P., Oliveira, N. C., Mastroberti, A. A., Iannuzzi, R., Bamford, M. K., & Kunzmann, L. (2024). Expanding the diversity of conifer xyloflora from Early Cretaceous Crato Fossil Lagerstätte, Brazil. Review of Palaeobotany and Palynology, 322, 105061.

Costa Lima, Â. M. da. (1950). Ninfa de Efemerideo Fossil do Ceará. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 22(4), 419–420.

Freitas, L. C. B., Moura, G. J. B. D., & Saraiva, A. a. F. (2016). First Occurrence and Paleo-Ecological Implications of Insects (Orthoptera: Ensifera Gryllidae) in the Romualdo Member of the Santana Formation, Eo-Cretaceous of the Araripe Basin. Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 88, 2113–2120.

Gallo, V., de Figueiredo, F. J., & Azevedo, S. A. (2009). Santanasalmo elegans gen. Et sp. Nov., a basal euteleostean fish from the Lower Cretaceous of the Araripe Basin, northeastern Brazil. Cretaceous Research, 30(6), 1357–1366.

Garcia, A. J. V. (1991). Evolução Sedimentar da Sequência Pré-Rift das Bacias Costeiras e Interiores do Nordeste Brasileiro. Pesquisas em Geociências, 18(1), 3–12.

Garrouste, R., Clément, G., Nel, P., Engel, M. S., Grandcolas, P., D’Haese, C., Lagebro, L., Denayer, J., Gueriau, P., Lafaite, P., Olive, S., Prestianni, C., & Nel, A. (2012). A complete insect from the Late Devonian period. Nature, 488(7409), 82–85.

Goes, E. R., & Júnior, A. V. F. (2017). Caracterização Morfossedimentar da Plataforma Continental Brasileira (Morphosedimentary characterization of the Brazilian Continental Shelf). Revista Brasileira de Geografia Física, 10(5), 1595–1613.

Grimaldi, D. A. (1990). Insects from the Santana Formation, Lower Cretaceous, of Brazil. (V. 195). [New York] : American Museum of Natural History.

Hessel, M. H., Carvalho, G. K. de, Soares, R. C., & Neto, J. de A. N. (2010). Rafael Gioia Martins Neto (1954-2010), sua vida e sua obra. Geologia, 23(2), Artigo 2.

Hungerford, H. B. (1948). The Corixidae of the Western Hemisphere (Hemiptera). The University of Kansas Science Bulletin, 32(1), 1--827.

Kashani, M. A. F., Raja, N. B., & Camargo, C. Q. (2024). #UbirajaraBelongstoBR: Social media activism against (neo)colonial practices in palaeontology. EGU sphere, 1–29.

Martill, D. M., Bechly, G., & Loveridge, R. F. (2007). *The Crato Fossil Beds of Brazil*. Cambridge University Press; eBook.

Martins-Neto, R. G. (1991). Sistemática dos Ensifera insecta, (Orthopteroidea) da Formação Santana (Cretáceo inferior do nordeste do Brasil). *Acta Geológica Leopoldensia*, 32(14), 3–162.

Martins-Neto, R. G. (1995). Complementos ao estudo sobre os Ensifera (Insecta: Orthopteroidea) da Formação Santana, Cretáceo Inferior do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 39(2), 321–345.

Martins-Neto, R. G. (1999). A new subfamily of Baissogryllidae Gorochoff from Santana Formation (Lower Cretaceous), Northeast Brazil. *Proceedings of the I International Paleontological Conference*, 91–97.

Martins-Neto, R. G. (2005). Estágio Atual da Paleontologia Brasileira: Hexápodes, Miriápodes, Crustáceos (Isopoda, Decapoda, Eucarida e Copepoda) e Quelicerados. *Arquivos do Museu Nacional*, 63(3).

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R. G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A. J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., ... Zhou, X. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210), 763–767.

Moura-Júnior, D. A. de, Scheffler, S. M., & Fernandes, A. C. S. (2018). A Paleontofauna Brasileira: Cenário Atual. *Anuário do Instituto de Geociências*, 41(1), Artigo 1.

Duarte, M., & Silveira, L. F. (2023) Museu de Zoologia da USP: Relatório de Gestão 2021-2022. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Osés, G. L., & Petri, S. (2012). Inventário dos artrópodes fósseis do Membro Crato (Formação Santana, NE do Brasil) acondicionados no IGc-USP. 20. SIICUSP.

Pinheiro, F. L., Horn, B. L. D., Schultz, C. L., de Andrade, J. A. F. G., & Sucerquia, P. A. (2012). Fossilized bacteria in a Cretaceous pterosaur headcrest. *Lethaia*, 45(4), 495–499.

Raposo, M. A., Kirwan, G. M., Lourenço, A. C. C., Sobral, G., Bockmann, F. A., & Stopiglia, R. (2021). On the notions of taxonomic ‘impediment’, ‘gap’, ‘inflation’ and ‘anarchy’, and their effects on the field of conservation. *Systematics and Biodiversity*, 19(3), 296–311.

Santos, A. L. F., Barros, O. A., Silva, J. H. da, Souza, M. D. de, & Santos, S. B. dos. (2023). O estudo de Paleometria na Bacia do Araripe. *Research, Society and Development*, 12(5), e17512541611

Schachat, S. R., Labandeira, C. C., Clapham, M. E., & Payne, J. L. (2019). A Cretaceous peak in family-level insect diversity estimated with mark-recapture methodology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1917), 20192054.

Sousa, M. de J. G. de, Cardona, M. G. da C., & Viana, M. S. S. (2016). Inventário Taxonômico das Coleções Paleontológicas do Museu Dom José e da Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral-Ce. *Anuário do Instituto de Geociências*, 39(1), 52–68.

Stewens, P. P. (2023). “Ubirajara” and Irrigator Belong to Brazil: Achieving Fossil Returns Under German Private Law. *International Journal of Cultural Property*, 30(3), 298–318.

Storari, A. P., Osés, G. L., Staniczek, A. H., Rizzutto, M., Loeffler, R., & Rodrigues, T. (2024). Paleometric approaches reveal striking differences in the insect fossilization of two Mesozoic Konservat-Lagerstätten. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 12, 1445160.

Wang, Y., Engel, M. S., Rafael, J. A., Wu, H., Rédei, D., Xie, Q., Wang, G., Liu, X., & Bu, W. (2016). Fossil record of stem groups employed in evaluating the chronogram of insects (Arthropoda: Hexapoda). *Scientific Reports*, 6(1), 38939.

Zhang, W., Shih, C., Labandeira, C. C., Sohn, J.-C., Davis, D. R., Santiago-Blay, J. A., Flint, O., & Ren, D. (2013). New Fossil Lepidoptera (Insecta: Amphiesmenoptera) from the Middle Jurassic Jiulongshan Formation of Northeastern China. *PLOS ONE*, 8(11), e79500.

Anexos

Figura 1: Exemplos de insetos fósseis da coleção do LPP. A,C: Cearagryllinae; B: *Araripegryllus femininus*; D: *Cratolocustopsis cretacea*; E: *Araripegryllus camposae*; F: *Gryllotalpoidea*. Todas as escalas: 5mm.

Tabela 1: Descrição dos espécimes pertencentes a coleção do Laboratório de Paleontologia e Paleoecologia do Departamento de Geologia.

Tabela 2: Descrição dos espécimes pertencentes a coleção do Setor de Paleontologia do Museu Câmara Cascudo.

CÓDIGO: SB1644

AUTOR: HAILTON PEREIRA DE MELO JÚNIOR

COAUTOR: LUDMILA THAINA CHAVES FREITAS

ORIENTADOR: BENTO JOAO DA GRACA AZEVEDO ABREU

TÍTULO: Efeitos da suplementação de creatina na morfologia de testículos de ratos diabéticos

Resumo

Introdução: A creatina é um suplemento nutricional que vem sendo utilizado em pesquisas em várias doenças, incluindo a Diabetes Mellitus (DM). Sabe-se que a hiperglicemia resultante dessa desordem metabólica pode provocar prejuízo nas funções reprodutivas masculinas. No entanto, não existem evidências robustas que relatam o efeito da creatina na morfologia testicular em pacientes diabéticos. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da suplementação de creatina nos testículos de ratos diabéticos induzidos quimicamente por estreptozotocina. Métodos: Foram utilizados 32 ratos Wistar separados em 4 grupos: (C) animais sem diabetes e sem suplementação de creatina (n=8), (CCr) animais sem diabetes e com suplementação de creatina (n=8), (D) animais diabéticos induzidos com estreptozotocina sem suplementação (n=8), (DCr) animais diabéticos induzidos com estreptozotocina tratados com creatina (n=8). Os grupos D e DCr receberam dose única de estreptozotocina (40 mg/kg i.p.). Serão realizadas as seguintes avaliações: histopatologia e histomorfometria. Resultados e discussão: o grupo diabético tratado apresentou melhoras parciais em alguns parâmetros morfométricos, como a altura do epitélio, contudo esse efeito protetor se apresenta limitado ao compartimento e metabolismo envolvido. Conclusão: a creatina promoveu melhoras parciais no grupo tratado, contudo mais estudos são necessários para comprovar os efeitos em quadros hiperglicêmicos.

Palavras-chave: Creatina; Diabetes; Testículos

TITLE: Effects of creatine supplementation on testicular morphology in diabetic rats

Abstract

Introduction: Creatine is a nutritional supplement that has been used in research on various diseases, including diabetes mellitus (DM). It is known that hyperglycemia resulting from this metabolic disorder can cause damage to male reproductive functions. However, there is no robust evidence reporting the effect of creatine on testicular morphology in diabetic patients. Therefore, this study aims to evaluate the effect of creatine supplementation on the testicles of diabetic rats chemically induced by streptozotocin. Methods: Thirty-two Wistar rats were separated into four groups: (C) animals without diabetes and without creatine supplementation (n=8), (CCr) animals without diabetes and with creatine supplementation (n=8), (D) streptozotocin-induced diabetic animals without supplementation (n=8), (DCr) streptozotocin-induced diabetic animals treated with creatine (n=8). Groups D and DCr

received a single dose of streptozotocin (40 mg/kg i.p.). The following assessments will be performed: histopathology and histomorphometry. Results and discussion: the treated diabetic group showed partial improvements in some morphometric parameters, such as epithelial height, however this protective effect is limited to the compartment and metabolism involved. Conclusion: creatine promoted partial improvements in the treated group, however further studies are needed to prove its effects in hyperglycemic conditions.

Keywords: Creatine; Diabetes; Testicles

Introdução

Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica cuja principal característica é a elevação do nível da glicemia no plasma sanguíneo. Esse aumento pode ocorrer tanto por insuficiência da produção de insulina pelo pâncreas (Tipo 1) quanto pela perda da efetividade desse hormônio em ativar os transportadores de glicose para o interior da célula (Tipo 2), além de existirem outros tipos de diabetes como a diabetes gestacional (SBD, 2019). O diabetes é um dos principais fatores de mortalidade no mundo, sendo que somente no ano de 2019 a diabetes foi a causa direta de 1.5 milhões de mortes e esteve envolvida diretamente em complicações cardiovasculares e renais (WHO,2023).

Estima-se que 537 milhões de adultos vivem com diabetes, sendo que há a previsão de aumento para 643 milhões até 2030. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, o Brasil é o 6 país em incidência de diabetes no mundo, com aproximadamente 16,8 milhões de pessoas adultas entre 20 e 79 anos (Sun et al, 2022). Independentemente do tipo de diabetes, a diabetes descompensada está associada a complicações em diversos órgãos, tais quais: Acidente Vascular Cerebral, Infarto Agudo do Miocárdio, Doença Renal Diabética, Neuropatia Periférica e infertilidade masculina (Tomic et al, 2022). Nesse contexto, destacam-se a disfunção sexual e a infertilidade masculina, visto que é estimado que a frequência do diabetes em homens seja maior do que em mulheres e que, pelo menos 25% dos homens diabéticos apresentam algum tipo de disfunção sexual (Enzlin et al, 2003).

O aparelho reprodutor masculino é composto pelo pênis, um sistema de ductos, glândulas sexuais acessórias e algumas estruturas de apoio. Os testículos, são as gônadas masculinas, encontrados em pares, fora da cavidade abdominal, inseridos numa bolsa denominada de escroto (Bart et al, 1831). São responsáveis pela produção das células da linhagem germinativa, os espermatozoides (Dohle et al, 2012). Eles também possuem função endócrina, constituindo-se no indivíduo do sexo masculino o principal fornecedor de testosterona, um hormônio andrógeno chave no desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias masculinas, como crescimento de barba e engrossamento da voz, assim como na regulação da espermatogênese (Rey et al, 2022).

O prejuízo na função sexual decorrentes do diabetes pode ser resultante de alguns fatores tais como: espermatogênese modificada, alterações degenerativas e apoptóticas nos testículos, metabolismo alterado da glicose na barreira hematotesticular, diminuição da síntese e secreção de testosterona, disfunção ejaculatória, redução da libido, entre outros (Barash et al, 1996). Todas essas alterações podem ser decorrentes da hiperglicemia induzida por diabetes e embora saiba-se sobre os mecanismos subjacentes, alguns estudos relacionam angiopatia, neuropatia, estado inflamatório crônico e estresse oxidativo como mecanismos fundamentais no desenvolvimento de disfunção sexual e infertilidade (Barkabi-Zanjani et al, 2020).

A creatina é um aminoácido naturalmente produzido a partir da arginina, glicina e metionina. Na forma fosforilada, atua na ressíntese de ATP, servindo como uma reserva energética essencial para a contração muscular (WILLIAMS et al., 2000; ARAÚJO et al., 2009;). Considerando seu efeito antioxidante e anti-inflamatório, a suplementação de creatina é um potencial candidato para reverter os danos teciduais causados pelo diabetes. Sendo que trabalhos que mostram o efeito da suplementação de creatina no testículo são escassos na literatura.

Diante do acima exposto, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação de creatina no testículo de ratos diabéticos. Além disso, foi investigada a ação da creatina no tecido testicular sadio, a fim de observar se houve alterações decorrentes do tratamento no epitélio seminífero e nas células do interstício.

Metodologia

Neste trabalho foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar, machos e pesando entre 200-250 gramas. Proveniente do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, parecer número 030.025/2017. Os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, sendo que foram alocados 3 ou 4 ratos por caixa e cada uma foi mantida em condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) 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, e o consumo de água e ração por gaiola foi verificado todos os dias ao longo do experimento.

Os animais foram separados em 4 grupos:

(C) animais controles e sem suplementação de creatina (n=5); (CCr) animais controles e com suplementação de creatina (n=5); (D) animais diabéticos induzidos com estreptozotocina sem suplementação (n=5); (DCr) animais diabéticos induzidos com estreptozotocina tratados com creatina (n=5).

Os grupos CCr e DCr receberam a suplementação de creatina por meio da ração isocalórica em 2 fases, de acordo com Hultman et al. (1996) e Vandenberghe et al. (1997). A primeira fase consistia no consumo da ração enriquecida a 13% com creatina para promover a saturação deste nutriente no organismo, sendo realizada por 5 dias antes da indução do diabetes. A segunda fase consistia no consumo de uma ração enriquecida a 2% de creatina para promover a manutenção da concentração deste nutriente no organismo do animal, sendo executada durante 35 dias após a indução do diabetes. Os demais grupos receberam ração isocalórica sem adição de creatina.

Após jejum prévio de 14 horas, os animais de todos os grupos, exceto os controles (C e CCr) receberam dose única de estreptozotocina (40 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 4,5, por meio de injeção intraperitoneal (SUJITHRA et al., 2019). Após 7 dias, a glicemia foi mensurada por meio de amostra sanguínea retirada da veia caudal com glicosímetro portátil e foi considerado diabético os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL.

Após 35 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de ketamina e tiveram seus testículos removidos e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas, para serem submetidos ao processamento histológico de rotina. Os testículos foram incluídos em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de secções de 3 μ m. As lâminas histológicas obtidas foram coradas em hematoxilina-eosina (HE). As análises morfométricas foram realizadas de acordo com adaptações de estudo previamente realizado por Silva et al (2017). O tecido testicular foi analisado sob microscopia de luz, utilizando o microscópio óptico Leipzig SOLSTICE 4X, conectado à câmera Leipzig sob ampliação de 10x e 40x, assim como o software Future Winjoe 1.6 e o software ImageJ-win64 para a captura de imagens e análises histomorfométricas das imagens capturadas.

A proporção dos túbulos seminíferos e intertúbulos foi obtida por análise de 10 fotos por animal na objetiva de 40x. Utilizando o ImageJ-win64, onde através da ferramenta grid foi traçado 80 intersecções de linha por foto, na qual foram computados os pontos que tocavam as estruturas do túbulo seminífero, bem como no espaço intertubular. Também foi mensurado o diâmetro dos túbulos e altura do epitélio seminífero, cada animal teve 20 diâmetros contabilizados (20 secções transversais tubulares) e 20 alturas de epitélio por meio da ferramenta “straight line” do ImageJ-win64. A análise histopatológica foi feita contando 200 túbulos seminíferos aleatórios por animal utilizando o escore de Johnsen para avaliar sistematicamente secções tubulares do parênquima testicular. O trabalho adotou 8 níveis de expressão numérica variando de túbulos intactos com células germinativas sem alteração (Escore 1) para células ausentes e estado degenerativo irreversível (Escore 8).

Para a morfologia e morfometria do intertúbulo, foram analisadas 10 imagens histológicas por animal no ImageJ-win64, utilizando a ferramenta “grid” (26 x 20: 520 pontos/foto), contabilizando os pontos que tocavam exclusivamente a área intertubular. Foram mensurados os pontos sobre núcleo ou citoplasma das células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Calculou-se a porcentagem de cada elemento no intertúbulo pela fórmula: (Valor absoluto x 100) / Total de pontos. No testículo: (% intertúbulo x % elemento)/100; no parênquima: (% elemento no testículo x peso gonadal líquido)/100, sendo este o peso da gônada sem a túnica albugínea. Além disso, 30 núcleos de células de Leydig/animal foram analisados para medir o diâmetro de núcleos mais circulares, a fim de estimar volumes: nuclear ($VNuc = 4,19 \times 3 \times \text{raio}$), citoplasmático ($VCito = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$) e celular ($VCel = VNuc + VCito$). O número total de células de Leydig foi obtido por: volume total das células nos testículos / volume individual. O índice leydigossomático foi calculado como: (volume das células de Leydig / peso corporal) x 100.

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) e analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 9.0. Para os dados de medidas únicas, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Para medidas repetidas utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O nível de significância foi considerado $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussões

A proporção dos túbulos seminíferos mostrou-se elevada no grupo diabético quando comparada aos grupos controle e controle tratado (Anexo 1). Entretanto, o grupo diabético que recebeu tratamento apresentou uma redução significativa em relação ao grupo que não recebeu intervenção. Devido à diferença estatística observada nos túbulos seminíferos,

algumas regiões devem refletir essa alteração. Neste caso, foi identificado que o epitélio seminífero estava aumentado no grupo diabético em comparação ao controle. Já a razão túbulo/intertúbulo se manteve semelhante entre os grupos controle, controle tratado e diabético tratado, indicando uma possível melhora promovida pela suplementação com creatina no tecido testicular, além de confirmar os efeitos deletérios do diabetes nos animais não tratados. Segundo Mogaddami et al., a hiperglicemia pode causar alterações histológicas, afetando o diâmetro das células de Sertoli e das veias testiculares, o que compromete a estrutura e função dos testículos.

Cada região testicular respondeu de forma distinta conforme a presença ou ausência do diabetes e da suplementação. Na área intertubular, observou-se uma maior quantidade de células de Leydig no grupo diabético em comparação ao controle, o que pode indicar hipertrofia ou hiperplasia como forma de compensação à disfunção hormonal e androgênica provocada pelo diabetes (Moore et al.).

O compartimento intertubular foi predominantemente constituído por vasos linfáticos, seguidos por células de Leydig, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Anexo 2). No grupo diabético, houve uma redução dos vasos linfáticos em relação aos grupos controle e controle tratado, corroborando os achados de Soudamani et al. Essas modificações estruturais nos ratos diabéticos podem estar relacionadas a um processo de remodelação testicular vinculado à disfunção do sistema linfático. Contudo, não existem evidências claras de que a creatina induza a formação de novos vasos linfáticos em ratos saudáveis ou em modelos diabéticos. Além disso, foi observado um aumento no tecido conjuntivo no grupo diabético em relação aos controles, enquanto no grupo diabético tratado os níveis de conjuntivo foram inferiores aos do grupo diabético não tratado. A maior proporção de conjuntivo nos animais diabéticos confirma o aumento induzido pelo diabetes, embora não tenha sido possível confirmar fibrose, já que os valores do grupo controle não destoaram significativamente da faixa observada (Souza et al.).

Em relação à morfometria das células de Leydig (Anexo 3), observou-se um aumento no diâmetro nuclear (μm) no grupo diabético tratado, quando comparado ao grupo diabético não tratado. O volume citoplasmático (μm^3) também foi maior no grupo que recebeu suplementação. Esses aumentos indicam uma possível ativação funcional dessas células. Pesquisas como as de Lawler et al. apontam que, em tecidos com alta demanda energética, a creatina pode promover adaptações como a hiperplasia funcional. Apesar disso, ainda se sabe pouco sobre a atuação da creatina no interior dos testículos, embora sua relevância na produção de ATP sob estresse metabólico já esteja estabelecida.

Ao analisar a quantidade de células de Leydig por grama de testículo ($\times 10^6$), observou-se um aumento no grupo diabético em comparação aos grupos controle e controle tratado. O índice dessas células também foi maior no grupo diabético tratado com creatina, sugerindo que esse aumento possa estar relacionado a uma resposta hipertrófica ou hiperplásica diante da disfunção esteroidogênica induzida pelo diabetes. No entanto, o aumento no volume celular não significa, necessariamente, uma melhora funcional. A creatina, nesse contexto, pode atuar como agente protetor contra o estresse oxidativo, resultando no aumento do volume celular.

A análise histopatológica dos testículos do grupo controle revelou túbulos seminíferos com poucas alterações, apresentando alguns vacúolos na base e no ápice do epitélio (Anexo 4). O grupo controle tratado não apresentou mudanças significativas em relação ao controle, mantendo vacúolos na base do epitélio. Por outro lado, os animais diabéticos apresentaram

túbulos menos arredondados, com vacúolos visíveis tanto na base quanto no ápice do epitélio, diferindo substancialmente dos grupos controle e controle tratado. No grupo diabético suplementado com creatina, os túbulos seminíferos mostraram-se mais próximos do padrão saudável, com vacúolos discretos, também apresentando diferenças significativas em relação aos grupos controle e controle tratado. Tais achados reforçam os danos provocados pelo diabetes, os quais podem ser atribuídos a fatores como a disfunção do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HPG), à queda nos níveis de testosterona, ao estresse oxidativo ou ainda ao fato de que a espermatogênese depende do metabolismo da glicose. Esses fatores estão entre os principais mecanismos pelos quais o diabetes compromete a fertilidade masculina.

Conclusão

A suplementação com creatina promoveu alterações morfométricas e histopatológicas nos testículos de ratos diabéticos, observando melhoras parciais na arquitetura do parênquima testicular. Apesar desse possível efeito protetor e adaptativo da creatina frente às alterações causadas pela hiperglicemia, os achados desta pesquisa requerem maior aprofundamento em investigações futuras que explorem tempos de intervenções variados, dosagens bioquímicas e avaliação de parâmetros hormonais e moleculares.

Referências

ARAÚJO, M; MELLO, M. A. Exercício, estresse oxidativo e suplementação com creatina. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 3, n. 15, 2012.

Barash IA, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996;137(7):3144e7.

Barkabi-Zanjani S, Ghorbanzadeh V, Aslani M, Ghalibafsabbaghi A, Chodari L. Diabetes mellitus and the impairment of male reproductive function: Possible signaling pathways. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Sep-Oct;14(5):1307-1314. doi: 10.1016/j.dsx.2020.07.031. Epub 2020 Jul 18. PMID: 32755827.

Ceddia, Rolando B, and Gary Sweeney. "Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells." *The Journal of physiology* vol. 555,Pt 2 (2004): 409-21. doi:10.1113/jphysiol.2003.056291.

DEMINICE, Rafael et al. Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. *British Journal of Nutrition*, v. 102, n. 1, p. 110, 2009.

DIAS, F.C.R., MARTINS, A.L.P., de MELO, F.C.S.A., CUPERTINO, M.C., GOMES, M. de L.M., de OLIVEIRA, J.M., DAMASCENO, E.M., SILVA, J., OTONI, W.C., and da MATTA, S.L.P. (2019).

DOHLE, G.R., ELZANATY, S., and VAN CASTEREN, N.J. (2012). Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J. Androl*. 14, 88–93.

Enzlin P, Mathieu C, Van Den Bruel A, Vanderschueren D, Demyttenaere K. Prevalence and predictors of sexual dysfunction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26(2): 409-14.

Gonçalves MG, Medeiros MA, de Lemos LIC, de Fátima Campos Pedrosa L, de Andrade Santos PP, Abreu BJ, Lima JPMS. Effects of Creatine Supplementation on Histopathological and Biochemical Parameters in the Kidney and Pancreas of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Nutrients*. 2022; 14(3):431. <https://doi.org/10.3390/nu14030431>.

He, Zubin et al. "Diabetes Mellitus Causes Male Reproductive Dysfunction: A Review of the Evidence and Mechanisms." *In vivo (Athens, Greece)* vol. 35,5 (2021): 2503-2511. doi:10.21873/in vivo.12531.

HULTMAN, E. et al. Muscle creatine loading in men. *Journal of Applied Physiology*, v. 81, n. 1, p. 232–237, 1996.

JOHNSEN, S.G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1, 2–25.

JOHNSON, L., PETTY, C.S., and NEAVES, W.B. (1981). A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 25, 217–226.

Op't Eijnde, Bert et al. "Creatine supplementation increases soleus muscle creatine content and lowers the insulinogenic index in an animal model of inherited type 2 diabetes." *International journal of molecular medicine* vol. 17,6 (2006): 1077-84.

Pinto, Camila Lemos et al. "Creatine supplementation and glycemic control: a systematic review." *Amino acids* vol. 48,9 (2016): 2103-29. doi:10.1007/s00726-016-2277-1.

Rey RA. Steroid receptors in the testis: implications in the physiology of prenatal and postnatal development and translation to clinical application. *Histol Histopathol.* 2022 Oct 11:18533. doi: 10.14670/HH-18-533. Epub ahead of print. PMID: 36218320.

Sampanang A, Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Iamsaard S. Comparison of male reproductive parameters in mice with type 1 and type 2 diabetes. *Clin Exp Reprod Med.* 2020 Mar;47(1):20-33. doi: 10.5653/term.2020.00388. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32036645; PMCID: PMC7127904.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: Clannad; 2019.

Silva FS, Bortolin RH, Araújo DN, Marques DES, Lima JPMS, Rezende AA, Vieira WHB, Silva NB, Medeiros KCP, Ackermann PW, Abreu BJ, Dias FAL. Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 messenger RNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Pathol.* 2017 Jul-Aug;29:37-44. doi: 10.1016/j.carpath.2017.05.003. Epub 2017 May 18. PMID: 28550760.

Solis, M.Y.; Artioli, G.G.; Gualano, B. Potential of Creatine in Glucose Management and Diabetes. *Nutrients* 2021, 13, 570. <https://doi.org/10.3390/nu13020570>.

Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109119. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109119. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34879977.

Tomic D, Shaw JE, Magliano DJ. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 Sep;18(9):525-539. doi: 10.1038/s41574-022-00690-7. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35668219; PMCID: PMC9169030.

TORTORA, Gerard J. Princípios de anatomia e fisiologia. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019, 1600 p.

VANDENBERGHE, K. et al. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *Journal of Applied Physiology*, v. 83, n. 6, p. 2055–2063, 1997.

WILLIAMS, M.; KREIDER, R.; BRANCH, J. Creatina. 2000.

World Health Organization. Diabetes Fact sheet [Accessed February 07, 2023];Internet. 2023 Feb; Available at: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Moore NP. The distribution, metabolism and function of creatine in the male mammalian reproductive tract: a review. *Int J Androl.* 2000;23(1):4-12.

de Souza RR, Pires AR, Melo SP, Silva JG, Almeida VL, Rocha RM, et al. Cellular and extracellular components of testicular and epididymal tissues: a detailed inventory. *NPJ Regen Med.* 2023;8(1):14.

Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2006 Mar 1;40(5):837-49.

Kostakis ID, Zavras N, Damaskos C, Sakellariou S, Korkolopoulou P, Misiakos EP, et al. Erythropoietin and sildenafil protect against ischemia/reperfusion injury following testicular torsion in adult rats. *Exp Ther Med.* 2017 Jun;13(6):3341-7.

Huang R, Chen J, Guo B, Jiang C, Sun W. Diabetes-induced male infertility: potential mechanisms and treatment options. *Mol Med.* 2024 Jan 15;30(1):11.

Oksanen A. Testicular lesions of streptozotocin diabetic rats. *Horm Res.* 1975;6:138-44.

Rossi GL, Aeschlimann M. Morphometric studies of pituitary glands and testes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Andrologia.* 1982.

Anexos

Anexo 1. Parâmetros biométricos e histomorfométricos

continuação anexo 1

Anexo 2. Proporção volumétrica e volume nos compartimentos intertubulares

Anexo 3. Histomorfometria das células de Leydig

Anexo 4. Representação da histopatologia testicular avaliada pelo Escore de Johnsen

CÓDIGO: SB1654

AUTOR: LARISSA ALVES HONORATO FERREIRA

ORIENTADOR: DANIEL CARLOS FERREIRA LANZA

TÍTULO: Avaliação da Eficiência de Primers Genéricos para Amplificação do 16S na Caracterização do Bacterioma Endometrial e Vaginal

Resumo

A análise do gene 16S rRNA é amplamente utilizada na caracterização do microbioma humano, permitindo a avaliação da composição bacteriana em distintos nichos biológicos. No entanto, a eficiência dos primers genéricos preconizados para essa finalidade ainda é um ponto de discussão, especialmente em amostras de baixa biomassa, como o microbioma endometrial. Neste estudo, investigamos a adequação dos primers recomendados pela plataforma Illumina na avaliação do bacterioma endometrial e vaginal, considerando diferentes tipos de amostras e métodos de extração. Os resultados indicaram que esses primers são eficientes na detecção de bactérias de alta abundância, como *Escherichia coli*, mas não foram sensíveis para a investigação do bacterioma endometrial. Isso sugere a necessidade de otimização dos primers ou desenvolvimento de metodologias alternativas para análises do bacterioma nesse contexto.

Palavras-chave: Microbiota, Metagenômica, Infertilidade, Purificação de DNA

TITLE: Evaluation of the Efficiency of Generic Primers for 16S Amplification in the Characterization of Endometrial and Vaginal Bacterioma

Abstract

Analysis of the 16S rRNA gene is widely used to characterize the human microbiome, allowing the assessment of bacterial composition in different biological niches. However, the effectiveness of generic primers recommended for this purpose remains controversial, especially in low-biomass samples, such as the endometrial microbiome. In this study, we investigated the suitability of primers recommended by the Illumina platform for assessing the endometrial and vaginal bacteriome, considering different sample types and extraction methods. The results indicated that these primers are effective in detecting high-abundance bacteria, such as *Escherichia coli*, but were not sensitive for investigating the endometrial bacteriome. This suggests the need for primer optimization or the development of alternative methodologies for bacteriome analysis in this context.

Keywords: Microbiota, Metagenomics, Infertility, DNA Purification

Introdução

Aproximadamente 90% das células do corpo estão associadas à microbiota, sendo predominantemente bacterianas (Manos, 2022), com apenas 10% humanas (Pflughoeft & Versalovic, 2012). Esses microrganismos exercem funções metabólicas fundamentais, modulam a resposta imunológica e conferem proteção contra patógenos oportunistas,

desempenhando papel essencial na manutenção da homeostase e na prevenção de doenças (Integrative HMP Research Network Consortium, 2019). Desde o lançamento do Projeto Microbioma Humano em 2007, avanços significativos em sequenciamento e bioinformática permitiram uma melhor caracterização das comunidades bacterianas associadas ao organismo humano em seus diversos nichos, incluindo o trato reprodutivo feminino (Curtis et al., 2012).

A infertilidade, definida pela WHO como a incapacidade de engravidar após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas, afeta ambos os gêneros e pode ter causas multifatoriais (WHO). Infecções urogenitais estão entre os fatores associados à infertilidade, pois podem comprometer a integridade dos órgãos reprodutivos e induzir processos inflamatórios que prejudicam a implantação embrionária (Grewal et al., 2022).

O trato genital feminino é colonizado por um continuum de microbiota, composta por comunidades bacterianas mais diversas e de menor biomassa no endométrio, em contraste com comunidades menos diversas e de maior biomassa na vagina (Polifke et al., 2024). A microbiota vaginal tem sido amplamente estudada e sua composição pode influenciar significativamente o ambiente uterino. Enquanto a predominância de *Lactobacillus* está associada à eubiose e melhores desfechos reprodutivos, o aumento da diversidade bacteriana está relacionado a falhas de implantação e abortos recorrentes (Gao et al., 2024). Além disso, patógenos como *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis* são frequentes em pacientes inférteis e sua prevalência pode variar conforme a região geográfica.

Historicamente, o útero foi considerado um ambiente estéril (Küstner, 1877). Contudo, evidências recentes sugerem que a presença de uma microbiota endometrial funcional desempenha um papel fundamental na fertilidade (Miyagi et al., 2023). No entanto, a caracterização desse microbioma ainda é um desafio, pois sua composição é heterogênea, à dificuldades na obtenção de amostras transcervicais puras sem a presença do material vaginal, potenciais vieses associados a diferentes tipos de cateteres de amostragem usados e as metodologias convencionais apresentam limitações na detecção de espécies pouco abundantes (Polifke et al., 2024).

A técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizada para a análise do microbioma, pois permite identificar diferentes grupos bacterianos com base em sequências altamente conservadas (Miyagi et al., 2023).

Estudos indicam que, em certos casos, o uso exclusivo do 16S rRNA pode superestimar a presença de determinadas espécies e subestimar outras, comprometendo a precisão da análise do microbioma. Como demonstrado por Vetrovsky e Baldrian (2013), (Větrovský & Baldrian, 2013), a variabilidade no número de cópias do gene 16S e a diversidade intragenômica podem comprometer as inferências de abundância bacteriana. Esses fatores reforçam a necessidade de estudos adicionais que avaliem a confiabilidade dos primers 16S para análises do bacterioma vaginal e endometrial, bem como a exploração de metodologias complementares, como o sequenciamento metagenômico shotgun. Neste estudo, realizamos a avaliação dos primers 16S em amostras vaginais e endometriais, utilizando diferentes métodos de extração de DNA, visando determinar sua eficiência na detecção da diversidade bacteriana.

Metodologia

1. Coleta de Amostras Endometriais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 51625921.6.0000.5292). Todas as pacientes que participaram da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras de endométrio foram coletadas de pacientes submetidas a tratamentos de reprodução assistida, seguindo os seguintes critérios de exclusão: (1) presença de alterações hormonais e (2) exames físicos e citológicos ginecológicos alterados. As amostras foram coletadas por dois métodos distintos. No primeiro método, nove pacientes tiveram suas amostras coletadas por Pipelle, sendo estas armazenadas a -80°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos. No segundo método, as demais amostras de endométrio foram obtidas por histeroscopia, considerada o padrão-ouro na literatura, e igualmente armazenadas a -80°C até a extração dos ácidos nucleicos.

Os principais métodos para obtenção de amostras endometriais incluem (1) fluido endometrial, (2) biópsia por Pipelle e (3) biópsia por histeroscopia, seja diagnóstica ou cirúrgica. Uma das principais dificuldades na coleta dessas amostras é o acesso ao útero, devido à possibilidade de contaminação durante a passagem pelo canal vaginal, que possui alta biomassa microbiana. Para minimizar esse problema, foram adotadas técnicas de higienização da vagina, uso de espéculos e cateter duplo, reduzindo o contato com o microbioma cervical. Além disso, a presença de muco nas amostras endometriais pode dificultar a extração do material genético, tornando necessária a adoção de estratégias específicas para a lise celular.

2. Amostras de Escova Cervical

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 30679220.9.0000.5292). Todas as pacientes participantes assinaram um TCLE contendo informações sobre os procedimentos e objetivos da pesquisa. As amostras cervicais foram obtidas em consultório, onde o excesso de muco vaginal foi removido com gaze antes da coleta, permitindo a obtenção de material constituído essencialmente por células do canal vaginal, facilitando a extração de DNA.

3. Extração de DNA Bacteriano de Amostras Endometriais

As amostras coletadas por Pipelle foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), um método baseado na ligação seletiva do DNA a uma membrana de sílica na presença de sais caotrópicos. As amostras obtidas por histeroscopia foram submetidas a dois métodos distintos: (1) extração por precipitação com o Wizard Genomic DNA Purification Kit, com adição de proteinase K para otimizar a lise celular e nuclear; e (2) extração por fenol:clorofórmio:isoamílico, em que a digestão foi realizada com proteinase K e purificação posterior através de separação em fases aquosa e orgânica.

4. Validação In Silico dos Primers 16S rRNA

A seleção dos primers foi realizada com base no documento disponibilizado pela plataforma Illumina. O primer completo é composto por uma região complementar a região V3 e V4, que se liga à sequência de DNA nas amostras, e uma região de overhang, responsável pela conexão entre o amplicon e a plataforma de sequenciamento. Os primers utilizados foram:

16S Amplicon PCR Forward Primer: 5'-
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer: 5'-
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC
C

5. Avaliação dos Parâmetros de Extração

Foram avaliados os seguintes parâmetros: rendimento, pureza, integridade e viabilidade do DNA extraído para análise metagenômica. A quantificação do DNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, UK), determinando-se a concentração de DNA em ng/μL. A pureza foi obtida através da razão entre as absorbâncias em 260 nm e 280 nm.

6. Controles Negativos

Os controles negativos foram utilizados apenas na PCR, substituindo a amostra de DNA por água ultrapura. A literatura recomenda a inserção de controles negativos durante todo o procedimento, incluindo coleta, extração, PCR e sequenciamento.

7. Controle Positivo

Amostra de *Escherichia coli* obtida a partir de suspensão, com extração de do material genético utilizando o bactérias foram obtidas a partir de meio de cultura, submetida à extração de DNA utilizando o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen).

8. Condições do Experimento

Os ensaios de PCR convencional foram realizadas em reações de 20 μL contendo 1,5 μL de DNA molde, 0,25 μM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de GoTaq G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega) e 0,2 mM de cada dNTP. As condições de termocilagem foram padronizadas com desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 50 segundos, 40 °C por 40 segundos e 72 °C por 50 segundos, finalizada com a extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

Resultados e Discussões

1. Validação In Silico dos Primers 16S rRNA

O desenho dos primers foi Os primers foram testados utilizando a ferramenta Primer-Blast, a fim de verificar sua especificidade e cobertura taxonômica. Como a ferramenta possui limitações quanto ao número de pares de bases e não permite a inserção de bases degeneradas, as bases degeneradas foram substituídas por adenina (A), comum a todas as degenerações. Esse procedimento garantiu a análise da região dos primers dentro das limitações da ferramenta.

2. Validação In Vitro dos Primers com *Escherichia coli*

Para avaliar a eficiência da amplificação dos primers 16S rRNA, foram realizados testes com amostras de DNA de *Escherichia coli*. A reação foi considerada válida, pois o gene 16S

rRNA foi identificado em todas as oito amostras testadas, confirmando a eficiência da extração de DNA bacteriano e a funcionalidade dos primers. A amplificação gerou um amplicon de aproximadamente 500 bp (Figura 1).

Figura 1. Eletroforese para validação da extração de DNA de amostras de *Escherichia coli*, submetidas à PCR para o gene 16S rRNA. Controle negativo (C-) da PCR com água no lugar da amostra, garantindo a integridade dos reagentes. A seta (➔) indica o amplicon esperado (~500 bp). L: 100 bp DNA Ladder, utilizado como marcador de peso molecular.

3. Comparação dos Métodos de Extração de DNA em Amostras Endometriais

3.1 - Extração por Kit de Coluna

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada em amostras endometriais coletadas por Pipelle e submetidas à extração por kit de coluna. Apenas uma amostra apresentou amplificação, com baixa intensidade (Figura 2), indicando um resultado inferior ao esperado. Esperava-se uma banda bem definida, com tamanho constante e presença em todas as amostras.

3.2 - Extração por Kit de Precipitação + Proteinase K

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada em amostras endometriais coletadas por histeroscopia e extraídas por kit de precipitação + proteinase K. Todas as amostras clínicas apresentaram bandas de aproximadamente 350 bp, além de arrasto, sugerindo amplificação não específica ou excesso de proteinase K (Figura 3). A presença de banda no controle negativo indicou contaminação da PCR.

3.3 - Extração por Kit de Precipitação + Proteinase K + Purificação por Coluna

Após a purificação por coluna, as amostras apresentaram uma redução no arrasto, mas todas as bandas permaneceram em ~350 bp, um tamanho inferior ao esperado (Figura 4). O controle positivo foi omitido nesta análise para evitar contaminação da PCR.

3.4 - Extração por Fenol:Clorofórmio:Isoamílico

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada em amostras endometriais coletadas por histeroscopia e extraídas por fenol:clorofórmio:isoamílico. Todas as amostras clínicas apresentaram bandas de tamanho inferior ao esperado (~500 bp), com arrasto e amplificação não específica (Figura 5). A presença de banda no controle negativo indicou contaminação da PCR.

3.5 - Comparação Geral entre Métodos de Extração

A amplificação do gene 16S rRNA foi comparada entre amostras extraídas por diferentes métodos. Todas as amostras apresentaram amplicons do mesmo tamanho (Figura 6), demonstrando que diferentes métodos de extração geram resultados equivalentes.

4. Análise de Diferentes Tipos de Amostras

A amplificação do gene 16S rRNA foi testada em diferentes tipos de amostras (endométrio, escova cervical, sêmen tratado, saliva pré e pós-escovação)(Figura 7). Apenas as amostras de escova cervical e saliva pré-escovação apresentaram bandas definidas, enquanto as amostras endometriais exibiram amplificação inespecífica. As amostras de sêmen testadas foram negativas, o que era esperado devido ao tratamento prévio para reprodução assistida.

5. Comparação do Rendimento e Pureza do DNA Extraído

A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria, analisando a razão entre as absorbâncias em 260 nm e 280 nm. Valores entre 1,6 e 2,1 indicam boa integridade do ácido nucleico extraído. A concentração média foi de $27,944 \pm 18,5$ ng/ μ L, com razão 260/280 de $1,812 \pm 0,042$. A alta variação na concentração se deve a diferenças individuais nas amostras, enquanto a pureza foi mantida dentro dos valores esperados.

A caracterização do microbioma endometrial e vaginal utilizando primers genéricos para o gene 16S rRNA revelou desafios significativos relacionados à eficiência da amplificação e à fidelidade dos resultados. Apesar da ampla utilização dos primers recomendados pela plataforma Illumina na análise metagenômica, os resultados deste estudo demonstraram que sua eficiência foi limitada quando aplicados a amostras endometriais, independentemente dos métodos de extração de DNA utilizados. Em contraste, as amostras de escova cervical apresentaram amplificação consistente e definida, sugerindo que a metodologia é mais adequada para amostras com maior biomassa microbiana.

A baixa eficiência na amplificação do gene 16S rRNA em amostras endometriais pode ser atribuída a vários fatores. Primeiramente, a menor quantidade de DNA bacteriano no endométrio em comparação ao trato vaginal reduz a probabilidade de detecção confiável de sequências bacterianas (Mitchell et al., 2015; Chen et al., 2017) Além disso, a presença de DNA humano em concentrações significativamente superiores pode comprometer a amplificação de DNA bacteriano, favorecendo a amplificação de fragmentos indesejados ou inespecíficos. Isso é evidenciado pelos resultados de eletroforese, que demonstraram amplificação inespecífica em diversas amostras endometriais.

Outro fator relevante é a variabilidade nos métodos de extração de DNA. Enquanto a extração por kit de coluna resultou em baixa eficiência de amplificação, os métodos baseados em precipitação e purificação apresentaram maior recuperação de DNA, mas ainda assim resultaram em amplificação inconsistente. A introdução de proteinase K pareceu interferir na especificidade da amplificação, o que sugere a necessidade de otimização na etapa de purificação dos ácidos nucleicos.

A escolha dos primers também influencia diretamente a qualidade dos resultados obtidos. Os primers utilizados neste estudo contêm bases degeneradas, o que pode favorecer a ampliação de sequências com variações não intencionais. Embora essa abordagem aumente a abrangência taxonômica, também pode comprometer a especificidade da amplificação. Ademais, a contaminação cruzada observada em alguns ensaios sugere a necessidade de maior controle de qualidade durante o processamento das amostras, especialmente na manipulação de amostras de baixa biomassa.

A maior eficiência dos primers em amostras de escova cervical pode ser explicada por três fatores principais: (1) maior biomassa bacteriana, que facilita a amplificação e minimiza efeitos de inibição; (2) menor presença de DNA humano, reduzindo a competição com o DNA bacteriano durante a PCR; e (3) menor heterogeneidade microbiana, permitindo uma amplificação mais eficiente de bactérias predominantes. Esses achados sugerem que a metodologia aplicada deve ser revisada para aumentar a eficiência da detecção de microbiotas de baixa abundância, possivelmente através da adoção de primers mais específicos ou da utilização de sequenciamento shotgun em substituição ao 16S rRNA.

Conclusão

Os resultados deste estudo destacam a necessidade de otimização na caracterização do microbioma endometrial utilizando primers genéricos para 16S rRNA. A ineficiência na detecção de diversidade bacteriana em amostras endometriais sugere que os primers atualmente utilizados são mais adequados para amostras de maior biomassa microbiana, como escova cervical, onde a amplificação foi bem-sucedida. Além disso, fatores como composição do DNA presente na amostra, variabilidade dos métodos de extração e presença de contaminação cruzada influenciam significativamente a eficiência dos protocolos empregados.

A caracterização precisa do microbioma endometrial é essencial para avançar na compreensão das interações entre bactérias e fertilidade, além de possibilitar a identificação de biomarcadores para infertilidade e estratégias terapêuticas baseadas no microbioma. Para futuras investigações, recomenda-se a avaliação de primers alternativos ou metodologias de sequenciamento de genoma completo (shotgun metagenomics), bem como a implementação de protocolos mais rigorosos para extração e purificação de DNA.

Por fim, este estudo reforça a necessidade de padronização dos métodos empregados na análise do microbioma endometrial, garantindo maior reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos. O aprimoramento dessas técnicas pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas mais eficazes e personalizadas para a saúde reprodutiva feminina.

Referências

Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 2017;8(1):875. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>.

Curtis H, Blaser MJ, Dirk G, Kota KC, Rob K, Liu B, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature11234>.

Grewal K, Lee YS, Smith A, Brosens JJ, Bourne T, Al-Memar M, et al. Chromosomally normal miscarriage is associated with vaginal dysbiosis and local inflammation. *BMC Med*. 2022;20(1):38. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02227-7>.

Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569(7758):641-8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>.

Küstner O. Beitrag zur Lehre von der puerperalen Infection der Neugeborenen. *Arco. Gynak*. 1877;11:256-63. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01845161>.

Manos J. The human microbiome in disease and pathology. *APMIS*. 2022;130(12):690-705. Available from: <https://doi.org/10.1111/apm.13225>.

Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(5):611-e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.11.043>.

Miyagi M, Mekaru K, Tanaka SE, Arai W, Ashikawa K, Sakuraba Y, et al. Endometrial and vaginal microbiomes influence assisted reproductive technology outcomes. *JBRA Assist Reprod*. 2023;27(2):267. Available from: <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220040>.

Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol*. 2012;7(1):99-122. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132421>.

Polifke A, von Schwedler A, Gulba R, Bensmann R, Dilthey A, Nassar NN, et al. Differential characteristics of vaginal versus endometrial microbiota in IVF patients. *Sci Rep*. 2024;14(1):1-16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82466-9>.

Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*. 2013;8(2):e57923. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>.

WHO - World Health Organization. Infertility prevalence estimates, 1990–2021. Geneva: World Health Organization; 2023.

CÓDIGO: SB1671

AUTOR: CAMILA ESTEFANY ALVES MOTA

COAUTOR: AMANDA MAIA DA SILVA

ORIENTADOR: JULIANA DEO DIAS

TÍTULO: Qual a contribuição das espécies de zooplâncton da epicarste para a diversidade em cavernas?

Resumo

Este estudo constitui um dos esforços de investigação direcionados à fauna zooplancônica associada à epicarste e a ambientes subterrâneos em cavernas do semiárido nordestino. As coletas foram realizadas nas cavernas Furna Feia (Baraúna/RN), Crotes (Felipe Guerra/RN) e Olho d'Água do Mamede (Jandaíra/RN), abrangendo tanto a água de gotejamento da epicarste quanto corpos d'água epicársticos. As amostras foram processadas por técnicas padronizadas de triagem e identificação taxonômica, seguidas de análises estatísticas (NMDS, ANOSIM, Teste t e Diagramas de Venn).

Foram registrados 19 táxons de zooplâncton, distribuídos entre os diferentes ambientes amostrados. Apesar de variações na composição entre as cavernas, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na riqueza de espécies entre epicarste e ambientes subterrâneos. Ainda assim, verificou-se elevada sobreposição de comunidades, com 39% dos táxons compartilhados entre os compartimentos, além da predominância de espécies exclusivas da epicarste. Esses padrões reforçam a hipótese “source–sink”, segundo a qual a epicarste atua como reservatório e via de aporte de organismos ao interior das cavernas. Este estudo evidencia que, mesmo em ambientes subterrâneos de baixa luminosidade e limitação trófica, o zooplâncton desempenha papel relevante na ciclagem de nutrientes e na manutenção das redes tróficas locais. Os achados ressaltam a importância do zooplâncton como indicador ecológico em sistemas cársticos inte

Palavras-chave: zooplâncton; ecossistemas subterrâneos; epicarste; semiárido; cavernas

TITLE: What contribution do epikarst zooplankton species make to diversity in caves?

Abstract

This study is one of several research efforts focused on zooplankton fauna associated with epikarst and subterranean environments in caves in the northeastern semi-arid region. Samples were collected in the caves Furna Feia (Baraúna/RN), Crotes (Felipe Guerra/RN), and Olho d'Água do Mamede (Jandaíra/RN), covering both epikarst drip water and epikarst water bodies. The samples were processed using standardized sorting and taxonomic identification techniques, followed by statistical analyses (NMDS, ANOSIM, t-test, and Venn diagrams).

Nineteen zooplankton taxa were recorded, distributed among the different environments sampled. Despite variations in composition between caves, no statistically significant differences in species richness were detected between epikarst and underground environments. Nevertheless, there was a high overlap of communities, with 39% of taxa shared between compartments, in addition to a predominance of species exclusive to the epikarst. These patterns reinforce the “source–sink” hypothesis, according to which the epikarst acts as a reservoir and a route for organisms to enter the caves.

This study shows that, even in low-light and trophic-limited underground environments, zooplankton plays an important role in nutrient cycling and maintaining local food webs. The findings highlight the importance of zooplankton as an ecological indicator in karst systems.

Keywords: zooplankton; subterranean ecosystems; epikarst; semi-arid; caves

Introdução

O zooplâncton é um componente-chave nos ecossistemas aquáticos, atuando como elo entre a produção primária e os níveis tróficos superiores. (Barbosa et al., 2006; Kuhlmann et al., 2012). Em ambientes subterrâneos, especialmente em regiões semiáridas como o Nordeste brasileiro, o zooplâncton pode adentrar esses sistemas por meio do carreamento associado às chuvas e à porosidade do solo, alcançando o epicarste (i.e., zona cárstica superior altamente fraturada e fissurada) ou outras feições de recarga (e.g., aberturas ou fraturas que conectam a superfície ao aquífero). (DANIELOPOL et al., 2003; FORD & WILLIAMS, 2007). A ausência de luz e de organismos fotoautotróficos promove a limitação de recursos energéticos internos, tornando o ambiente extremo para a estabilização e reprodução do zooplâncton, o que explica a baixa diversidade e abundância em comparação com sistemas epígeos. (SIMON et al., 2007; FICETOLA et al., 2018).

Cavernas associadas a áreas de recarga recebem, por infiltração, água rica em matéria orgânica particulada e conjuntamente o carreamento de organismos suspensos, incluindo formas planctônicas (SOUZA-SILVA et al., 2007; GILBERT et al., 1994). No entanto, a maioria dos indivíduos zooplanctônicos encontrados nestes sistemas subterrâneos não apresentam adaptações específicas para o meio (e.g., redução ocular, perda de pigmentação ou alterações locomotoras), o que indica que sua presença é majoritariamente passageira, composta por organismos ocasionais ou acidentais, geralmente associados a eventos hidrológicos que promovem seu transporte passivo (CULVER, 2009; DANIELOPOL et al., 2003).

Ainda assim, mesmo como visitantes temporários ou ocasionais, os organismos planctônicos têm papel relevante na ciclagem de nutrientes e na sustentação de redes tróficas subterrâneas (Litchman et al. 2013). Ao atuarem como consumidores, se alimentam de bactérias, detritos, protozoários e outros organismos zooplanctônicos, assim como fornecem energia para níveis tróficos superiores (BOULTON, 2020; STOCH & FLOT, 2020). A presença de zooplâncton em ambientes subterrâneos pode refletir diretamente a conectividade entre locais subterrâneos e a superfície, servindo como indicadores ecológicos de fluxos hídricos em sistemas cársticos intermitentes, como os do semiárido nordestino (FICETOLA et al., 2018). Em regiões com sazonalidade extrema, essa conectividade hídrica pode regular a composição de comunidades aquáticas, tornando o zooplâncton um elemento-chave para monitorar variações ecológicas nessas zonas frágeis (ZEPON & BICHUETTE, 2024).

Embora a pesquisa sobre fauna subterrânea tenha progredido gradualmente, o conhecimento sobre zooplâncton em ambientes cavernícolas, especialmente no semiárido nordestino, permanece limitado. Estudos sobre a fauna hipogea realizada especificamente no estado do Rio Grande do Norte evidenciam essa escassez, particularmente em grupos pouco estudados como o zooplâncton (FERREIRA et al., 2010). A dinâmica hídrica em ambientes cársticos do Nordeste, marcada pela sazonalidade climática e intermitência de corpos d'água, influencia diretamente a composição e a riqueza de táxons zooplanctônicos encontrados no interior das cavernas (SOUZA-SILVA et al., 2007). Diante disso, este estudo tem como objetivo analisar a composição de espécies de zooplâncton associadas à epicarste e aos ambientes subterrâneos do Rio Grande do Norte, além de comparar a riqueza e a estrutura das comunidades entre esses compartimentos.

Metodologia

Área de estudo e amostragem

As amostragens foram realizadas em três ambientes subterrâneos com o objetivo de coletar organismos zooplanctônicos da porção epicarste: Furna Feia (FFA) (Baraúna, RN), Crotes (CRO) (Felipe Guerra, RN) e Olho d'Água do Mamede (MAM) (Jandaíra, RN). Além disso, nas cavernas Furna Feia e Crotes também foi amostrada a comunidade de zooplâncton presente na poça freática/epicástica (FFA) e no lago epicástico (CRO). Para a coleta do zooplâncton da epicarste, foram construídas armadilhas utilizando-se baldes equipados com malhas de 68 μ m de abertura, posicionadas diretamente sob o gotejamento da epicarste. Essas armadilhas permaneceram instaladas durante dois intervalos: de 07/12/2023 a 05/04/2024 (4 meses) e de 05/04/2024 a 07/06/2024 (2 meses), em cada caverna. Ainda, foram coletadas nas cavernas FFA e CRO uma amostra condizente à 24h de gotejamento, sendo a armadilha deixada no dia 07/06/24 e retirada no dia 08/06/24.

Nos corpos d'água das cavernas (i.e. poça freática/epicástica de FFA e lago epicástico de CRO), a coleta foi realizada diretamente com um balde graduado, totalizando 20 litros de água por ponto amostral. A água coletada foi filtrada em uma rede de plâncton com malhas de 68 μ m de abertura.

As amostras foram fixadas com formol a 4% e armazenadas em frascos plásticos para posterior análise em laboratório. A triagem, quantificação e identificação dos organismos zooplanctônicos foram feitas sob microscópio óptico, utilizando a placa de Sedgewick-Rafter. Para cada amostra, foram analisadas ao menos três subamostras de 2 ml, ou até que se alcançasse um mínimo de 50 indivíduos por grupo. A identificação dos organismos foi realizada até o menor nível taxonômico possível com base em bibliografia especializada. Para rotíferos, foram utilizadas as chaves de Voight & Koste (1978); para copépodes, as referências de Silva (2003) e Neves (2011). As amebas testáceas foram identificadas conforme Deflandre (1928, 1929), Gauthier-Lièvre & Thomas (1958, 1960), Ogden & Hedley (1980), Velho & Lansac-Tôha (1996) e Souza (2008).

Análises Estatísticas

Para avaliar a composição de espécies de zooplâncton entre o epicarste e os ambientes subterrâneos, foi realizada uma Análise de Ordenação por Escalonamento Não-Métrico (NMDS), utilizando o índice de Jaccard com dados de presença/ausência. A significância das

diferenças entre os grupos foi testada por meio da ANOSIM. Diagramas de Venn foram utilizados para visualizar o compartilhamento de espécies entre os ambientes. Por fim, a diferença na riqueza entre os grupos foi avaliada por meio do teste T. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa R.

Resultados e Discussões

Resultados

A caverna Crotes apresentou 11 táxons tanto na epicarste quanto no ambiente, evidenciando uma comunidade um pouco mais diversa e equilibrada entre os compartimentos. Furna Feia registrou 5 táxons em cada ambiente, indicando menor riqueza geral. Já Olho d'Água do Mamede apresentou 3 táxons, todas no epicarste (Tabela 1). No entanto, como não houve coleta no corpo d'água do ambiente nessa caverna, não é possível comparar a riqueza entre compartimentos, o que limita a interpretação dos dados para esse ponto amostral.

A caverna Crotes apresentou a maior riqueza de táxons, seguida por Furna Feia e Olho d'Água do Mamede, que exibiram valores semelhantes (Figura 1). Apesar dessas variações entre cavernas, não houve diferença significativa na riqueza de táxons entre epicarste e ambiente (teste t; $t = -0.12$; $df = 5.81$; $p = 0.90$), indicando similaridade geral entre os compartimentos.

A ordenação não-métrica (NMDS), baseada no índice de Jaccard, permitiu visualizar a composição das comunidades nos diferentes locais (Figura 2). Os pontos referentes ao epicarste e ao ambiente subterrâneo apresentaram proximidade entre si, reforçando a ideia de sobreposição na composição de táxons entre os compartimentos, especialmente em Crotes e Furna Feia. Para Olho d'Água do Mamede, os registros se limitaram a epicarste, impossibilitando a comparação direta com o ambiente subterrâneo. A análise ANOSIM confirmou a ausência de diferenças significativas na composição do zooplâncton entre o epicarste e os ambientes subterrâneos na caverna Crotes ($R = -0.15$, $p = 0.916$), sugerindo que os compartimentos possuem comunidades semelhantes em termos de composição de táxons.

O diagrama de Venn (Figura 3) mostrou que a maioria dos táxons foi exclusiva do epicarste ($n = 10$; 56%), enquanto apenas uma espécie foi exclusiva do ambiente subterrâneo ($n = 1$; 6%). Sete táxons (39%) foram compartilhados entre os dois compartimentos, evidenciando um fluxo de organismos entre eles.

Discussão

A similaridade observada entre as comunidades de zooplâncton da epicarste e dos ambientes subterrâneos em Crotes e Furna Feia sugere forte conexão entre esses compartimentos. Esse padrão é compatível com a hipótese “source-sink”, segundo a qual a epicarste atua como fonte de organismos para o ambiente subterrâneo, funcionando como um reservatório e conduto de espécies que chegam pela água de infiltração (FERREIRA et al., 2024; SOUZA-SILVA et al., 2007). A ocorrência de táxons exclusivos da epicarste, juntamente com uma proporção significativa de espécies compartilhadas entre os compartimentos, indica que a interface entre epicarste e ambiente subterrâneo desempenha um papel funcional importante na conectividade ecológica desses sistemas. Estudos demonstram que o epicarste age como um elo crítico entre a superfície e os habitats subterrâneos, pois a água que percola por essa zona transporta simultaneamente matéria orgânica e organismos para as áreas mais profundas

(Pipán & Culver, 2007). A menor riqueza registrada em Furna Feia, associada a um compartilhamento reduzido de táxons entre a epicarste e o ambiente subterrâneo (apenas um táxon em comum), pode estar relacionada à influência combinada da epicarste e do lençol freático. Embora o epicarste contribua para a composição da poça subterrânea, o lençol freático também exerce influência, podendo ser a principal via de transferência de espécies para esse ambiente. A entrada de água subterrânea proveniente do aquífero pode modificar as características físico-químicas locais, criando condições menos favoráveis para determinados grupos planctônicos (CULLEN; PINTO-COELHO, 2002). Além disso, fatores como ausência de luz, escassez de alimento e isolamento espacial pode limitar a colonização e permanência de espécies, resultando em comunidades mais restritas e especializadas (CULVER; PIPAN, 2019).

No caso de Olho d'Água do Mamede, a limitação dos dados à comunidade da epicarste impossibilitou comparações com o ambiente subterrâneo. Ainda assim, a baixa riqueza observada (três espécies) pode estar associada à própria dinâmica hídrica da região semiárida do Rio Grande do Norte, caracterizada pela sazonalidade climática e intermitência de corpos d'água (DANTAS; SILVA; NOGUEIRA, 2023). Essa variabilidade pode restringir o aporte contínuo de organismos e nutrientes para os sistemas subterrâneos, reduzindo a diversidade local e reforçando a importância de investigações de longo prazo que considerem diferentes períodos hidrológicos para compreender a dinâmica das comunidades de zooplâncton em cavernas da região.

Conclusão

Conclusão

Este estudo apresentou um dos primeiros levantamentos sobre a fauna zooplânctônica associada à epicarste e a ambientes subterrâneos no semiárido nordestino, revelando que, apesar das limitações impostas pela baixa luminosidade e disponibilidade de recursos, esses compartimentos mantêm comunidades estruturalmente semelhantes e com significativa sobreposição de táxons. A ausência de diferenças estatísticas na riqueza e na composição entre epicarste e ambientes subterrâneos reforça a hipótese de conectividade hidrológica, na qual a epicarste atua como fonte de organismos para o interior das cavernas. Esses resultados destacam a importância de se considerar o zooplâncton como elemento chave para compreender a dinâmica subterrânea e avançar nas estratégias de conservação em sistemas cársticos do semiárido.

Referências

- Elmoor-Loureiro, L. M. A. (1997). Manual de identificação de zooplâncton. UFSC.
- BARBOSA, F. A. R.; PADISÁK, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; BORICS, G.; ROCHA, O. The cascading reservoir continuum concept (CRCC) and its application to the river Tietê-basin, São Paulo State, Brazil. *Ecological Modelling*, v. 191, p. 513-527, 2006.
- BOULTON, A. J. Conservation of subterranean biodiversity in groundwater-dominated ecosystems: global lessons from published studies in hyporheic and groundwater habitats. *Ecological Research*, v. 35, p. 12-25, 2020.

- CULVER, D. C.; PIPE, R. K. Encyclopedia of Caves. San Diego: Academic Press, 2009.
- DANIELOPOL, D. L.; GRIEBLER, C.; GUNATILAKA, A.; NOTENBOOM, J. Present state and future prospects for groundwater ecosystems. Environmental Conservation, v. 30, n. 2, p. 104-130, 2003.
- FERREIRA, R. L.; PONTES-SILVA, V. H.; MARTINS, V. T. S. Biodiversidade subterrânea em áreas cársticas do Nordeste do Brasil: uma análise comparativa. Revista Brasileira de Espeleologia, v. 2, p. 35-49, 2010.
- FICETOLA, G. F.; CANEDOLI, C.; FUMAGALLI, M. M. Biotic and abiotic determinants of invertebrate diversity in groundwater systems. Freshwater Biology, v. 63, p. 313-324, 2018.
- FORD, D. C.; WILLIAMS, P. W. Karst Hydrogeology and Geomorphology. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
- GILBERT, J.; DANIELOPOL, D. L.; STANLEY, E. H. (eds.). Groundwater Ecology. San Diego: Academic Press, 1994.
- KUHLMANN, M. L.; LOPES, R. M. Zooplâncton (Rotifera, Cladocera e Copepoda) em reservatórios do Estado de São Paulo, Brasil: padrões de ocorrência e distribuição. Biota Neotropica, v. 12, n. 4, p. 37-48, 2012.
- LITCHMAN, E.; PINTO, P. T.; KLAUSMEIER, C. A.; THOMAS, M. K.; YOSHIDA, T. Phytoplankton niches, traits and eco-evolutionary responses to global environmental change. Marine Ecology Progress Series, v. 470, p. 235-248, 2013.
- SIMON, K. S.; BENFIELD, E. F.; WEYERS, H. S. Nutrient spiraling and transport in streams: the importance of in-stream biological processes to nutrient dynamics. Freshwater Biology, v. 52, n. 1, p. 138-149, 2007.
- STOCH, F.; FLOT, J. F. Karst groundwater biodiversity: towards a more integrative approach. Hydrobiologia, v. 849, p. 1-16, 2020.
- SOUZA-SILVA, M.; MARTINS, R. P.; FERREIRA, R. L. Cave lithology determining the structure of communities in Brazilian caves. Acta Carsologica, v. 36, n. 1, p. 119-130, 2007.
- ZEPON, T.; BICHUETTE, M. E. Hydroperiod as a driver of community composition in subterranean aquatic habitats in Brazilian semiarid karst areas. Subterranean Biology, v. 44, p. 67-89, 2024.

Anexos

Tabela 1. Composição de espécies de zooplâncton da epicarste e do ambiente subterrâneo em cavernas do Nordeste. CRO-EPI (amostras da epicarste de Crotas), CRO-AMB (amostras do lago epicárstico de Crotas), FFA-EPI (amostras da epicarste de Furna Feia), FFA

Figura 1.: Boxplot comparando a riqueza de táxons de zooplâncton entre epicarste (amarelo) e ambientes subterrâneos (azul) no total das cavernas amostradas.

Figura 2.: Ordenação não-métrica multidimensional (NMDS), baseada no índice de Jaccard, da composição de espécies de zooplâncton no epicarste e nos ambientes subterrâneos das cavernas estudadas no RN.

Figura 3.: Diagrama de Venn mostrando o compartilhamento de espécies de zooplâncton entre epicarste (EP) e ambientes subterrâneos (AM) no total das cavernas amostradas no RN.

CÓDIGO: SB1675

AUTOR: MARIA CLARA DE FIGUEIREDO SILVEIRA LIRA

ORIENTADOR: MELQUISEDEC ABIARE DANTAS DE SANTANA

TÍTULO: EXPRESSÃO DE FOS NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES AGENTES ANESTÉSICOS APÓS ESTÍMULO NOCICEPTIVO

Resumo

A dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial. Especialmente, no tronco encefálico, as principais áreas que recebem aferências de neurônios nociceptivos, as quais serão estudadas neste trabalho, são o locus ceruleus (LC), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo parabraquial (PB) e o núcleo do tracto solitário (SOL). No contexto de procedimentos invasivos utilizados na pesquisa científica e no cotidiano da clínica cirúrgica envolvendo animais, as substâncias ketamina, xilazina e isoflurano surgem como anestésicos importantes com potenciais satisfatórios. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é analisar a efetividade das drogas anestésicas citadas no bloqueio da dor após a estimulação nociceptiva em ratos com base na expressão da proteína c-fos. Para isso, os ratos foram divididos em 3 grupos com 5 animais em cada um. No primeiro grupo, o grupo controle, foi administrado uma dose de ácido acético intraperitoneal sem nenhum dos anestésicos testados. No segundo grupo foi administrado o ácido acético e posteriormente uma dose da combinação de ketamina e xilazina e no terceiro grupo, após a administração do ácido acético, foi utilizado o isoflurano para a indução e manutenção da anestesia inalatória. Após a análise dos dados, o grupo controle apresentou uma maior ativação de Fos em SOL, Isoflurano atenuou a ativação de Fos em todos os núcleos e a ketamina-xilasina aumentou Fos sobretudo na PAG.

Palavras-chave: dor. ketamina. isoflurano. PAG. PB. SOL. LC. c-fos.

TITLE: FOS EXPRESSION IN THE BRAINSTEM OF RATS SUBJECTED TO DIFFERENT ANESTHETIC AGENTS AFTER NOCICEPTIVE STIMULATION

Abstract

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage. In the brainstem, the main areas that receive afferents from nociceptive neurons, which will be investigated in this study, are the locus coeruleus (LC), the periaqueductal gray matter (PAG), the parabrachial nucleus (PB), and the nucleus of the solitary tract (SOL). In the context of invasive procedures used in scientific research and in daily surgical practice involving animals, ketamine, xylazine, and isoflurane emerge as important anesthetics with satisfactory potential. Therefore, the aim of this study is to analyze the effectiveness of these anesthetic drugs in blocking pain after nociceptive stimulation in rats, based on the expression of the c-Fos protein. For this purpose, the rats were divided into three groups with five animals in each. In the first group, the control group, an intraperitoneal dose of acetic acid was administered without any of the tested anesthetics. In the second

group, acetic acid was administered followed by a dose of the ketamine–xylazine combination, and in the third group, after acetic acid administration, isoflurane was used for induction and maintenance of inhalation anesthesia. After data analysis, the control group showed greater Fos activation in the SOL, isoflurane attenuated Fos activation in all nuclei, and ketamine–xylazine increased Fos especially in the PAG.

Keywords: pain. nociception. ketamine. isoflurane. PAG. PB. SOL. LC. c-fos.

Introdução

Por ser uma sensação de grande preocupação em todos os aspectos da vida humana e animal, a dor é um assunto de grande interesse para a ciência. De acordo com a International Association for The Study of Pain (IASP), a dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial. Dessa forma, para que a sensação dolorosa possa ser iniciada, os estímulos nocivos captados pelos nociceptores das fibras aferentes são convertidos em impulsos elétricos e se propagam em direção ao corno dorsal da medula espinal (Batalha, 2015; De Moraes et al., 2021; Wall; Melzack, 2013).

As fibras aferentes que transmitem a informação dolorosa são do tipo A δ ou do tipo C e seus receptores estão presentes na pele, vísceras, vasos sanguíneos e músculo esquelético. Enquanto as fibras A δ conduzem sensações dolorosas agudas imediatas, semelhantes a pontada, as do tipo C conduz uma dor mais tardia e difusa, manifestada por uma queimação persistente (Batalha, 2015;Klaumann; Wouk; Sillas, 2008).

Após a lesão tecidual, essas fibras fazem sinapses com os neurônios de projeção, também chamados de neurônios de segunda ordem, situados no corno dorsal da medula e que ascendem para centros supraespinais. O processamento e a percepção sobre a lesão tecidual ocasionada são regulados pela ação de neurotransmissores, como o glutamato que ativa os receptores excitatórios NMDA (N-metil D-Aspartato) (De Moraes et al., 2021; Klaumann; Wouk; Sillas, 2008; Wall; Melzack, 2013), aumentando a resposta ao estímulo doloroso. Assim, facilita a transmissão dos impulsos nociceptivos em direção aos centros supraespinais, como o tronco encefálico ou o tálamo (Teixeira; Formi 2019; Wall; Melzack, 2013).

Especialmente, no tronco encefálico, as principais áreas que recebem aferências de neurônios nociceptivos, as quais serão estudadas neste trabalho, são o: locus ceruleus (LC), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo parabraquial (PB) e o núcleo do tracto solitário (SOL).

Os avanços nas pesquisas relacionadas à dor, não só buscam compreender os mecanismos envolvidos na transmissão da dor, mas também buscam intervenções adequadas, como os anestésicos, que sejam capazes de minimizar ou interromper o sinal doloroso e que possam ser utilizados na pesquisa científica envolvendo animais (Rezende, 2009). Nesse cenário, as substâncias ketamina, xilazina e isoflurano surgem como anestésicos importantes com potenciais satisfatórios clinicamente.

A ketamina é uma das drogas anestésicas mais usadas na imobilização animal, sendo incluída no grupo dos anestésicos dissociativos. Seu mecanismo de ação baseia-se principalmente em ser um antagonista dos receptores NMDA, bloqueando esse receptor e, consequentemente, a informação dolorosa (Da Silva et al., 2001; Midega et al., 2022; Pachaly et al., 2014; Trindade et al., 2013). A fim de atenuar seus efeitos colaterais, a ketamina geralmente é associada a outros fármacos como a xilazina, um anestésico agonista dos receptores

adrenérgicos α -2. Estes receptores, quando estimulados, provocam uma diminuição na liberação de neurotransmissores nociceptivos resultando em analgesia combinada com sedação e/ou hipnose (Pachaly et al., 2014; Spinoso; Spinoso, 1991). Por fim, o isoflurano é um agente anestésico líquido, para uso em anestesia geral inalatória, por meio de vaporização e seu mecanismo de ação baseia-se principalmente na ativação dos receptores de ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA_A) (Hu et al., 2024; Nocite, 1987; Tardelli et al., 1988).

O gene de expressão imediata C-fos e o seu produto protéico, a proteína Fos, são rapidamente expressos após estímulos nociceptivos em neurônios da medula espinal e em centros encefálicos envolvidos na modulação da dor. Em razão disso, o mapeamento da ativação da proteína Fos é um dos mecanismos utilizados para localizar e estudar populações de neurônios que respondem à entrada nociceptiva (Coggeshall, 2005; Harris, 1998).

Metodologia

Considerações éticas

Esta pesquisa foi realizada a partir de lâminas histológicas oriundas do projeto: “Padrão de ativação neural, após estimulação nociceptiva visceral em ratos wistar submetidos a diferentes agentes anestésicos”, aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFRN (CEUA-UFRN) com o protocolo denúmero 030/2011. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neuroanatomia, Departamento de Morfologia, UFRN.

Delineamento experimental

Os ratos foram divididos em 3 grupos com 5 animais em cada um. No primeiro grupo (grupo controle) foi administrado uma dose de ácido acético intraperitoneal a 5% na dosagem de 0,6 ml/100g do peso do animal e não receberam nenhuma dose prévia de nenhum dos anestésicos testados. No segundo grupo foi administrado o ácido acético e posteriormente uma dose de 100mg/kg de ketamina e 5mg/kg de xilazina, sendo feitos repiques de metade da dose mãe quando a superficialização do plano anestésico. No terceiro grupo foi administrado ácido acético e posteriormente utilizado o isoflurano para a indução (4%) e manutenção (1,5%) da anestesia inalatória.

Perfusão, remoção dos encéfalos e microtomia

Após anestesia, cada animal foi submetido à perfusão transcardíaca. Primeiro, foi feito o posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre tela de arame sob ponto de água, depois uma toracotomia para exposição do coração e por último uma cardiopunção no ventrículo esquerdo a qual foi direcionada para a aorta, seguindo-se de uma incisão no átrio direito. A agulha utilizada foi conectada a uma bomba peristáltica, passando-se 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina a um fluxo de 2ml por minuto, seguida de 600 ml de solução fixadora de Zamboni em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, a um fluxo inicial de 5 ml por minuto.

Concluída a etapa da perfusão, foi realizado o procedimento de craniotomia para remoção dos encéfalos. Estes foram congelados por gelo seco e seccionados em um micrótomato de deslizamento. Foram obtidas secções coronais de 30 μ m de espessura, as quais foram distribuídas em 6 compartimentos em um meio líquido contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. As secções foram armazenadas em tampão fosfato e conservadas a 4°C.

Os cortes de um compartimento foram montados em lâminas de vidro em sequência rostrocaudal e submetidos à coloração de Nissl usando o corante tionina. Os cortes dos demais compartimentos foram armazenados em solução anticongelante e conservados a -20 °C.

Imunohistoquímica

As secções dos demais compartimentos foram submetidas a imunohistoquímica para revelação da distribuição da proteína c-Fos. Inicialmente, as secções foram submetidas a 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 em agitador orbital e depois ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 20 minutos, seguido de 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, com o objetivo de neutralizar a peroxidase endógena. Para a recuperação de antigenicidade os cortes foram submetidos à incubação em borohidreto de sódio durante 20 minutos, seguido mais uma vez de 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato.

Após isso, as secções foram incubadas no anticorpo primário específico para c-Fos (Rabbit anti-c-fos - Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) em diluição de 1:2000, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, em Triton X-100 a 0,4% e soro normal do animal em que foi obtido o anticorpo secundário a 2% (Donkey serum) por um período de 16 horas em rotor com rotação lenta. Ao fim, as secções foram submetidas a mais lavagens em tampão fosfato no agitador orbital.

Posteriormente, as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotinilado contra as proteínas do animal em que foi obtido o anticorpo primário (biotinylated donkey anti-rabbit, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Westgrove, USA) diluído a 1:400 e Triton X-100 0,4%, por 90 minutos sob agitação lenta em rotor.

Em seguida, os cortes passaram por mais uma sessão de lavagens em tampão fosfato. Então as secções foram colocadas em contato com o complexo avidina-biotina-HRP (Protocolo ABC, Kit elite da Vector), à diluição de 1:100, em Triton X-100 a 0,4% durante 90 minutos. Essa solução foi preparada 30 minutos antes para que ocorresse a formação de complexos avidina-biotina-peroxidase.

Ao fim da incubação neste complexo, os cortes foram lavados novamente por tampão fosfato. Para evidenciar a reação, as secções foram postas em um meio contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substrato e tetrahidrocloro-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno e permaneceram em contato com essa solução durante 5 minutos. Ao fim desse período, foi acrescentado H₂O₂ deixando reagir até que os cortes fiquem com coloração marrom, cerca de 1 a 10 minutos. Ao final da reação, as secções foram submetidas a mais lavagens em tampão fosfato.

As secções foram montadas sequencialmente no sentido rostrocaudal em lâminas previamente gelatinizadas. Após secarem, foram mergulhadas rapidamente em solução de tetróxido de ósmio a 0,005% para intensificação da reação. Depois as secções passaram por uma bateria de álcoois de graduação sucessivamente mais alta até o álcool absoluto, finalizando com a diafanização com xilol e cobertas com lamínulas.

Quantificação da imunomarcção

Utilizando como base anatômica as secções coradas pelo método de Nissl de cada animal e o atlas estereotático do encéfalo do rato (Paxinos & Watson, 2007), fotomicrografias

unilaterais em nível rostral, médio e caudal de cada área de interesse foram obtidas utilizando uma câmera digital (Nikon DS-Ri 1) acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse Ni) e analisadas com o programa Nis Elements (Nikon). Logo após, foi feita a contagem manual das células que expressaram Fos dentro dos núcleos para os grupos controle, isoflurano e ketamina-xilasina, utilizando o programa Nis Elements (Nikon).

Resultados e Discussões

A expressão de Fos no tronco encefálico foi analisada em 4 núcleos envolvidos com a modulação da informação nociceptiva, sendo eles: Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG), Núcleo Parabraquial (PB), Locus Ceruleus (LC) e Núcleo do Trato Solitário (SOL). Neste estudo, foi conduzida uma análise comparativa para examinar os efeitos de ketamina-xilasina e isoflurano na expressão de c-Fos em várias regiões cerebrais após um estímulo nociceptivo.

A partir disso, foi possível observar que no grupo controle, em que foi administrado ácido acético para provocar nocicepção, houve uma maior ativação do SOL em relação a PAG, LC e PB e aos grupos de anestésicos, destacando um papel importante do SOL na modulação da dor (Figura 1). Concomitantemente, ao comparar o grupo controle com o isoflurano, foi possível observar que a administração desse anestésico diminuiu a ativação de Fos sobretudo no SOL. Em PB, LC e PAG a diminuição da ativação foi mínima (Figura 2). Por último, comparando ketamina-xilasina ao grupo controle, observou-se que houve um aumento na ativação de Fos principalmente na PAG, seguida por PB e LC (Figura 3). Ao contrário disso, no SOL foi possível observar uma diminuição de Fos, assim como foi observado no grupo isoflurano.

Assim, ficou claro que a peritonite estimulada por ácido acético e administração de diferentes anestésicos foi suficiente para observar que há diferenças quanto ao número de neurônios imunorreativos a Fos no tronco encefálico nos diferentes grupos.

A injeção intraperitoneal de ácido acético (AA) é um estímulo visceral químico nocivo bem conhecido em ratos e induz a dor (Bonaz et al., 2000; Dou et al., 2023). Assim como é relatado neste presente estudo, a dor provocada por ácido acético no grupo controle induz a expressão de c-Fos no Sistema Nervoso Central, sobretudo no núcleo do trato solitário (SOL) em comparação aos outros núcleos e aos outros grupos em que foi injetado os anestésicos. Este núcleo recebe projeções do nervo vago que transmitem sensações viscerais do tórax e do abdômen, sendo considerado o núcleo sensorial visceral central no tronco encefálico (Dou et al., 2023). Esses achados foram consistentes com os dados obtidos por Bonaz et al. (2000) que avaliou os níveis aumentados de expressão de c-Fos em resposta à dor visceral induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético.

Em paralelo, observou-se que a administração de isoflurano diminuiu a ativação de Fos sobretudo no SOL e na PAG. Esse cenário é explicado pelo fato de que o isoflurano potencializa a transmissão inibitória via receptores pós-sinápticos de GABAA e também possui ação inibitória sobre os receptores excitatórios NMDA de glutamato. Sendo assim, sugere redução da ativação neuronal, com consequente redução da expressão de Fos nesses dois núcleos. (Peters et al., 2008; Hedrich, 2013; Hu et al., 2024).

Além disso, a administração de ketamina-xilasina diminuiu a ativação de Fos no SOL. Nesse contexto, estudos eletrofisiológicos mostraram que a ketamina bloqueia as transmissões

sinápticas aferentes do SOL tanto inibindo os receptores NMDA pós-sinápticos quanto por ação pré-sináptica em terminais vagais (Jin et al. 2003). Como a ketamina diminui a transmissão glutamatérgica, é plausível que também reduza a expressão de Fos no SOL após estímulos que normalmente a ativariam.

No entanto, ao contrário dos outros grupos, a ketamina-xilasina aumentou a ativação de Fos de PAG. A PAG é amplamente responsável pela modulação descendente da percepção da dor, enviando projeções descendentes inibitórias para os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal e assim, diminuindo a intensidade da dor (Ossipov et al., 2010; Mokhtar; Singh, 2023). A administração de ketamina, além de inibir os receptores excitatórios NMDA, também ativa as vias inibitórias descendentes mediadas pela PAG, potencializando esse circuito e reduzindo a transmissão dos sinais de dor (Ma; Yan; Jiang, 2013; Brown; Tucker, 2020). Dessa forma, a PAG permanece altamente ativa regulando o sistema descendente da dor e portanto, expressa um número significativo de Fos, o que explica o aumento da imunorreatividade dessa proteína na PAG.

Conclusão

O presente estudo evidenciou que a dor, enquanto fenômeno complexo de grande relevância para a ciência, envolve diferentes vias de transmissão e centros encefálicos responsáveis por sua modulação. A indução de dor visceral por ácido acético demonstrou ser um estímulo eficaz para ativação de neurônios imunorreativos a Fos, principalmente no núcleo do trato solitário (SOL), reforçando seu papel central no processamento de aferências viscerais.

A análise comparativa entre os grupos submetidos aos diferentes anestésicos permitiu observar que o isoflurano reduziu a expressão de Fos, sobretudo no SOL e na PAG, em decorrência de sua ação inibitória sobre receptores excitatórios e de potencialização da transmissão GABAérgica. Já a associação ketamina-xilasina apresentou efeito distinto: diminuiu a ativação de Fos no SOL, mas promoveu maior ativação na PAG, corroborando sua participação no recrutamento das vias descendentes inibitórias da dor.

Dessa forma, os achados apontam que diferentes agentes anestésicos exercem efeitos específicos sobre a expressão de Fos nos núcleos do tronco encefálico, refletindo mecanismos particulares de ação no controle da nocicepção. Tais resultados contribuem para a compreensão dos processos envolvidos na modulação da dor e reforçam a importância do uso criterioso de anestésicos em pesquisas experimentais.

Referências

ALVES, J. E. de O. et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 56–68, 1 jul. 2017.

BATALHA, L. Anatomia, Neurobiologia e Fisiopatologia da Dor. [S.l.]: **Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal** (Repositórios Científicos), 2015.

BONAZ, B. et al. Fedotozine, a kappa-opioid agonist, prevents spinal and supra-spinal Fos expression induced by a noxious visceral stimulus in the rat. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 12, n. 2, p. 135–147, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2982.2000.00188.x.

BROWN, K.; TUCKER, C. Ketamine for acute pain management and sedation. **Critical Care Nurse**, v. 40, n. 5, p. e26–e32, 2020. DOI: 10.4037/ccn2020419.

BULLITT, E. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 296, n. 4, p. 517–530, 22 jun. 1990.

CHEN, Z. S.; WANG, J. Pain, from perception to action: A computational perspective. **iScience**, v. 26, n. 1, p. 105707, dez. 2022. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105707.

COGGESHALL, R. E. Fos, nociception and the dorsal horn. **Progress in Neurobiology**, v. 77, p. 299–352, 13 dez. 2005.

DA SILVA, F. C. C. et al. Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. **Revista Neurociências**, v. 18, n. 2, p. 227–237, 31 mar. 2001.

DA SILVA, J. A. R. **Receptor NMDA e importância da cetamina no tratamento da dor crônica**. [S.l.]: Universidade Federal de Goiás, 2013.

DE MORAIS, M. C. G. et al. A elucidação acerca dos mecanismos de nocicepção e dor / The elucidation about mechanisms of nociception and pain. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, 26 ago. 2021.

DESANTANA, J. M. et al. Definição de dor revisada após quatro décadas. **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor**, v. 3, n. 3, 2020.

DOU, Z. et al. Modulation of visceral pain by brain nuclei and brain circuits and the role of acupuncture: a narrative review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 17, 2023. DOI: 10.3389/fnins.2023.1243232.

GOMES, L.; SOBRINHO, J. de A. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 18, n. 1, p. 58–67, 2014.

HARRIS, J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. **Brain Research Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 1–8, jan. 1998.

HEDRICH, H. J. The Laboratory Mouse. 2. ed. [S.l.]: **Elsevier**, 2012. DOI: 10.1016/C2009-0-60982-X.

HU, Y. et al. Comparative brain-wide mapping of ketamine- and isoflurane-activated nuclei and functional networks in the mouse brain. **eLife**, v. 12, RP88420, 2024. DOI: 10.7554/eLife.88420.

JIN, Y. H. et al. Ketamine differentially blocks sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius (mNTS). **Anesthesiology**, v. 98, n. 1, p. 121–132, jan. 2003. DOI: 10.1097/00000542-200301000-00021.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, 15 jul. 2008.

KOVÁCS, K. J. Measurement of immediate-early gene activation – c-fos and beyond. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 665–672, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x.

KRAYCHETE, D. C. et al. Clinical evidence on visceral pain: systematic review. **Revista Dor**, v. 18, n. 1, 2017.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of pain. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703–728, jul. 2000.

MACHADO, A.; HAERTEL, L. M. **Neuroanatomia Funcional**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

MIDEGA, T. D. et al. Uso de cetamina em pacientes críticos: uma revisão narrativa. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 34, n. 2, 2022.

MOKHTAR, M.; SINGH, P. Neuroanatomy, periaqueductal gray. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554391/>.

NOCITE, J. R. Isoflurano, vantagens e desvantagens. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 37, n. 4, p. 253–259, 1987.

OLIVEIRA, C. M. B. de et al. Cetamina e analgesia preemptiva. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, out. 2004.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, nov. 2010. DOI: 10.1172/JCI43766.

PACHALY, J. R. et al. Cetamina, xilazina e atropina, em doses calculadas por extrapolação alométrica interespecífica, para contenção farmacológica da cutia (*Dasyprocta azarae*). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, 2014.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6. ed. San Diego: **Academic Press**, 2007.

PETERS, J. H. et al. Isoflurane differentially modulates inhibitory and excitatory synaptic transmission to the solitary tract nucleus. **Anesthesiology**, v. 108, n. 4, p. 675–683, 2008. DOI: 10.1097/ALN.0b013e318167af9a.

PRADO, P. T. C.; BEL, E. A. del. c-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 31, n. 3, p. 424–433, 1998.

REZENDE, J. M. de. Breve história da anestesia geral. In: **À sombra do plátano: crônicas de história da medicina**. São Paulo: Fap-Unifesp, 2009. p. 103–109.

SPINOSA, H. de S.; SPINOSA, F. R. N. Sobre os efeitos farmacológicos da xilazina. **Biotemas**, v. 4, n. 2, 1991.

TARDELLI, M. A. et al. Avaliação clínica do isoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 38, n. 4, p. 277–281, 1988.

TEIXEIRA, M. J.; FORNI, J. Fisiopatologia da dor. In: **Tratado de dor musculoesquelética**. São Paulo: Alef, 2019. p. 25–36.

TRINDADE, H. I.; BATISTA, M. C. S.; SILVA, L. L. B. Dor: mecanismos envolvidos na sua transmissão e recursos terapêuticos aplicados à sua inibição. **Medicina Veterinária (Brasil)**, v. 7, n. 4, p. 6–18, 2013.

WALL, P.; MELZACK, R. **Wall & Melzack's Textbook of Pain**. 6. ed. [S.l.]: Elsevier Saunders, 2013.

ZHANG, D. et al. Identifying c-fos expression as a strategy to investigate the actions of general anesthetics on the central nervous system. **Current Neuropharmacology**, v. 20, n. 1, p. 55–71, 2022. DOI: 10.2174/1570159X19666210909150200.

Anexos

Figura 1 - Número de células imunorreativas a Fos no grupo controle

Figura 2 - Número de células imunorreativas a Fos no grupo isoflurano.

Figura 3 - Número de células imunorreativas a Fos no grupo ketamina-xilasina

CÓDIGO: SB1703

AUTOR: DANIEL MENDONCA DA SILVA

ORIENTADOR: LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ LIMA

TÍTULO: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA XPC NA SINALIZAÇÃO CELULAR 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; XP; Estresse oxidativo; Biogênese ribossomal

TITLE: Análise da influência da proteína XPC na biogênese ribossomal e sinalização celular em fibroblastos sob estresse oxidativo

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; XP; Oxidative stress; Ribosomal biogenesis

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 ($\bullet OH$), oxigênio singlete (1O_2) e radicais superóxido ($O_2\bullet^-$). 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 Trascrption (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 10⁶ 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

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi obtido o transcriptoma de células proficientes e deficientes em XPC sob estresse oxidativo. Esses dados mostraram que a deficiência em XPC leva à redução da expressão de genes relacionados à biogênese ribossomal e à sinalização celular durante o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. A análise da expressão gênica por RT-qPCR confirmou que a deficiência de XPC afeta a transcrição de genes associados à biogênese ribossomal durante o estresse oxidativo (Figura 1). Entre os genes avaliados, observou-se uma redução significativa na expressão de RPS6KC1, RPL27, RPL36, RPL35, RPL27A, RPL22, RPS11, RPL18 e RPS19 em células deficientes em XPC, quando comparadas às células proficientes. Os genes RPL27 e RPL35 exibiram reduções mais acentuadas ($p < 0,001$), sugerindo que a deficiência em XPC compromete a transcrição de componentes importantes para a montagem e função ribossomal. Em contrapartida, o gene RRS1 apresentou aumento da expressão nas células deficientes em XPC sob estresse oxidativo, o que sugere uma resposta regulatória distinta ou uma compensação por se tratar de um gene regulador. Esses resultados obtidos corroboram os dados do transcriptoma e reforçam a associação entre a deficiência de XPC e a regulação negativa da biogênese ribossomal. Além da validação por RT-qPCR, análises no Cytoscape identificaram possíveis fatores de transcrição envolvidos na regulação dos genes diferencialmente expressos. A rede apontou RARG e ELK1 como fatores de transcrição com múltiplas conexões a genes ribossomais, sugerindo um papel central na regulação da biogênese ribossomal (Figura 2). De acordo com os dados obtidos, RARG e ELK1 também apresentaram expressão reduzida nas células deficientes em XPC (Figura 3). Com relação à biogênese ribossomal, verificou-se uma diminuição significativa do transcrito precursor 47S em células proficientes em XPC após o estresse oxidativo. Já os transcritos derivados 28S e 18S apresentaram redução tanto em células proficientes quanto em deficientes em XPC (Figura 4). Esses resultados sugerem que a deficiência em XPC pode impactar tanto a transcrição quanto o processamento de pré-rRNA. Também foram avaliados genes ribossomais mitocondriais que foram modulados pelo estresse oxidativo. 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). Neste trabalho, também foi proposta a análise da expressão de genes relacionados à sinalização celular. No entanto, devido a problemas com primers, não foi possível realizar todas as análises planejadas. Entre os genes avaliados, ATM apresentou redução de expressão em ambas as linhagens, sendo o efeito mais evidente após a exposição ao H₂O₂. Já ATR demonstrou tendência à redução em células deficientes em XPC. Esses dados, demonstram que a proteína XPC tem um possível papel e pode influenciar a biogênese ribossomal em diferentes níveis, desde a regulação de subunidades ribossomais e fatores de transcrição até a modulação de pré-rRNA e ribossomos mitocondriais. Além disso, apontam para possíveis conexões com a via de sinalização celular, embora ainda precise de análises complementares para melhor discussão. No projeto de pesquisa também estava prevista a realização de Western blot. No entanto, devido a problemas com anticorpos, esse experimento não foi concluído no tempo planejado. Assim, foi solicitada a renovação do projeto para dar continuidade a esse ensaio e para novas análises, de modo a aprofundar a compreensão sobre a influência da proteína de reparo XPC em processos biológicos, principalmente na via de sinalização Wnt, além de elucidar como essa proteína atua nessas vias regulatórias.

Conclusão

Os resultados obtidos sugerem 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 essas 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> 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. PMID: 19847258; PMCID: PMC2906700. 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-change-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-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. 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> TOWBIN, H., STAEBELIN, 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> 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](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)94333-4)

Anexos

RT-qPCR

RT-qPCR

iRegulon

CÓDIGO: SB1706

AUTOR: LETICIA MARIA DA SILVA BRAGA

COAUTOR: RONALD MURYELLISON OLIVEIRA DA SILVA GOMES

ORIENTADOR: RAQUEL CORDEIRO THEODORO

TÍTULO: USO DO MODELO EXPERIMENTAL TENEBRIO MOLITOR PARA AVALIAR O IMPACTO DA ABUNDÂNCIA DE ÍNTRONS DO GRUPO I MITOCONDRIAS NA VIRULÊNCIA DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E CRYPTOCOCCUS GATTII

Resumo

Este estudo investigou o impacto de íntrons do grupo I (IGI) mitocondriais na virulência de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, agentes etiológicos da criptococose – uma infecção fúngica sistêmica que atinge tanto pessoas imunocomprometidas quanto imunocompetentes e que é considerada de importância crítica pela OMS. A hipótese testada foi que a abundância desses elementos genéticos influencia a patogenicidade. Para isso, utilizou-se o coleoptera *Tenebrio molitor* (modelo experimental invertebrado que se alinha ao Princípio dos 3Rs e possui imunidade inata humoral semelhante à dos vertebrados) para avaliar a virulência de 16 cepas (8 de cada espécie), com diferentes perfis de IGI. Grupos de larvas foram infectados com inóculos fúngicos, enquanto o grupo controle recebeu PBS. A sobrevivência das larvas foi monitorada e analisada estatisticamente. Os resultados demonstraram uma correlação inversa entre o número de IGI e a virulência. Dentre os genótipos analisados, as cepas com menor abundância de íntrons apresentaram maior letalidade no modelo animal, reduzindo a sobrevivência das larvas. Conclui-se que a presença de IGI mitocondriais pode atuar como um modulador negativo da virulência em *Cryptococcus* spp. Esta descoberta contribui para a compreensão dos fatores genéticos que regulam a patogenicidade desses fungos prioritários.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp.. Íntrons do Grupo I. Virulência. *Tenebrio molitor*.

TITLE: USE OF TENEBRIO MOLITOR AS AN EXPERIMENTAL MODEL TO EVALUATE THE IMPACT OF MITOCHONDRIAL GROUP I INTRON ABUNDANCE ON THE VIRULENCE OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AND CRYPTOCOCCUS GATTII

Abstract

This study investigated the impact of mitochondrial group I introns (IGI) on the virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiological agents of cryptococcosis - a systemic fungal infection that affects both immunocompromised and immunocompetent people and is considered to be of

critical importance by the WHO. The hypothesis tested was that the abundance of these genetic elements influences pathogenicity. For this purpose, we used the coleoptera *Tenebrio molitor* (an invertebrate experimental model that is in line with the 3Rs Principle and has innate humoral immunity similar to that of vertebrates) to evaluate the virulence of 16 strains (8 of each species) with different IGI profiles. Groups of larvae were infected with fungal inocula, while the control group received PBS. The survival of the larvae was monitored and statistically analyzed. The results showed an inverse correlation between the number of IGI and virulence. Among the genotypes analyzed, the strains with the lowest intron abundance showed greater lethality in the animal model, reducing larval survival. It is concluded that the presence of mitochondrial IGI can act as a negative modulator of virulence in *Cryptococcus* spp. This finding contributes to the understanding of the genetic factors that regulate the pathogenicity of these priority fungi.

Keywords: *Cryptococcus* spp.. Group I Introns. Virulence. *Tenebrio molitor*.

Introdução

Introns do Grupo I (IGI), elementos genéticos presentes nos genes que codificam RNAs, possuem entre 250 e 500 nucleotídeos e a capacidade de catalisar sua própria excisão dos exons flancuantes, ou seja, realizam auto-splicing (Nielsen; Johansen, 2009). Em eucariotos, os IGI podem ser encontrados em genes nucleares e organelares, como no rRNA, tRNA e em genes que codificam proteínas essenciais para a produção de ATP na mitocôndria, incluindo subunidades do citocromo C oxidase (cox), apocitocromo b (cob), NADH desidrogenase (nad) e ATP sintase (atp) (Corsaro; Venditti, 2019; Megarioti; Kouvelis, 2020). O impacto funcional dos IGI na virulência de fungos patogênicos permanece pouco explorado. Uma pesquisa recente, realizada por Liu e Pyle (2024), sugere que a estrutura dos IGI em genes mitocondriais de *Candida* spp. é crucial para a eficiência do splicing e pode influenciar a aptidão celular. Sabendo que a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2022, publicou a Lista de Patógenos Fúngicos Prioritários, a qual inclui *Cryptococcus neoformans* no grupo de prioridade crítica e *Cryptococcus gattii* no grupo de prioridade média (Fisher; Denning, 2023), este estudo tem os isolados dos complexos das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* como objeto de interesse. Estes patógenos são responsáveis por causar a criptococose, uma infecção fúngica sistêmica iniciada pela inalação de basidiósporos ambientais ou pequenas células leveduriformes secas que pode atingir tanto pessoas imunocomprometidas, como as que apresentam HIV, transplante de órgãos sólidos ou tiveram COVID-19, ocasionando meningoencefalite – a manifestação mais frequente e grave –, quanto imunocompetentes os quais desenvolvem, predominantemente, infecção pulmonar (do Carmo et al., 2022; Gushiken; Saharia; Baddley, 2021). O *C. neoformans* está associado a troncos de árvores e a excretas de pássaros, principalmente a fezes dos pombos, enquanto o *C. gattii* é frequentemente encontrado em árvores e plantas, com destaque a *Eucalyptus* spp. (Rathore et al., 2022; Francisco; de Jong; Hagen, 2021). Em 2023, Gomes e colaboradores realizaram uma publicação em que nosso grupo avaliou o potencial de IGI mitocondriais para diferenciar os genótipos dentro dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*. Dessa forma, já possuímos, em nosso laboratório, isolados fúngicos genotipados que variam quanto a abundância destes

íntrons, sendo agora necessária a comparação entre estes isolados quanto a sua capacidade de virulência.

Atualmente, a implementação do Princípio dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição do uso de animais) tem sido obrigatória durante as pesquisas (MacArthur Clark, 2017). Diante disso, estudos atuais têm utilizado modelos invertebrados como *Danio rerio*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*, que, além de se adequarem aos 3Rs, possuem facilidade de manutenção nos laboratórios, rápida e grande reprodução, e semelhanças com a fisiologia de mamíferos (Fusco-Almeida, 2023).

O coleoptera *T. molitor* apresenta uma resposta imune inata complexa que contém elementos celulares e humorais e que se assemelha à imunidade dos vertebrados (Petronio Petronio et al., 2022). Somando este fator à crescente quantidade de estudos com infecção fúngica e bacteriana devido à capacidade destes insetos suportarem temperaturas mais elevadas, chegando até 37°C (De Souza et al., 2015), nosso projeto utilizou-os, no estágio larval, como modelo de infecção experimental.

A hipótese testada é a de que isolados com menor número de IGI sejam mais virulentos por supostamente apresentarem maior produção de fatores de virulência devido a maior modulação da expressão de genes mitocondriais e a fusão mitocondrial (Chang; Doering, 2018). Dessa forma, esta pesquisa comparou a virulência de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* pobres e ricas em íntrons do grupo I nos genes mitocondriais em modelo alternativo *T. molitor* a partir da análise de sobrevivência das larvas infectadas e da recuperação de unidades formadoras de colônia.

Metodologia

FUNGOS A SEREM USADOS

Na micoteca de *Cryptococcus* do IMT, temos isolados pertencentes aos 4 genótipos de *C. neoformans* (VNI-VNIV) e aos 4 genótipos de *C. gattii* (VGI-VGIV). Para este plano de trabalho foram utilizados os seguintes isolados de cada genótipo: VNI – BT11 e BT12; VNII – HGT2 e CFP56; VNIII – FC4 (WM628) e CN117; VNIV – CFP58 e BT28; VGI – BT14 e CFP59; VGII – BT8 e FC6; VGIII – FC3 (WM161) e CFP61; VGIV – FC9 (WM779) e CFP62.

Eles podem ser divididos em dois grupos: rico em intron – o qual abrange os isolados FC6 e FC9 com 5 íntrons; BT8 com 6; BT28, CFP59 e CFP61 com 7 íntrons; FC4 e CFP58 com 9; e CN117 com 10 íntrons – e pobre em intron – que contém BT11 sem intron; BT14 com 1 intron; CFP62 com 3; e BT12 e CFP56 possuindo 4 íntrons.

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Sabouraud Chloramphenicol Dextrose Agar, da Kasvi, a 30°C para crescimento por 2 dias 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 (137 mM

NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4), centrifugado a 6000 xg, 4°C por 3 minutos. Após o sobrenadante ter sido descartado, foi adicionado mais 1000µL de PBS ao microtubo para ser homogeneizado com o pellet, esse processo foi repetido mais uma vez. As células leveduriformes, após lavadas e precipitadas, foram ressuspensas com 500µL de PBS. A viabilidade fúngica dos inóculos foi aferida microscópicamente com lactofenol azul algodão e apenas os inóculos com células viáveis foram selecionados para o experimento.

Para ajustar a concentração de células do inóculo para 2x10⁶ 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 [Concentração/uL = (A1+A2+A3+A4) x 2,5 x 200 (inverso da diluição)]. Por último, foi feito o cálculo final de ajuste utilizando a fórmula da diluição (C1 x V1 = C2 x V2), em que C1 corresponde ao valor encontrado no cálculo da Câmara de Neubauer, V1 à quantidade de inóculo inicial utilizada, C2 à concentração de células/µL objetivada (2x10⁵ para a concentração final 2x10⁶) e V2 ao volume final do inóculo final, 500uL. Neste caso, foi subtraído a quantidade de inóculo utilizada de 500 para saber o volume de PBS necessário para completar a amostra.

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, 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 37°C. Para os dezesseis isolados fúngicos, determinou-se a morte a partir da ausência de movimento na presença de estímulo físico, junto com a presença da melanização cuticular durante o período de dez dias. Além dos grupos teste, correspondente aos 16 isolados fúngicos, foi utilizado o grupo controle, o qual teve PBS inoculado e também foi incubado a 37°C (De Souza et al., 2015). 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 2x10⁶ células/µL, e incubadas por 24h a

37°C. 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, outras duas diluições foram realizadas: 1:10 e 1:100. Posteriormente, aplicou-se e semeou-se 20µL de cada diluição em 3 distintas placas de Petri com Sabouraud Chloramphenicol Dextrose Agar. Por fim, depois de 48h de incubação a 35°C (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 branca e/ou amarronzada e são, primariamente, percebidas macroscopicamente e confirmadas microscopicamente.

Este procedimento também foi realizado com o grupo de larvas de controle negativo, nas quais foi inoculado apenas PBS.

Resultados e Discussões

Após aplicar os dados da curva de sobrevivência (CS) no software GraphPad Prism 8, obtivemos o seguinte resultado para o genótipo VNI de *Cryptococcus neoformans*: o grupo de larvas de *T. molitor* que foi infectado com a cepa BT11, a qual não contém íntrons, apresentou 3 dias de sobrevivência, enquanto o grupo de larvas da cepa BT12, que possui 4 íntrons, teve em média 7 dias de sobrevivência (Figura 1).

Ainda sobre a espécie *C. neoformans*, o genótipo VNII, representado pelas cepas HGT2 (4 íntrons) e CFP56 (2 íntrons), obteve 7 dias de sobrevivência para a primeira e 6 dias para a segunda (Figura 2); o genótipo VNIII, ilustrado na figura 3, apresentou 4 dias de sobrevivência para o isolado FC4 (7 íntrons) e 5 dias para o isolado CN117 (10 íntrons); e, por último, no genótipo VNIV, as larvas inoculadas com a cepa CFP58, que apresenta 7 íntrons, sobreviveram 5 dias, enquanto as inoculadas com a cepa BT28 (4 íntrons) sobreviveram 4 dias (Figura 4).

Ademais, os resultados encontrados para a espécie *Cryptococcus gattii* foram: aproximadamente 7 dias de sobrevivência para as larvas infectadas com o isolado CFP59 (7 íntrons) e 4 dias para as infectadas com o isolado BT14 (1 íntron) no genótipo VGI (Figura 5); 5 dias de vida para os tenébrios inoculados com a cepa FC6 (1 íntron) e 4 dias para os inoculados com a cepa BT8 (3 íntrons) no genótipo VGII (Figura 6); e, no genótipo VGIII, os infectados com o isolado CFP61, o qual possui 5 íntrons, sobreviveram 8 dias em média e os infectados com o isolado FC3, que contém 4 íntrons, sobreviveram 4 dias (Figura 7). Por fim, as larvas do genótipo VGIV foram infectadas com duas cepas distintas, FC9 e CFP62, que possuem 3 íntrons e ambos grupos viveram por 6 dias (Figura 8).

O resultado da CS, realizada em triplicata, do grupo controle foi entre 40% e 50% de letalidade. Isso ocorreu porque mesmo o PBS sendo uma solução salina não causadora de danos às células e aos tecidos, o processo de inoculação com a seringa e a temperatura a qual foram incubadas (37°C) são situações estressantes que impactam a fisiologia desses animais.

Além dos gráficos desenvolvidos pelo método Kaplan-Meier, o teste log-rank aplicado às curvas de sobrevivência que comparam cada um dos 8 genótipos com o grupo de larvas controle, inoculadas com PBS, forneceu o valor de $P < 0,0001$, ou seja, apresentaram resultados significativos. Por outro lado, ao aplicar o teste log-rank na comparação apenas das cepas fúngicas de cada genótipo, todos apresentaram resultados significativos (valores de $P < 0,05$) com exceção do genótipo VGIV ($P = 0,0702$) que obteve o mesmo número de dias de sobrevivência para as larvas de ambas as cepas, além do número de mortes diárias semelhante, e do genótipo VNIII ($P = 0,0720$) que, apesar de apresentarem cepas com números de íntrons diferentes e 1 dia de diferença na sobrevivência dos grupos de larvas, tiveram o número de mortes diário também semelhante.

De acordo com a publicação de 2018 realizada por Chang e Doering, as mitocôndrias possuem a capacidade de se fundirem, formando uma morfologia tubular, e de compartilharem o proteoma mitocondrial a fim de aumentar a resistência ao estresse oxidativo causado pelo organismo hospedeiro a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém, é necessário que ocorra o processo de fissão depois dessa fusão mitocondrial para que a célula não perca potencial e não sofra apoptose. Ainda sobre essa publicação, Chang e Doering realizaram uma mutação na proteína Fzo1 – uma mitofusina primariamente estudada em *S. cerevisiae* que atua criando contato entre as mitocôndrias durante a fusão (Fritz et al., 2001) – em leveduras de *C. neoformans* e descobriram que deve haver um limite de fusão mitocondrial para que o patógeno resista aos ROS no organismo hospedeiro. Em caso de elevados níveis de fusão mitocondrial, o fungo tem dificuldade manter a sua viabilidade, de dividir o mtDNA e de realizar divisão celular para o seu crescimento, prejudicando a sua sobrevivência.

Ademais, em uma publicação de 2014, Voelz e parceiros pesquisaram sobre a virulência de *C. gattii* e obtiveram como resultado a produção de ROS pelos macrófagos dos organismos hospedeiros como o iniciador de uma grande tubularização mitocondrial em cepas de surto; além da “divisão de trabalho” entre as cepas de surto e as cepas de não surto. Ou seja, enquanto as primeiras atuam resistindo ao estresse oxidativo a partir da fusão mitocondrial, as últimas são responsáveis pela divisão celular e consequente crescimento fúngico no hospedeiro. Esse processo confirma a ideia de Chang e Doering de que há um tamanho limite de fusão de mitocôndrias para o patógeno conseguir o equilíbrio entre resistência e proliferação.

Assim, a partir dessa análise comparativa, concluímos que os resultados obtidos concordam com a hipótese desenvolvida de que isolados com menor número de íntrons são mais virulentos, visto que – com exceção do genótipo VGII, o qual teve a curva de sobrevivência do isolado BT8 (3 íntrons) menor que a CS do isolado FC6 (1 íntron), e do genótipo VGIV, o qual teve isolados com o mesmo número de íntrons sendo testados e os grupos de larvas com os dois inóculos sobrevivendo 6 dias – as cepas com menor número de íntrons, na comparação dentro de cada genótipo em ambas as espécies de *Cryptococcus*, causaram menor sobrevivência das larvas de *T. molitor*.

Quanto às recuperações das unidades formadoras de colônia (UFCs), os inóculos fúngicos produzidos com a concentração 2×10^6 células/ μL foram muito fortes para

as larvas causando a rápida morte de alguns grupos ou uma elevada sobreposição de colônias que interferiu na contagem; além disso, houve variação no número dessas colônias quando comparamos as cepas com mais e menos íntrons dentre e entre os genótipos, como é possível observar nas tabelas 1 e 2. Por outro lado, o experimento realizado com o grupo controle obteve sucesso, visto que não houve crescimento fúngico em nenhuma das três placas. Portanto, não utilizamos esse sistema como parâmetro para construir resultados sobre a virulência das cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* quanto ao número de íntrons do grupo I.

Finalmente, apesar de a espécie *Galleria mellonella* estar mais consolidada como modelo experimental de invertebrado na literatura científica devido à maior facilidade de inoculação por causa de seu maior tamanho e ao maior conhecimento sobre o seu sistema imune por ter sido objeto de estudo primariamente, a literatura mostra que o *Tenebrio molitor* teve um elevado crescimento no estudo da virulência de diversos fungos. 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*.

Os grupos de De Souza, em 2015 e 2018, e de Fusco-Almeida, em 2023, a partir da análise de curva de sobrevivência, dos tecidos infectados, dos hemócitos e da semelhança fisiológica com vertebrados, confirmaram o *T. molitor* como modelo propício para experimentos com bactérias e fungos patogênicos. Além destes fatores e da maior facilidade de criação desses animais em laboratório, o estudo sobre a semelhança da imunidade inata entre *T. molitor* e vertebrados é crescente. A resposta imune humoral destes besouros permitem a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) a partir da Via Toll (Petronio Petronio et al., 2022), cascata imunológica semelhante à Via dos receptores Toll-like presente nos seres humanos, e da Via Imd (Jang et al., 2022).

Devido à problemas – posteriores aos resultados compartilhados – nas colônias de *T. molitor*, não foi possível realizar o estudo dos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Dessa forma, após realizarmos uma padronização de concentração de células/μL com as cepas ATCCs H99 e R265, *C. neoformans* e *C. gattii* respectivamente, faremos o experimento descrito neste projeto novamente e adicionaremos o estudo dos AMPs, como já escrito para o projeto de pesquisa de Iniciação Científica do período 2025-2026.

Conclusão

Concluimos que o número de íntrons do grupo I influencia na virulência das cepas de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, de modo que as larvas infectadas com as cepas que contêm um maior número de IGI apresentaram uma curva de sobrevivência mais alongada. Ou seja, isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* com menos IGI em seus genes mitocondriais possuem maior virulência e causam mais letalidade em seus hospedeiros.

Contudo, apenas os resultados obtidos pela sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* foram considerados, tendo em vista a inconsistência dos resultados das UFCs devido à elevada concentração de células/ μL (2×10^6). Dessa forma, é necessário que haja a repetição do experimento com concentrações menores e de novos estudos que possam confirmar ou negar os resultados obtidos. Também é interessante realizar a análise dos genes mitocondriais, que contêm íntrons do grupo I, presentes em cada cepa e observar se é comum a presença de um mesmo gene no grupo mais virulento (com menos íntrons) e no grupo menos virulento (com mais íntron).

Outra conclusão obtida durante a realização da pesquisa é a de que o *T. molitor* é um modelo experimental de invertebrado promissor em virtude da prática manutenção da colônia no laboratório, da elevada taxa de reprodução, da fácil inoculação das substâncias em seu esternito, da constante e considerável taxa de sobrevivência dos grupos controles e da rápida e coerente resposta ao patógeno inoculado.

Referências

- CHANG, A. L.; DOERING, T. L. Maintenance of Mitochondrial Morphology in *Cryptococcus neoformans* Is Critical for Stress Resistance and Virulence. **mBio**, v. 9, n. 6, 21 dez. 2018.
- CORSARO, D.; VENDITTI, D. Putative group I introns in the eukaryote nuclear internal transcribed spacers. **Current genetics**, v. 66, n. 2, p. 373–384, 28 ago. 2019.
- DE SOUZA, P. C. 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.
- DE SOUZA, P. C. 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.
- DO CARMO, F. N. et al. *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1321–1337, 29 abr. 2022.
- FISHER, M. C.; DENNING, D. W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, 6 fev. 2023.
- FRANCISCO, E. C.; DE JONG, A. W.; HAGEN, F. Cryptococcosis and *Cryptococcus*. **Mycopathologia**, v. 186, n. 5, p. 729–731, 5 jul. 2021.
- FRITZ, S. et al. Connection of the Mitochondrial Outer and Inner Membranes by Fzo1 Is Critical for Organellar Fusion. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 4, p. 683–692, 12 fev. 2001.

FUSCO-ALMEIDA, A. M. et al. Alternative Non-Mammalian Animal and Cellular Methods for the Study of Host–Fungal Interactions. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 943, 1 set. 2023.

GOMES, R. M. O. D. S. et al. Distribution and Polymorphisms of Group I Introns in Mitochondrial Genes from *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 629–629, 30 maio 2023.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 493–514, 1 jun. 2021.

JANG, H. A. et al. Current Status of Immune Deficiency Pathway in *Tenebrio molitor* Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 4 jul. 2022.

LIU, T.; PYLE, A. M. Highly Reactive Group I Introns Ubiquitous in Pathogenic Fungi. **Journal of Molecular Biology**, v. 436, n. 8, p. 168513–168513, 5 mar. 2024.

MACARTHUR CLARK, J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. s1, p. S1–S7, 30 out. 2017.

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, n. 8, p. 1337–1354, 25 jun. 2020.

NIELSEN, H.; JOHANSEN, S. D. Group I introns: Moving in new directions. **RNA Biology**, v. 6, n. 4, p. 375–383, set. 2009.

PETRONIO PETRONIO, G. 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. 1983–1983, 7 out. 2022.

RATHORE, S. S. et al. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 166, p. 105521, maio 2022.

VOELZ, K. et al. “Division of labour” in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, 17 out. 2014.

Anexos

Figura 1- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VNI, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, BT11 é a cepa sem íntrons e BT12 é a cepa com 4 íntrons.

Figura 2- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VNII, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, HGT2 é a cepa com 4 íntrons e CFP56 é a cepa com 2 íntrons.

Figura 3- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VNIII, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, CN117 é a cepa com 10 íntrons e FC4 é a cepa com 7 íntrons.

Figura 4- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VNIV, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, CFP58 é a cepa com 7 íntrons e BT28 é a cepa com 4 íntrons.

Figura 5- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VGI, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, CFP59 é a cepa com 7 íntrons e BT14 é a cepa com 1 íntron.

Figura 6- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VGII, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, BT8 é a cepa com 3 íntrons e FC6 é a cepa com 1 íntron.

Figura 7- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VGIII, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, CFP61 é a cepa com 5 íntrons e FC3 é a cepa com 4 íntrons.

Figura 8- Gráfico de Kaplan-Meier com a curva de sobrevivência do genótipo VGIV, $P < 0,05$. PBS é grupo controle, tanto a cepa CFP62 quanto a cepa FC9 têm 3 íntrons.

Tabela 1- Dados completos (curva de sobrevivência + recuperação das unidades formadoras de colônia) dos 4 genótipos da espécie *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 2- Dados completos (curva de sobrevivência + recuperação das unidades formadoras de colônia) dos 4 genótipos da espécie *Cryptococcus gattii*.

CÓDIGO: SB1710

AUTOR: ANA LUIZA DE SOUSA DO AMARAL MONTEIRO

COAUTOR: RAFAEL MELO FERNANDES DE MIRANDA

COAUTOR: LUCIANO DE FREITAS BARROS NETO

ORIENTADOR: SERGIO MAIA QUEIROZ LIMA

TÍTULO: Ictiofauna Continental do estado do Rio Grande do Norte, Brasil:
Composição e riqueza.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo catalogar e quantificar a ictiofauna continental do estado do Rio

Grande do Norte, visando ampliar o conhecimento sobre a composição e a riqueza de espécies na

região. Considerando a escassez de informações disponíveis para o estado e a crescente pressão

antrópica sobre os ecossistemas aquáticos, o levantamento da fauna torna-se fundamental para subsidiar

ações de manejo e estratégias de conservação. Foram registradas as espécies presentes em diferentes

corpos d'água, permitindo a construção de um inventário atualizado que pode servir como base para

futuros estudos em ecologia, biogeografia e conservação da ictiofauna. Assim, este trabalho contribui

para a preservação da biodiversidade aquática local e reforça a importância de estudos regionais para a

manutenção dos recursos naturais

Palavras-chave: Ictiofauna continental; Riqueza de espécies; Inventário faunístico.

TITLE: Continental ichthyofauna of Rio Grande do Norte State, Brazil: Composition
na richness.

Abstract

This study aimed to catalog and quantify the continental ichthyofauna of Rio Grande do Norte State, in

order to expand the knowledge on species composition and richness in the region. Considering the scarcity of available information for the state and the increasing anthropogenic pressure on aquatic

ecosystems, this survey is fundamental to support management actions and conservation strategies. The

species recorded in different water bodies allowed the construction of an updated inventory that may

serve as a basis for future studies in ecology, biogeography, and ichthyofauna conservation. Thus, this

work contributes to the preservation of local aquatic biodiversity and reinforces the importance of

regional studies for the maintenance of natural resources.

Keywords: Continental ichthyofauna; Species richness; Faunistic inventory.

Introdução

A notável diversidade de peixes continentais do Brasil, uma das maiores do planeta, reflete a complexidade e a extensão de sua rede hidrográfica (Reis et al., 2003). No entanto, o conhecimento sobre a ictiofauna ainda é lacunar e fragmentado em diversas regiões do país, especialmente no semiárido brasileiro. O estado do Rio Grande do Norte, apesar de abrigar uma variedade de bacias hidrográficas e ambientes aquáticos continentais, carece de inventários abrangentes e atualizados que documentem a riqueza e a composição de suas espécies de peixes.

Embora existam estudos prévios relevantes, como o levantamento realizado por Nascimento et al. (2014), que apresenta objetivos semelhantes, as informações disponíveis para o estado ainda são pontuais e dispersas. Dessa forma, torna-se necessária a consolidação e a ampliação dos dados existentes, de modo a fornecer uma visão mais integrada da ictiofauna continental potiguar.

A ecologia de peixes em ambientes semiáridos, como rios, açudes e áreas estuarinas do Rio Grande do Norte, apresenta desafios particulares associados à irregularidade climática, à sazonalidade hídrica e à intensa pressão antrópica. Estudos em regiões adjacentes ressaltam a importância desse tipo de abordagem: no estado do Ceará, por exemplo, foram registradas 85 espécies de peixes distribuídas em 59 gêneros, 25 famílias e 8 ordens, evidenciando elevada riqueza mesmo sob condições de estresse hídrico (Gomes et al., 2025). No Rio Grande do Norte, investigações pontuais, como a de Leite et al. (2011), identificaram 51 espécies em diferentes bacias, com destaque para as ordens Characiformes e Perciformes, indicando a necessidade de estudos mais abrangentes.

O conhecimento detalhado da riqueza e da composição da ictiofauna é fundamental para a gestão sustentável dos recursos aquáticos e para a elaboração de políticas de conservação, especialmente em ambientes sujeitos a secas recorrentes, alterações hidrológicas e à introdução de espécies exóticas, como a tilápia (Barros, 2016; Rosa et al., 2012). Nesse

contexto, o presente estudo tem como objetivo analisar a riqueza e a composição da ictiofauna continental do estado do Rio Grande do Norte, com base em registros provenientes da coleção ictiológica da UFRN, organizados em banco de dados digital. Os resultados obtidos fornecem subsídios importantes para futuras ações de manejo, conservação e monitoramento da biodiversidade aquática no estado.

Metodologia

Como base para a pesquisa, foi utilizada a planilha contendo todos os registros de peixes previamente capturados e tombados, entre os anos de 2011 e 2025, sob a responsabilidade do professor Sérgio Maia

Queiroz Lima, do Laboratório de Ictiologia Sistemática e Evolutiva (LISE), da UFRN.

Inicialmente, realizou-se uma filtragem dos dados para selecionar apenas os peixes de água doce

coletados em bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Norte.

Em seguida, os dados foram organizados e analisados de acordo com os seguintes critérios:

- número de espécies por ordem;
- número de espécies por família;
- número de indivíduos por espécie;
- número de espécies por bacia hidrográfica.

Os materiais empregados no estudo foram:

- a planilha de registros da coleção;
- um computador para tratamento dos dados;
- o software Microsoft Excel, utilizado para a filtragem e organização das informações por meio

de seus filtros de pesquisa específicos.

Esse procedimento possibilitou a construção de um inventário da ictiofauna de água doce do estado

do Rio Grande do Norte, apresentando uma visão quantitativa e qualitativa da composição das

espécies registradas.

Resultados e Discussões

O estudo da ictiofauna de peixes continentais nas bacias hidrográficas do Rio Grande do Norte revelou uma expressiva variação tanto na riqueza de espécies quanto na abundância relativa entre os táxons e áreas amostradas. No total, foram registradas 120 espécies, evidenciando um padrão típico de inventários ictiofaunísticos, caracterizado pela coexistência de poucas espécies numericamente dominantes e um elevado número de espécies raras.

A composição específica foi marcada por espécies altamente abundantes, com destaque para *Sciades herzbergii* (4.778 indivíduos), *Plagioscion squamosissimus* (3.173), *Sciades parkeri* (1.198), *Astyanax bimaculatus* (928), *Hemigrammus aff. bimaculatus* (847), *Cichlasoma orientale* (690) e *Crenicichla menezesi* (638), que concentraram parcela expressiva dos registros. Essas espécies exercem papel central na estrutura das assembleias amostradas e refletem, em parte, sua ampla distribuição e elevada tolerância a diferentes condições

ambientais.

Um conjunto significativo de espécies apresentou abundâncias intermediárias, incluindo *Mugil curema* (390), *Microphis lineatus* (374), *Ctenobrycon spilurus* (302), *Hypostomus pusalum* (299), *Characidium bimaculatum* (263), *Hippocampus reidi* (259), *Dormitator maculatus* (245), *Hyphessobrycon* sp. (240), *Serrapinnus heterodon* (231), *Pomadasy crocro* (227), *Hoplosternum littorale* (206), *Mycteroperca bonaci* (187), *Kryptolebias hermaphroditus* (169), *Parotocinclus spilosoma* (162), *Psectrogaster saguiru* (162) e *Hemiramphus brasiliensis* (158). Esse grupo reflete padrões ecológicos variados e a influência de diferentes ambientes amostrados, incluindo trechos fluviais, áreas estuarinas e corpos d'água com distintos níveis de conectividade.

Em contraste, a maioria das espécies apresentou baixa abundância, com menos de 150 indivíduos registrados. Entre essas, destacam-se *Triportheus signatus* (76), *Ctenogobius shufeldti* (75), *Guavina guavina* (94), *Atherinella brasiliensis* (95), *Serrapinnus potiguar* (24), *Microphis* sp. (122) e *Sphoeroides testudineus* (149), além de diversas espécies raras representadas por um ou poucos exemplares, como *Acanthurus chirurgus*, *Astronotus ocellatus*, *Bathygobius soporator*, *Elops saurus*, *Metynnis metynnis*, *Moenkhausia dichroua*, *Synbranchus marmoratus* e *Serrasalmus rhombeus*. Esse padrão pode estar associado tanto a características ecológicas intrínsecas das espécies quanto a diferenças no esforço amostral entre as bacias hidrográficas.

Em relação à distribuição espacial da riqueza, os dados indicam que as bacias dos rios Ceará-Mirim e Apodi-Mossoró apresentaram os maiores valores, com 37 e 35 espécies, respectivamente. Essa elevada diversidade pode estar relacionada à maior extensão territorial dessas bacias, à heterogeneidade de habitats disponíveis e, possivelmente, a um maior esforço amostral. Em contraste, as bacias de Maxaranguape (5 espécies) e Boqueirão (9 espécies) apresentaram as menores riquezas, o que pode refletir menor número de coletas, menor diversidade de habitats ou ainda processos de degradação ambiental.

A análise da composição taxonômica, apresentada nos Gráficos 1 e 2, referentes ao número de espécies por ordem e por família, revelou a notável dominância da ordem Characiformes, que representou mais de 30 espécies do total registrado. Essa predominância foi impulsionada principalmente pela família Characidae, com cerca de 15 espécies, sendo a mais representativa entre as famílias amostradas. Esse padrão é consistente com o observado em ecossistemas de água doce da região Neotropical, onde caracídeos, ciclídeos e siluriformes figuram entre os grupos mais abundantes e diversificados.

As ordens Gobiiformes, com aproximadamente 12 espécies, e Siluriformes, com cerca de 10 espécies, também se destacaram na composição da ictiofauna potiguar, reforçando a importância desses grupos para a diversidade regional. A presença de diferentes ordens e famílias distribuídas entre as bacias indica que, embora a ordem Characiformes seja dominante, a estrutura das comunidades de peixes é fortemente influenciada por fatores locais, como qualidade da água, conectividade entre ambientes aquáticos e intensidade do esforço amostral. Dessa forma, a variação observada na riqueza e na abundância das espécies aponta para a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre os fatores ambientais e históricos que moldam a diversidade ictiofaunística no estado do Rio Grande do Norte.

Conclusão

A análise da ictiofauna de peixes continentais nas bacias hidrográficas do Rio Grande do Norte evidenciou uma expressiva heterogeneidade na riqueza, abundância e composição taxonômica das espécies, refletindo tanto características ambientais quanto diferenças no esforço amostral entre as áreas estudadas. O registro de 120 espécies reforça a elevada

diversidade ictiofaunística do estado e revela um padrão típico de inventários biológicos, marcado pela coexistência de poucas espécies numericamente dominantes e um grande contingente de espécies raras.

A distribuição espacial da riqueza mostrou-se desigual entre as bacias, com destaque para Ceará-Mirim e Apodi-Mossoró, que concentraram os maiores valores de diversidade. Esses resultados sugerem a influência de fatores como maior extensão territorial, maior heterogeneidade de habitats e maior intensidade de amostragem, especialmente em áreas estuarinas. Em contraste, bacias como Maxaranguape e Boqueirão apresentaram menor riqueza, o que pode estar associado a limitações amostrais, menor diversidade ambiental e possíveis impactos antrópicos, indicando a necessidade de atenção em futuros levantamentos e ações de conservação.

Do ponto de vista taxonômico, a predominância da ordem Characiformes, especialmente da família Characidae, segue o padrão observado em ecossistemas de água doce da região Neotropical, enquanto as contribuições relevantes de Gobiiformes e Siluriformes reforçam a complexidade estrutural das assembleias de peixes no estado. A variação na composição das comunidades entre as bacias evidencia que fatores locais, como conectividade hidrológica e qualidade ambiental, desempenham papel fundamental na organização da ictiofauna. Dessa forma, os resultados apresentados fornecem uma base consistente para o entendimento da diversidade e da distribuição dos peixes continentais no Rio Grande do Norte, contribuindo para o planejamento de estratégias de manejo, conservação e monitoramento da ictiofauna. Além disso, ressaltam a importância de estudos contínuos e padronizados, capazes de reduzir lacunas de conhecimento e subsidiar ações voltadas à proteção dos ecossistemas aquáticos e de sua biodiversidade associada.

Referências

- BARROS, N. H. C. Estudos sobre as táticas e as estratégias reprodutivas de sete espécies de peixes de água doce do Rio Grande do Norte, Brasil. *Holos*, Natal, v. 4, p. 19-33, 2016.
- GOMES, M. C. F. et al. Conservation status of the freshwater fish species from Ceará State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, Maringá, v. 23, n. 2, e240084, 2025.
- LEITE, T. S. et al. Composição da Ictiofauna das Bacias Hidrográficas do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, v. 3, n. 2, p. 112-125, 2011.
- NASCIMENTO, Wallace Silva do; BARROS, Nirlei Hirachy Costa; ARAÚJO, Andréa Soares de; GURGEL, Liliane de Lima; CANAN, Bhaskara; MOLINA, Wagner Franco; ROSA, Ricardo S.; CHELLAPPA, Sathyabama. Composição da ictiofauna das bacias hidrográficas do Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amazônia*, Macapá, v. 4, n. 4, p. 161-170, 2012.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (Org.). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- ROSA, F. S.; LIMA, S. M. Q.; VIEIRA, M. F. A. Diversidade de peixes em poças de um rio intermitente do semiárido paraibano, Brasil. *Biotemas*, Florianópolis, v. 25, n. 3, p. 161-170, 2012.

Anexos

Gráfico 1- Quantidade de espécies por ordem. Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 2-Quantidade de espécies por família. Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 3- Quantidade de espécies por Bacia hidrográfica. Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 4- Riqueza de espécies por Bacias Hidrográficas. Fonte: Elaborado pelo co-autor.

CÓDIGO: SB1727

AUTOR: ISABELLA DE SOUZA PIRES

COAUTOR: CAIO RODRIGUES MAIA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Análise histológica da presença de sinoviócitos no desenvolvimento da membrana sinovial da ATM em ratos.

Resumo

O objetivo deste estudo foi realizar análises morfológicas, histomorfométricas, imuno-histoquímicas e de imunofluorescência para caracterizar o processo de desenvolvimento da membrana sinovial em articulações temporomandibulares e em articulações de ossos longos de ratos. Este estudo experimental in vitro foi realizado por meio de eutanásia induzida por administração intraperitoneal de Xilazina e Cetamina, seguida de decapitação com secção sagital da cabeça e posterior isolamento da região da articulação temporomandibular (ATM). Lâminas histológicas foram posteriormente preparadas para permitir a visualização das células-alvo em microscopia óptica, possibilitando assim a caracterização histopatológica dos sinoviócitos na articulação temporomandibular.

Palavras-chave: Análise histológica; Articulação temporomandibular; Sinoviócitos

TITLE: Histological analysis of the presence of synoviocytes in the development of the TMJ synovial membrane in rats.

Abstract

The aim of this study was to conduct morphological, histomorphometric, immunohistochemical, and immunofluorescence analyses to characterize the developmental process of the synovial membrane in temporomandibular joints and in long bone joints of rats. This experimental in vitro study was carried out through euthanasia induced by intraperitoneal administration of Xylazine and Ketamine, followed by decapitation with sagittal sectioning of the head and subsequent isolation of the temporomandibular joint (TMJ) region. Histological slides were subsequently prepared to allow visualization of the target cells under light microscopy, thereby enabling the histopathological characterization of synoviocytes in the temporomandibular joint.

Keywords: Histological analysis; Temporomandibular joint; Synoviocytes

Introdução

A complexidade de formação da membrana sinovial presente na articulação temporomandibular (ATM) e nas demais articulações sinoviais do corpo, demandam estudos pormenorizados para auxiliar no entendimento dos seus mecanismos de desenvolvimento. Desta forma a análise morfológica de biomarcadores que atuam tanto em processos fisiológicos quanto patológicos são essenciais, além da necessidade de criteriosa análise morfológica, ajudando a entender não só a formação como também a gênese de possíveis

alterações patológicas que podem acometer essa região tão nobre do corpo humano. Diante disso, realizaremos esse estudo utilizando ratos da linhagem Wistar que é uma cobaia que possui muita similaridade com o processo de desenvolvimento humano, analisando diferentes etapas de desenvolvimento pós-natal. Diante do exposto, o objetivo do presente projeto está sendo analisar uma análise morfológica, histomorfométrica, imuno-histoquímica e de imunofluorescência do processo evolutivo da membrana sinovial nas ATMs e nas articulações de ossos longos em ratos. Espera-se que os achados do presente projeto possam contribuir para a melhoria nas condutas de diferentes especialidades da saúde que necessitam desse complexo conhecimento para implementação de novas técnicas, objetivando um tratamento mais promissor e eficiente para os pacientes acometidos por distúrbios nas articulações sinoviais.

Metodologia

Caracterização do estudo e aspectos éticos: Esta pesquisa consiste em uma análise descritiva e quantitativa da presença dos sinoviócitos no processo de desenvolvimento da Articulação Temporomandibular em ratos. O protocolo experimental foi submetido a análise da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sendo aprovado com número de protocolo 009/2024 e certificado N° 305.038/2022. Amostra: Serão utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 50-250 g, oriundos do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais serão alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, onde ficarão 10 ratos por gaiola pesando até 100g com 4 semanas de vida (Aproximadamente 139,4cm² para cada animal), 5 ratos por gaiola (2 gaiolas) com 6 semanas de vida 100-200g – Aproximadamente 278,8cm² para cada animal), 5 ratos por gaiola (2 gaiolas) com 8 semanas de vida, pesando 200-250g (Aproximadamente 278,8 cm² para cada animal), submetidos a condições controladas de temperatura (24±2 °C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro) e receberão ração e água ad libitum. O peso de cada animal será aferido a cada 7 dias, o consumo de água e ração por gaiola foi averiguado todos os dias ao longo das 8 semanas experimentais. No que diz respeito ao Grupo 1 (G1) com 2 semanas de vida, os ratos (n=10) serão retirados da mãe, logo em seguida pesados e eutanasiados, não havendo a necessidade de desmame, tão pouco a mensuração do consumo alimentar e ingestão hídrica por estarem em fase de lactação, serão alojados em gaiola apenas para o transporte dos animais. Nos demais grupos (G2, G3 e G4) será aferido a cada 7 dias, o consumo de água e ração por gaiola todos os dias ao longo das 8 semanas experimentais. O protocolo experimental será submetido a análise da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). A amostra será constituída por 40 ratos Wistar machos adultos, sendo 10 ratos (machos) constituindo o grupo 1 (G1) apresentando 2 semanas de vida, o grupo 2 (G2) com 4 semanas de vida (n:10; machos), o grupo 3 (G3) apresentando 6 semanas de vida (n:10; machos) e o grupo 4 (G4) exibindo 8 semanas de vida (n:10; machos), após esse período os ratos serão sacrificados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% (0,3ml/100g), e as mandíbulas serão devidamente coletadas e imersas em formaldeído a 10%, descalcificados em ácido fosfórico até ser verificada a flexibilidade óssea, através da inserção de um alfinete para serem posteriormente emblocados em parafina e cortados em micrótomo para a análise histológica, histomorfométrica e imuno-histoquímica. Protocolo: Eutanásia com injeção intraperitoneal (Xilazina + Ketamina); 2. Decapitação dos ratos; 3. Secção sagital da cabeça do rato; 4. Destaque da área de interesse da pesquisa (ATM); 5. Confecção das lâminas

histológicas e utilização de microscopia de luz; 6. Análise histopatológica dos sinoviócitos da articulação temporomandibular. Estudo Histoquímico pela Hematoxilina-Eosina (HE): Serão obtidos cortes de 5 µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro e coradas utilizando a coloração de rotina (Hematoxilina-Eosina) para a observação das características morfológicas das etapas de desenvolvimento da membrana sinovial (2ª a 8ª semana de vida) mais especificamente no que tange a análise dos sinoviócitos e camadas da membrana sinovial (Figura 2). Análise Estatística: Os resultados obtidos serão submetidos a testes estatísticos apropriados, com o objetivo de testar as hipóteses aventadas no presente estudo. Os dados serão digitados originalmente na planilha eletrônica Excel (Microsoft Windows XP Home edition®) e posteriormente exportados para o formato DBF (Data Base Format), para poderem ser lidos pelo programa GraphPad InStat (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95®, GraphPad Software, San Diego, Califórnia-USA), onde serão feitas as análises.

Resultados e Discussões

O presente trabalho pertencente ao Edital N° 03/2024 - INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Cota: 2024-2025 (PIBIC) teve início em 08 de abril de 2025, desta forma não houve tempo para a execução do trabalho pelo curto espaço de tempo. Diante disso, fui informado pela PROGRAD-UFRN que a discente deveria enviar um relatório, ainda que não fosse o final para concluir o presente plano de trabalho e após a conclusão deste enviar um novo plano com o mesmo assunto para que o mesmo seja executado no período (2025-2026). Informo que no momento, estamos na fase de análise de lâminas descritiva e quantitativa.

Conclusão

O presente trabalho pertencente ao Edital N° 03/2024 - INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Cota: 2024-2025 (PIBIC) teve início em 08 de abril de 2025, desta forma não houve tempo para a execução do trabalho pelo curto espaço de tempo. Diante disso, fui informado pela PROGRAD-UFRN que a discente deveria enviar um relatório, ainda que não fosse o final para concluir o presente plano de trabalho e após a conclusão deste enviar um novo plano com o mesmo assunto para que o mesmo seja executado no período (2025-2026). Informo que no momento, estamos na fase de análise de lâminas descritiva e quantitativa.

Referências

1. Carvalho de Moraes LO, Tedesco RC, Arráez-Aybar LA, Klein O, Mérida-Velasco JR, Alonso LG. Development of synovial membrane in the temporomandibular joint of the human fetus. *Eur J Histochem*. 2015;59(4):2569.
2. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA, et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):864–70.
3. Knab K, Chambers D, Krönke G. Synovial Macrophage and Fibroblast Heterogeneity in Joint Homeostasis and Inflammation. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Apr 25;9:862161.
4. Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J*. 2011 Dec 30;5:100–6.
5. Bustamante, MF, Garcia-Carbonell, R., Whisenant, KD et al. Metabolismo de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos na patogênese da artrite reumatoide. *Arthritis Res Ther* 19, 110 (2017).
6. Izumi, S., Takeya, M., Takagi, K. et al. Ontogenetic development of synovial A cells in fetal and neonatal rat knee joints. *Cell Tissue*

Res 262, 1–8 (1990). 7. A. Westermarck, C. Leiggener, Aagaard E, Lindskog S. Histological findings in soft tissues around temporomandibular joint prostheses after up to eight years of function. *International journal of oral and maxillofacial surgery/International journal of oral & maxillofacial surgery*. 2011 Jan 1;40(1):18–25. 8. Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T. Presence of HLA-DR antigen on synovial type A and B cells: an immunoelectron microscopic study in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and normal traumatic joints. *Immunology*. 1983 Dec;50(4):587-94. 9. Matsubara T, Spycher MA, Rüttner JR, Fehr K. The ultrastructural localization of fibronectin in the lining layer of rheumatoid arthritis synovium: the synthesis of fibronectin by type B lining cells. *Rheumatol Int*. 1983;3(2):75-9. 10. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol*. 2000 Mar;63(1):17-31. 11. de Sousa EB, Casado PL, Moura Neto V, Duarte ME, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Oct 3;5(5):112. 12. El-Hakim IE, Elyamani AO. Preliminary evaluation of histological changes found in a mechanical arthropathic temporomandibular joint (TMJ) exposed to an intra-articular Hyaluronic acid (HA) injection, in a rat model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery [Internet]*. 2011 Jan 8;39(8):610–4. 13. S.R. Figueroba, Desjardins MP, Nani BD, Ferreira LEN, Rossi AC, Santos FA, et al. Effect of diazepam on temporomandibular joints in rats with increased occlusal vertical dimension. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery [Internet]*. 2014 Mar 15;52(5):438–44. 14. Ogura N, Satoh K, Akutsu M, et al. MCP-1 Production in Temporomandibular Joint Inflammation. *Journal of Dental Research*. 2010;89(10):1117-1122. 15. Zhu, H., Hu, Y., Wang, C. et al. CircGCM1L1 promotes synoviocyte proliferation and chondrocyte apoptosis by targeting miR-330-3p and TNF- α in TMJ osteoarthritis. *Cell Death Dis* 11, 284 (2020). 16. Kim, H., Lee, BK. Anti-Inflammatory Effect of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction on Osteoarthritic Temporomandibular Joint Synoviocytes. *Tissue Eng Regen Med* 17, 351–362 (2020). 17. Chaves HV, de R, Mattos A, Alfredo A, Gomes AS, Vale ML, et al. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. *BioMed Research International*. 2011 Jan 1;2011. 18. Fan, L., Wang, Q., Liu, R. et al. Citrullinated fibronectin inhibits apoptosis and promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14, R266 (2012). 19. Xin Y, Wang W, Mao E, Yang H, Li S. Targeting NLRP3 Inflammasome Alleviates Synovitis by Reducing Pyroptosis in Rats with Experimental Temporomandibular Joint Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*. 2022 Nov 23;2022:1–13.

Anexos

Figura 1. 1. Eutanásia com injeção intraperitoneal (Xilazina + Ketamina); 2. Decapitação dos ratos; 3. Secção sagital da cabeça do rato; 4. Destaque da área de interesse da pesquisa (ATM); 5. Confeção das lâminas histológicas e utilização de microscopia

Figura 2. Fotomicrografia de parte da articulação temporomandibular com ênfase na membrana sinovial. Na área destacada está sendo realizada a análise histológica dos sinoviócitos, bem como sua quantificação (Hematoxilina-Eosina, Objetiva de 10x).

CÓDIGO: SB1751

AUTOR: ALEXANDER SAYD CHASIN

ORIENTADOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

TÍTULO: Padrões espaciais e temporais da pesquisa fenológica da caatinga.

Resumo

A Caatinga é um bioma semiárido e sazonal do nordeste brasileiro, caracterizado por uma estação seca pronunciada e sincronia de atividades vegetais estimulada pela disponibilidade hídrica durante a curta estação chuvosa. Este bioma contém plantas com adaptações para sobrevivência nessas condições, tais como queda foliar e sincronia fenológica. Esta revisão analisou 217 artigos encontrados no Web of Science sobre fenologia da Caatinga, com o objetivo de criar uma síntese deste conhecimento. Foi observado que existe um crescimento linear de publicações, com pico em 2022, com a maioria dos estudos sendo de observação direta, focando no nível populacional e sendo concentrados nos estados de Pernambuco e Bahia. A queda foliar ocorre durante a estação seca, enquanto brotamento foliar, floração e frutificação predominam na estação chuvosa. Existe uma concentração de estudos próximos de grandes centros de pesquisa mais desenvolvidos e um conservadorismo nos métodos de amostragem, o que mostra uma lacuna no conhecimento do bioma, que pode ser aprimorado através da adoção de métodos modernos como o sensoriamento remoto, seja via câmeras ou dados de satélites.

Palavras-chave: fenologia, caatinga, sazonalidade, sensoriamento quase remoto

TITLE: SPATIAL AND TEMPORAL PATTERNS OF THE PHENOLOGICAL RESEARCH ON CAATINGA

Abstract

The Caatinga is a seasonal semiarid biome of the Brazilian northeast, characterized by a pronounced dry season and synchronization in vegetative activities stimulated by water availability during the short wet season. This biome has plants with adaptations to survive this conditions, like leaf fall and phenology synchronization. This revision analyzed 217 articles found on Web of Science about Caatinga phenology, with the goal of creating a synthesis of this knowledge. A linear growth in publications was observed, peaking in 2022, with most studies being direct observation, focusing on the population level, and concentrated in the states of Pernambuco and Bahia. Leaf fall occurs during the dry season, while leaf budding, flowering, and fruiting predominate in the rainy season. Studies are concentrated near large, more developed research centers, and sampling methods are conservative, demonstrating a gap in knowledge of the biome. This gap can be improved through the adoption of modern methods such as remote sensing, whether via cameras or satellite data.

Keywords: phenology, caatinga, seasonality, near remote sensing

Introdução

Caatinga é uma floresta tropical seca sazonal encontrada no nordeste do Brasil, marcada por uma curta estação chuvosa onde há aumento de precipitação, e uma estação de seca onde ocorrem poucas ou nenhuma chuva e altas temperaturas. O nível de sazonalidade e a forma na qual o clima varia ao longo do ano influencia as respostas fenológicas (Staggemeier et al. 2020). A menor disponibilidade hídrica nesse ecossistema permitiu que as plantas da região desenvolvessem uma miríade de adaptações para sobreviverem ao longo período de seca, como a sincronia de fenofases e queda foliar (Lima, 2019).

Nesse projeto, foi revisada a literatura sobre a fenologia da Caatinga, utilizando o método PRISMA (O'DEA et al., 2021), onde informações sobre padrões vegetativos e reprodutivos das plantas desse bioma foram coletadas e analisadas com o objetivo de produzir uma síntese desse conhecimento e a identificação de lacunas de pesquisa.

Metodologia

A base de dados online do Web of Science foi utilizada para encontrar artigos que pudessem ter informações sobre a fenologia da Caatinga, através de uma combinação de palavras-chave. Essas palavras podem ser caracterizadas em 5 categorias relacionadas à fenologia e à Caatinga: fases fenológicas, sucesso reprodutivo, localização geográfica, tipo de vegetação e clima. Todas as palavras chave empregadas encontram-se listadas na Tabela A1. A busca com estes critérios resultou em 16931 artigos com possibilidade de terem informações de interesse, e então foram triados com o objetivo de encontrar os artigos com aderência ao tema de pesquisa. A triagem consistiu na leitura do título e resumo dos artigos, que estavam arranjados em uma larga tabela com essas informações. Para considerar a pertinência de um estudo, utilizou-se 3 critérios de exclusão: ser fora do tema, fora do Brasil ou no Brasil, mas fora do bioma. A busca de artigos ocorreu na iniciação científica passada 2023-2024 resultando em 522 artigos com potencial pertinência e nesta foquei em analisar os artigos triados. Após a leitura destes artigos, 298 estudos foram excluídos por não terem informações de interesse, enquanto 7 foram retirados por estarem repetidos na base de dados. 217 artigos completos foram pertinentes ao tema e seus dados coletados e tabulados. A partir da leitura completa dos artigos triados, informações de caráter fenológico, ano, localização, método de amostragem, tipo e duração de estudo foram colocadas em uma planilha no excel. Após a consolidação do banco de dados, estatísticas sumárias descritivas e gráficos foram produzidos para identificar tendências espaciais e temporais. Os dados de quantidade de estudos por estado, tipo e duração de estudo, e tipo de amostragem foram organizadas em tabelas, enquanto os anos de publicação de cada artigo foram colocados em gráfico. Para melhor visualização, informações relacionadas à localização também foram trabalhadas no programa QGIS para a criação de mapas e de um cartograma. Esses resultados foram utilizados na confecção de um pôster, apresentado no congresso internacional de fenologia (PHENO 2025; <https://pheno2025.com/>).

Resultados e Discussões

As análises dos 217 artigos mostram um crescimento linear da quantidade de artigos publicados desde o início do século, com um pico de publicações ocorrendo no ano de 2022 (Figura 1) Esse crescimento progressivo mostra a consolidação da fenologia como um campo de estudo, e com um interesse pela área aumentando.

A maior parte dos estudos foram observacionais, com um total de 184 artigos desse tipo, enquanto 18 foram descrições de espécies que continham informações fenológicas, 13 foram de experimentos de laboratório e 2 foram estudos de caso. (Tabela A3). Ainda avaliando métodos de amostragem, 201 estudos fizeram observações diretas, para coletar dados in situ, 6 obtiveram informações fenológicas de coleções biológicas, 5 usaram sensoriamento remoto, 4 usaram satélites e 1 artigo não forneceu essa informação (Tabela A4). As observações diretas são um método popular, mas que devido a baixa frequência temporal e a dependência de interpretação do indivíduo que observa, pode acarretar em deficiências (Santos 2025). Métodos mais recentes de obtenção de dados fenológicos ainda têm sido pouco utilizados na Caatinga.

Quando se trata do tempo de duração do estudo, 132 artigos deram essa informação. Desses, 50% deles ocorreram em até 12 meses, enquanto 30% ocorreram entre 13 a 24 meses (Tabela A5). Mais da metade dos trabalhos fizeram uma amostragem de apenas uma espécie, sendo 58% dos estudos, enquanto os que procuraram focar em comunidade (>40 spp) foram de 12%, salientando a escassez de estudos que monitorem a resposta de comunidades na Caatinga.

A distribuição espacial dos estudos foi desigual, sendo o estado mais estudado Pernambuco, com 73 artigos publicados, seguido por Bahia (55), Paraíba (38), Rio Grande do Norte (21), Ceará (14), Sergipe (9), Minas Gerais (8), Piauí (5) e Alagoas (2), com 12 artigos não informando a localidade geográfica onde o dado foi obtido (Tabela A2). A partir disso, pode-se afirmar que existe uma desigualdade na distribuição de estudos pelo bioma (Figuras 2 e 3), com uma concentração acontecendo próximo de centros de pesquisa mais desenvolvidos.

Em relação aos ritmos fenológicos da Caatinga, foi visto que, do total de estudos, 69% deles trabalharam com fenologia reprodutiva, 11% trabalharam com fenologia vegetativa e 20% com ambos. A maioria das plantas tem pico de queda foliar durante a estação seca, como ocorre em 86% de 42 estudos. Enquanto isso, o pico de brotamento foliar ocorre durante a estação de chuva, visto em 89% dos 38 estudos, com a brotação de folhas ocorrendo assim que as primeiras chuvas da estação começam (Lima, 2018). Já a floração e frutificação aconteceram durante ambas as estações, mas demonstrando uma predominância na estação de chuva para os dois, com a floração ocorrendo no início da estação e a frutificação no final (Machado 1997). 52% de 73 estudos afirmam que a floração ocorre nessa mesma época, e 65% de 60 estudos dizem que a frutificação também ocorre durante a estação mencionada.

Conclusão

A evolução desse conhecimento revela o estabelecimento de centros de pesquisa desenvolvidos, principalmente nos estados de Pernambuco e Bahia, com outras regiões, como Sergipe, Alagoas, Minas Gerais e Piauí, precisando de mais pesquisas a serem feitas em seus territórios. Considerando as estações marcadas dessa região e os padrões decíduos observados, nota-se que o sensoriamento quase remoto pode ser um método mais explorado

no futuro, integrando ciência de ponta para ter uma melhor aprendizagem sobre a fenologia dessa região de grande biodiversidade.

Referências

- LIMA, Amanda de Araújo. Sazonalidade e condições de estresse sobre o comportamento fisiológico de espécies lenhosas da caatinga em ambiente natural e controlado. 2019. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Florestais, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/8216/2/Amanda%20de%20Araujo%20Lima.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- LIMA, Cosmo Rufino de. PHENOLOGY OF *Poincianella pyramidalis* (TUL.) L. P. QUEIROZ AND ITS RELATIONSHIP WITH THE TEMPORAL DISTRIBUTION OF RAINFALL IN THE BRAZILIAN SEMI-ARID REGION. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 8, n. 3, p. 1035-1048, jul. 2018.
- MACHADO, Isabel C. S.; BARROS, Luiz M.; SAMPAIO, Everardo V. S. B. Phenology of Caatinga Species at Serra Talhada, PE, Northeastern Brazil. *Biotropica*, Recife, v. 29, n. 1, p. 57-68, 1997.
- SANTOS, Maria Maraíza Pereira dos. Integrating approaches and methodologies into phenological research in Neotropical dry forests: a systematic review. 2025. *Environmental Research Letters*, v. 20, n. 8, p. 083002, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ade9e2>.
- SPINELLI-ARAUJO, Luciana. Conservação da Biodiversidade do Estado do Maranhão: Cenário Atual em Dados Geoespaciais. Jaguaríuna: Embrapa Meio Ambiente, 2016.
- 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.

Anexos

Figura 1. Gráfico de número de publicações sobre fenologia da Caatinga entre 1997 e 2023

Figura 2. Mapa distorcido de distribuição de estudos por estado

Figura 3. Mapa de distribuição geográfica dos estudos

Tabela A1. Palavras-chave usadas na base de dados do Web of Science

Tabela A2. Distribuição de estudo por estado

Tabela A3. Distribuição de estudo por tipo de abordagem

Tabela A4. Métodos de amostragem utilizados

Tabela A5. Tempo de duração de estudos em meses

CÓDIGO: SB1768

AUTOR: FELIPE DA SILVA DANTAS

ORIENTADOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

TÍTULO: Fenologia de *Eugenia astringens* (Myrtaceae) na Mata Atlântica com base em dados de herbário

Resumo

A *Eugenia astringens* (Myrtaceae) é uma espécie característica das restingas da Mata Atlântica, ocorrendo de Santa Catarina ao Rio Grande do Norte. Com o objetivo de caracterizar a fenologia reprodutiva desta espécie, analisamos 599 registros de sua ocorrência tombados em coleções de história natural (herbários). Após análise inicial, a qual avaliou a confiabilidade da identificação taxonômica dos registros, disponibilidade de coordenadas geográficas precisas e a eliminação de registros duplicados, 267 registros foram selecionados para análise, com mais da metade dos registros analisados coletados nos estados da Bahia (30%) e Espírito Santo (23%). Botões florais e flores abertas foram encontrados simultaneamente nas exsicatas, indicando sincronia entre as fenofases, e o período de ocorrência mais concentrado em março. Frutos imaturos estiveram mais representados em junho e maduros em julho, sugerindo um ciclo sazonal para todas as fenofases. A comparação com dados de campo, encontrados na literatura, indica que os picos foram similares, o que corrobora com o uso de dados de herbário na descrição fenológica de espécies vegetais. Conclui-se que herbários digitais são ferramentas relevantes para estudos fenológicos de longo prazo. Análises futuras irão explorar tendências latitudinais nos padrões encontrados, e tendências temporais, a fim de verificar a ocorrência de antecipação ou atraso na fenologia para as duas regiões melhor amostradas: Bahia e Espírito Santo.

Palavras-chave: *Eugenia astringens*; Fenologia; Herbário.

TITLE: Phenology of *Eugenia astringens* (Myrtaceae) in the Atlantic Forest based on herbarium data

Abstract

Eugenia astringens (Myrtaceae) is a species characteristic of the Atlantic Forest restingas, occurring from Santa Catarina to Rio Grande do Norte. To characterize the reproductive phenology of this species, we analyzed 599 records of its occurrence registered in natural history collections (herbariums). After an initial analysis, which assessed the reliability of the records' taxonomic identification, the availability of precise geographic coordinates, and the elimination of duplicate records, 267 records were selected for analysis, with more than half of the analyzed records collected in the states of Bahia (30%) and Espírito Santo (23%). Flower buds and open flowers were found simultaneously in the exsiccata, indicating synchrony between phenophases, and the period of occurrence was most concentrated in March. Immature fruits were more prevalent in June and mature fruits in July, suggesting a

seasonal cycle for all phenophases. Comparison with field data found in the literature indicates that the peaks were similar, which corroborates the use of herbarium data in the phenological description of plant species. We conclude that digital herbaria are relevant tools for long-term phenological studies. Future analyses will explore latitudinal trends in the patterns found, as well as temporal trends, to determine whether phenology is earlier or later for the two best-sampled regions: Bahia and Espírito Santo.

Keywords: *Eugenia astringens*; Phenology; Herbarium.

Introdução

A *Eugenia astringens* Cambess é uma espécie pertencente à subtribo Eugeniinae da família Myrtaceae, seção Umbellatae, inicialmente descrita por Jacobo Cambessedes, na qual foi coletada com os frutos maduros em setembro, apresentando como descrição inicial: “Arbusto fruticoso; ramos glabros; folhas pecioladas, oblongo-elípticas, obsoletamente acuminadas; pontuadas de pontos translúcidos, glabras; pedúnculos solitários ou frequentemente geminados, curtos, glabros; lóbulos do cálice sub-arredondados, ciliolados; fruto ovóide, glabro, brilhante.”, no livro *Flora Brasiliae Meridionalis* (Saint-Hilaire, A.; Jussieu, A.; Cambessedes, J., 1829, p. 361). Atualmente, a espécie é conhecida popularmente como jabuticaba da praia ou cafézinho da praia devido aos frutos se distribuírem de forma concentrada ao longo dos ramos, apresentando esse nome pela sua aparência e ocorrência em região de restinga na Mata Atlântica. Os frutos desta espécie são intensamente utilizados pela fauna, especialmente por aves e mamíferos (Côrtes et al. 2009).

Informações sobre a época de produção de flores e frutos são cruciais para formulação de estratégias de conservação e manejo dos recursos naturais. Uma forma de obtê-las é indo ao campo e observando as plantas por longos períodos (pelo menos 12 meses) em estudos conhecidos como “fenologia de chão” que envolvem um esforço na logística de coleta dos dados mensais e custo para obtenção desses dados. Uma alternativa que têm se mostrado viável para elaborar calendários fenológicos a um menor custo, e mais rapidamente, é a análise de dados digitalizados nas coleções virtuais de história natural (Proença et al. 2012; Silva e Proença 2014; Morellato et al. 2016; Willis et al., 2017). Outra vantagem dessa abordagem é a possibilidade de recuperar estas informações para amplas escalas geográficas e temporais.

Assim, neste trabalho caracterizamos a fenologia de *Eugenia astringens* e mapeamos a distribuição espaço-temporal utilizando dados de coleções históricas (herbários) a fim de fornecer um calendário desta espécie que pode subsidiar estudos futuros de manejo e conservação.

Metodologia

O estudo foi realizado a partir da análise de imagens de exsicatas digitalizadas armazenadas fisicamente em coleções de história natural (herbários) e disponibilizadas através da plataforma *speciesLink network* (acessada em DATA através do site specieslink.net/search). Para a busca na plataforma os argumentos utilizados foram o nome científico da espécie e registros que continham imagens (flags:(photo)) AND ((genus:(*Eugenia*) AND species:(*astringens*))). Isso resultou em 599 registros que foram baixados na sua forma textual no formato “.xlsx.” Esta planilha continha todas as informações da exsicata e criamos colunas

adicionais para a inserção das informações fenológicas. A obtenção dos dados fenológicos consistiu através da inspeção visual das imagens buscando por botões, flores, frutos imaturos e/ou maduros nas exsicatas digitalizadas.

Para inclusão na análise, filtramos os registros de determinadores confiáveis, ou seja, materiais que foram coletados e/ou determinados por especialista na taxonomia da família Myrtaceae. Eliminamos também registros sem data de coleta, sem localidade geográfica que pudesse ser recuperada na forma de coordenadas (latitude e longitude) e registros com imagem de baixa qualidade onde não foi possível identificar a fenologia. Quando o registro possuía apenas mês e ano, atribuímos a data “15” assumindo o meio do mês e utilizando-o, isso ocorreu em 4 casos. Além disso, os registros duplicados foram unificados em um único registro.

As análises dos dados foram feitas a partir da utilização do google planilhas e dois softwares gratuitos, o “Qgis” e o “R” através do compilador “RStudio”. O google planilhas foi utilizado para a produção do histograma de distribuição das coletas no decorrer dos anos e também para a atribuição do dia do ano em que o registro estava em uma determinada fenofase, exemplo 3 de fevereiro equivale ao dia 34 do ano. A conversão das datas das coletas em ângulos, a fim de aplicar estatística circular, (Staggemeier, et al. 2020) foi realizada no R. Para essa conversão, o total do círculo (360 graus) é dividido pelo total de dias do ano e multiplicado pelo dia do ano em que a fenologia foi registrada. Consideramos os anos bissextos com 366 dias e anos regulares com 365 dias neste cálculo. A distribuição temporal usando o dia do ano foi mapeada com o software “Qgis”, representando a distribuição geográfica-temporal das fenofases. O histograma de distribuição temporal do número de coletas e os gráficos e análises de estatística circular foram gerados no R, através do pacote *base*, *Circular* e *Lubridate* (Grolemund & Wickham, 2011; Lund, et al. 2017). Para determinar se as fenofases foram sazonais, isto é concentradas num determinado período, aplicamos o teste de Rayleigh (Morellato et al., 2010). A sazonalidade foi representada pelo comprimento do vetor r que vai de 0 (sem sazonalidade) a 1 (sazonal).

Resultados e Discussões

A partir da busca dos registros foram recuperadas 599 exsicatas. Após os critérios de exclusão foram consolidados para a análise 267 registros únicos. Deste total, 52 registros apresentaram botão, 60 registros flor, 164 fruto imaturo e 83 fruto maduro. O registro mais antigo foi no ano de 1935 e o mais recente em 2023 (Fig.1). Houve um aumento na quantidade de estudos ao longo do tempo, principalmente no início dos anos 2000, caracterizado provavelmente pelo avanço das políticas públicas na época como, por exemplo, a expansão das instituições de ensino e pesquisa federais através do REUNI (Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais). É notável a queda no número de coletas na última década.

Com a análise da distribuição espacial das coletas de *Eugenia astringens* (Fig.2A), notamos a elevada concentração de coletas nos Estados da Bahia e Espírito Santo (Fig. 2B-C), mas também a escassez de registros com fotos e determinação confiável para Pernambuco, Paraíba e Ceará.

Houve menos coletas desta espécie nos meses de dezembro a fevereiro (Fig. 3D) que coincide com o período onde, em geral, ela não está reprodutiva. Todas as fenofases

analisadas foram sazonais (Fig. 4; comprimento do vetor r variando de 0,34 a 0,66). Sendo o pico de botão floral estimado no ângulo de $79,4^\circ$ (22.Mar; Fig. 4A). O pico de antese ocorreu no ângulo de $85,5^\circ$ (28.Mar; Fig. 4B). Fruto imaturo no ângulo de $166,3^\circ$ (15.Junho; Fig. 4C). Fruto maduro no ângulo de $201,9^\circ$ (24.Jul; Fig. 4D).

Comparando os padrões fenológicos recuperados aqui, com base em dados de herbário, aos resultados obtidos in situ, em pesquisas de campo, sobre a fenologia desta espécie (dados disponíveis em Staggemeier et al. 2007 e Staggemeier et al. 2010), houve congruência quanto às ocorrências das fenofases, a presença dos botões e flores em março, mais especificamente no final do mês, frutos imaturos em 15 de junho, próximo da data de pico, em 20 de maio, e a maior presença das coletas de frutos maduros, entre junho - outubro, com todas as fenofases ocorrendo dentro do intervalo observado nos estudos de campo.

Mapas da distribuição espaço-temporal dos registros para cada fenofase (Fig. 5) mostram uma tendência latitudinal, onde registros mais ao norte do bioma ocorreriam mais tardiamente para todas as fenofases. Um passo futuro será analisar explicitamente essa relação, especialmente em função de resultados que emergiram do trabalho de Hart, T. et al., 2025, que aponta que o norte da Mata Atlântica poderia ser fenologicamente distinto do sul. Outra análise a ser desenvolvida no futuro é a busca por eventos de antecipação ou atraso na fenologia nos locais de melhor amostragem como Bahia e Espírito Santo.

Conclusão

Este estudo caracterizou a fenologia reprodutiva de *Eugenia astringens*, assim como sua distribuição geográfica, a partir de 267 registros de exsicatas em herbários, identificando maior ocorrência de botões e flores em março, frutos imaturos em junho e maduros em julho, indicando um ciclo sazonal.

Os resultados demonstram a importância dos herbários como potencial ferramenta para compreender padrões fenológicos e sua relação com fatores ambientais, visto as dificuldades de estudos de longo prazo de campo. Vale destacar a necessidade de mais análises de fenologia com base em herbários comparado aos dados de campo para validar seu uso como ferramenta eficiente na construção de calendários fenológicos. As informações fornecidas como produto deste estudo servem de base para auxiliar em estratégias de conservação, principalmente no contexto global atual de grandes impactos ambientais, alterações das paisagens e mudanças climáticas.

Referências

- Côrtes, M. C. et al. **Linking frugivore activity to early recruitment of a bird dispersed tree, *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) in the Atlantic rainforest.** Austral Ecology, v. 34, n. 3, p. 249–258, maio 2009.
- Grolemund, G., & Wickham, H. (2011). **Dates and times made easy with lubridate.** Journal of statistical software, 40, 1-25.
- Lund, U., Agostinelli, C., & Agostinelli, M. C. (2017). **Package ‘circular’.** Repository CRAN, 775(5), 20-135.

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.

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.

Saint-Hilaire, A.; Jussieu, A.; Cambessedes, J. Flora Brasiliae Meridionalis. Apud A. Belin, Paris: [s.n.]. v. 2 p. 361, 1839.

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. & Morellato, P. & Galetti, M.. (2007). **Fenologia reprodutiva de Myrtaceae em uma ilha continental de Floresta Atlântica**. Revista Brasileira de Boiciências. 5. 423-425.

Staggemeier, V.G., Diniz-Filho, J.A.F. and Morellato, L.P.C. (2010), **The shared influence of phylogeny and ecology on the reproductive patterns of Myrteae (Myrtaceae)**. Journal of Ecology, 98: 1409-1421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01717.x>

Staggemeier VG, Gutierrez Camargo MGG, Diniz-Filho JAF, Freckleton R, Jardim L, Morellato LPC. **The circular nature of recurrent life cycle events: a test comparing tropical and temperate phenology**. J Ecol. 2020; 108: 393–404. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13266>

Hart, T. , Bùì, TN., Di Maggio, L. et al. **Global phenology maps reveal the drivers and effects of seasonal asynchrony**. Nature (2025). <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09410-3>

WILLIS, C. G. et al. **Old Plants, New Tricks: Phenological Research Using Herbarium Specimens**. Trends in Ecology & Evolution, v. 32, n. 7, p. 531–546, jul. 2017.

Anexos

Fig. 1. Distribuição temporal das coletas de *Eugenia astringens* obtidas através do Species Link (<https://specieslink.net/>).

Fig. 3. Foto de flores (A), frutos imaturos(B), frutos maduros(C), Distribuição do número de coletas anual em dias, separado em colunas mensais (D) e Mapa de distribuição geográfica e temporal(E) das coletas de *Eugenia astringens*;

Fig. 4. Variação da atividade das fenofases reprodutivas de espécimes de *Eugenia astringens*, botão floral (A), flor (B), fruto imaturo (C) e fruto maduro (D).

Fig. 5. Mapa de distribuição geográfica e fenologia reprodutiva de botão (A), flor (B), fruto imaturo (C) e fruto maduro (D).

Fig. 2. Mapa de distribuição geográfica de 1147 coletas de *Eugenia astringens* com dados recuperados em spLink (A), distribuição dos registros analisados com imagens disponível (B) e distribuição do número de coletas analisadas por estado (C).

CÓDIGO: SB1770

AUTOR: KLAUS AUGUSTUS RAMOS REINIGER

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Avaliação com Química Quântica de Sítio Alostérico Conservado em Polimerases de Pneumovírus e Predição de Resíduos Chave para Mecanismo de Ação Enzimático.

Resumo

Há um acometimento global causado pelo grupo dos pneumovírus, particularmente pelo Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e o metapneumovírus humano (hMPV), responsáveis por 34 milhões de infecções agudas do trato respiratório inferior anuais em crianças. Ademais, o desenvolvimento de tratamentos específicos a esses vírus ainda é limitado e enfrenta dificuldades em razão do alto perfil de segurança necessário para o público alvo. Nessa perspectiva, estudamos estruturas de criomicroscopia eletrônica das enzimas polimerase destes vírus em complexo com um inibidor do tipo não nucleosídico, chamado MRK-1. Com o auxílio de ferramentas de química quântica, a saber, teoria do funcional de densidade (DFT) e a técnica do fracionamento molecular com capas conjugadas (MFCC), realizamos cálculos in silico para determinação das energias de interação entre cada polimerase e o MRK-1, bem como energias de interação aminoácido específicas. Na constante dielétrica 40, a energia total de interação com RSV é de -75,04 kcal/mol e com hMPV é de -65,61, demonstrando maior potencial inibitório para RSV. Ademais, verificamos aminoácidos chave para essas interações, como PHE1385_RSV (-10,33 kcal/mol), ASN1294_hMPV (-10,31 kcal/mol) e ILE1381_RSV (-6,06 kcal/mol). Os aminoácidos descritos podem estar implicados no mecanismo de ação multifuncional das polimerases de Mononegavirales. A análise das interações por cada região do MRK-1 contribui para o desenvolvimento de novos antivirais.

Palavras-chave: Pneumovirus. MFCC. DFT. Biologia estrutural. Forças intermoleculares.

TITLE: Quantum Chemistry Analysis of Conserved Allosteric Binding Site in Pneumoviruses' Polymerases and Prediction of Key Residues for Enzymatic Action Mechanism.

Abstract

There is a global burden caused by the pneumovirus group, particularly by Respiratory Syncytial Virus (RSV) and human metapneumovirus (hMPV), which are responsible for 34 million acute lower respiratory tract infections annually in children. Furthermore, the development of specific treatments for these viruses is still limited and faces challenges due

to the high safety profile required for the target population. In this perspective, we studied cryo-electron microscopy structures of the polymerase enzymes of these viruses in complex with a non-nucleoside inhibitor, called MRK-1. With the aid of quantum chemistry tools, namely density functional theory (DFT) and the molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) technique, we performed *in silico* calculations to determine the interaction energies between each polymerase and MRK-1, as well as amino acid-specific interaction energies. At a dielectric constant of 40, the total interaction energy with RSV is -75.04 kcal/mol and with hMPV is -65.61 kcal/mol, demonstrating greater inhibitory potential for RSV. Additionally, we identified key amino acids for these interactions, such as PHE1385_RSV (-10.33 kcal/mol), ASN1294_hMPV (-10.31 kcal/mol), and ILE1381_RSV (-6.06 kcal/mol). The described amino acids may be implicated in the multifunctional mechanism of action of Mononegavirales polymerases. The analysis of interactions by each region of MRK-1 contributes to the development of new antivirals.

Keywords: Pneumoviruses. MFCC. DFT. Structural biology. Intermolecular forces.

Introdução

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e o Metapneumovírus humano (hMPV) são vírus de RNA de fita negativa não segmentados (nsNSVs) relacionados, pertencentes à ordem Mononegavirales e à família Pneumoviridae (categorizados como pneumovírus), que detêm um impacto global com altas taxas de mortalidade e morbidade. O RSV em lactentes é a causa mais proeminente de infecções agudas do trato respiratório inferior (ALRIs) em bebês com menos de um ano de idade e está implicado em 34 milhões de ALRIs anualmente em crianças com menos de cinco anos, além da possível necessidade de suporte de oxigênio em casos graves. (TISCHER et al., 2022) (NOLAN et al., 2015). Embora descoberto apenas em 2001, o hMPV também pode causar infecções do trato respiratório superior (URTI) e ALRI grave.

Alguns inibidores análogos não nucleosídeos (NNIs) foram projetados visando a proteína “large” (L) da RNA polimerase do RSV (ORABY et al., 2024). Um estudo de Kleiner et al. (2023) avaliou um NNI denominado MRK-1 (Figura 1), que exerceu atividade antiviral contra as polimerases do VSR e do hMPV e se liga a um sítio alostérico conservado (localizado dentro do domínio da polirribonucleotidil-transferase – PRNTase), distinto do de outros NNIs conhecidos contra essas proteínas (ORABY et al., 2024). Os dados de crio-EM disponibilizados do MRK-1 ligado a ambas as polimerases auxiliaram uma compreensão mais profunda das semelhanças dos bolsos de ligação e de como o inibidor interage com eles, do que a fornecida apenas por simulações de atracamento molecular e dinâmica molecular. O estudo apontou que o MRK-1 inibe a iniciação da síntese de RNA e o alongamento inicial no RSV, prevenindo alterações conformacionais realizadas pela polimerase para esses processos.

Uma abordagem que pode ajudar em estudos mecanísticos é a análise de interações proteína-ligando a nível atômico e energético. A química computacional e as ferramentas *in silico* podem ser amplamente utilizadas para esse propósito, beneficiando-se de recursos e tempo de computação relativamente baixos, permitindo ensaios de alto rendimento e fornecendo uma imagem detalhada das interações moleculares, servindo assim para pavimentar o caminho e otimizar os resultados de ensaios experimentais. Entre as ferramentas computacionais disponíveis para o cálculo proteína-ligando, os cálculos de mecânica quântica (QM) têm uma

vantagem sobre os de mecânica molecular (MM) devido a uma simulação mais precisa do ambiente eletrônico (ALBUQUERQUE et al., 2014) (VIANNA et al., 2019).

Empregamos o método de Fracionamento Molecular com Caps Conjugadas (MFCC) combinado com a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) para calcular energias de interação global e específicas para aminoácidos entre o MRK-1 e as polimerases de VSR e hMPV usando mecânica quântica ab initio (OURIQUE et al., 2016). Com esses cálculos de energia mais precisos, pretendemos verificar o perfil inibitório do MRK-1 contra essas polimerases e o seu potencial para se tornar um antiviral de amplo espectro, e enumerar resíduos conhecidos e novos importantes para os processos biológicos (iniciação da síntese de RNA e o alongamento inicial) inibidos pelo MRK-1. Além disso, os resultados específicos esperados são: (i) descrever, se houver, regiões desfavoráveis do ligando que interagem repulsivamente com os resíduos da polimerase; e (ii) correlacionar, quando plausível, as afinidades de ligação específicas para aminoácidos com implicações funcionais relacionadas ao mecanismo de inibição e ao aumento das tendências de mutação.

Metodologia

Obtivemos as estruturas de crio-EM da polimerase L truncada (Ltrunc) de RSV ligada a MRK-1 e da polimerase L de hMPV, ambas com tetrâmero de fosfoproteína, dos PDB IDs (resolução): 8FPI (2,52 Å) e 8FPJ (2,74 Å), respectivamente (Figura 2). Ambos os experimentos foram conduzidos a pH 7,4. Considerando a natureza da preparação por crio-EM, as resoluções de ambas as estruturas PDB não representam átomos de hidrogênio nem moléculas de água solvatantes. Após a obtenção das estruturas, fixamos o esqueleto da cadeia principal da polimerase L e das fosfoproteínas e adicionamos os átomos de hidrogênio faltantes.

O ligante MRK-1, conforme visto na Fig. 1, foi dividido em quatro regiões distintas (I, II, III e IV) para facilitar a análise posterior das interações intermoleculares. Para determinar o estado de protonação preciso do ligante durante o experimento, utilizou-se a ferramenta Marvin Sketch. Também, o software Propka Online 2.0 foi empregado para determinar o pKa das cadeias laterais dos resíduos e verificar a sua carga correta em cada estrutura (SONDERGAARD; OLSSON, 2011). A otimização geométrica por mecânica clássica, baseada na minimização energética, foi realizada, mantendo o esqueleto da cadeia principal fixo, através do Chemistry at Harvard Molecular Mechanics (CHARMm) (MOMAMY; RONE, 1992).

Para realizar cálculos de química quântica das energias de interação entre o MRK-1 e cada polimerase L, os resíduos foram inicialmente divididos por raio de interação com o MRK-1, variando de 2,0 Å a 10,0 Å, com uma diferença de 0,5 Å entre cada raio. Para cada resíduo, a sua energia de interação individual contra o ligante foi calculada com base na energia total de quatro subsistemas construídos com a técnica MFCC (Figura 3) (WANG et al., 2013) (RODRIGUES et al., 2012). Cálculos de DFT sobre cada subsistema fornecem resultados ab initio das energias de interação específicas para aminoácidos. A técnica mencionada, além de calcular energias de interação individuais, leva à energia de interação global. Fragmenta-se uma proteína nos seus resíduos individuais, assumindo que os aminoácidos vizinhos (denominadas capas) e o ligante podem induzir uma distribuição eletrônica no resíduo com boa proximidade à sua distribuição real (VIANNA et al., 2019) (ZHANG, 2017). Para definir capas para um dado resíduo e apresentar uma equação para as energias de interação

individuais, seja L o ligante (MRK-1) e considere o i -ésimo resíduo, contando da região N-terminal para a C-terminal, de uma polimerase (os resíduos da fosfoproteína não foram considerados, uma vez que nenhuma das fosfoproteínas, em nenhum dos complexos, tinha um raio de interação com o MRK-1 igual ou inferior a 10,0 Å), aqui denominado R_i . A capa N-terminal do i -ésimo resíduo (C_i) é o $(i-1)$ -ésimo resíduo e átomo de hidrogênio adicionado ao seu grupo amino no lugar da ligação peptídica clivada (esta capa não existe para o 1º resíduo). De forma semelhante, a capa C-terminal do i -ésimo resíduo (C_i^*) é o $(i+1)$ -ésimo resíduo com um átomo de hidrogênio extra ligando-se ao seu grupo carboxil no lugar da ligação peptídica clivada (o resíduo na extremidade C-terminal da proteína não tem esta capa). A seguinte equação pode então fornecer a energia de interação (IE_i) entre L e R_i , conforme descrito em Silva et al., (2024):

,

Onde E fornece a energia total de um sistema a partir dos quatro subsistemas construídos. Tais valores de energia foram então calculados usando DFT (MAZUREK et al., 2020) no Gaussian 16 usando o funcional de aproximação de gradiente meta-generalizado (meta-GGA) B97D (GRIMME, 2006). A escolha do funcional baseia-se em estudos comparativos (OVALLE, 2022) que apontam o B97D como preferível para contabilizar interações intermoleculares extensas. Os orbitais de Kohn-Sham foram expandidos usando o conjunto de base 6-311+G(d,p).

Como as moléculas de água solvatantes (não presentes nas estruturas PDB) e os átomos circundantes têm contribuições significativas para a polarização de carga devido a interações eletrostáticas (DANTAS et al., 2015), empregamos um modelo de solvatação implícito pela modulação do valor da constante dielétrica (ϵ). Especificamente, foi usado o modelo CPCM com o método SCRF (SILVA et al., 2024). Vários estudos sugerem que uma constante dielétrica de $\epsilon = 40$ pode mimetizar bem a polarização induzida em complexos proteína-ligante com solvatação (VICATOS et al., 2009) (AMIN; KUPPER, 2020). Para o nosso estudo, realizamos cálculos DFT similares usando valores de $\epsilon = 10$ e $\epsilon = 40$, enfatizando a polarização dentro da estrutura proteica e dentro das moléculas de água solvatantes, respectivamente.

Conforme descrito anteriormente, as etapas de MFCC e DFT foram realizadas separadamente para cada aminoácido dentro de raios de ligação variando de $r = 2,0$ Å a $r = 10,0$ Å. Para cada valor de r , a soma das energias de interação calculadas entre o MRK-1 e os resíduos individuais dentro do respectivo raio foi computada (denominada $E(r)$). A soma sequencial dos valores de $E(r)$, com valores crescentes de r , começando de $r = 2,0$ Å, é usada para buscar um valor convergente para a energia de interação global entre o MRK-1 e cada polimerase L. Consideramos que há uma convergência no valor da soma no raio r quando a energia varia menos de 10% através dos valores de soma das três últimas medições (BARBOSA et al., 2021). Isso permite um cálculo preciso da energia de interação global sem desconsiderar resíduos diretamente importantes para a interação energética geral.

Resultados e Discussões

De acordo com os cálculos de pKa, o ligante MRK-1 (Fig. 1), como mostrado, está positivamente carregado em $III[N1(H^+)]$ e negativamente carregado em $II[N3^-]$, resultando numa carga neutra. A análise da convergência de energia por raio de sítio de ligação

demonstrou rápida convergência, que ocorreu no raio de 4,0 Å para o complexo do RSV-MRK-1 (Fig. 4) (usando tanto $\epsilon = 10$ quanto $\epsilon = 40$), no raio de 5,0 Å para o hMPV (Fig. 5) usando $\epsilon = 10$ e no raio de 4,5 Å com $\epsilon = 40$. Os valores de energia de interação global resultantes encontrados (em $r = 10,0$ Å) foram: -82,86 (RSV, $\epsilon = 10$), -75,04 (RSV, $\epsilon = 40$), -72,44 (hMPV, $\epsilon = 10$) e -65,61 (hMPV, $\epsilon = 40$) kcal/mol.

Para o RSV, destacamos que a maioria das contribuições energéticas ocorre a partir de resíduos dentro dos raios de 2,0 Å, 2,5 Å e 3,0 Å, indicando que as interações diretas entre o MRK-1 e os resíduos mais distais são menos significativas. Com $\epsilon = 10$ (mas não com $\epsilon = 40$), observa-se quedas ligeiramente maiores na energia de interação (valores mais negativos) do que nos raios circundantes para $r = 5,0$ Å e $r = 6,0$ Å, que podem ser atribuídas principalmente a ARG1339_RSV e GLU1374_RSV, respectivamente. Em $r = 6,5$ Å e $\epsilon = 10$, há uma interação repulsiva com LYS1375_RSV que contraria a tendência de queda da energia, que só é devidamente restabelecida em $r = 7,5$ Å.

Para o hMPV, a contribuição significativa da energia de interação estende-se de $r = 2,0$ Å a $r = 3,5$ Å. Em menor grau, interações atrativas significativas também ocorrem em $r = 4,5$ Å (ARG1264_hMPV, que é o análogo de ARG1339_RSV). Para $\epsilon = 40$, os resíduos restantes estão de acordo com a convergência energética. Não obstante, na análise com $\epsilon = 10$, também encontramos algumas interações atrativas resultando em uma queda energética adicional nos raios de 5,5 Å e 6,0 Å, principalmente atribuídas a GLN1295_hMPV e GLU1299_hMPV (análogo de GLU1374_RSV), respectivamente. Além disso, existem vários raios do bolso de ligação com energia de interação global positiva para $\epsilon = 10$ no hMPV, embora estejam ausentes para $\epsilon = 40$. São $r = 6,5$ Å (devido a ARG1300_hMPV, análogo de LYS1375_RSV), $r = 8,0$ Å (devido a GLU1194_hMPV) e $r = 9,0$ Å (devido a LYS1164_hMPV).

Após discutir as diferentes implicações da avaliação energética com constantes dielétricas $\epsilon = 10$ e $\epsilon = 40$, iremos, a partir de agora, focar a discussão nos valores calculados usando $\epsilon = 40$, pelas razões explicadas na seção de métodos. Os resíduos que exibiram as energias de interação mais atrativas (valores em kcal/mol) para o complexo RSV-MRK-1 foram: PHE1385_RSV (-10,33) > VAL1384_RSV (-8,24) > LEU1372_RSV (-7,78) > HIS1338_RSV (-6,53) > ILE1381_RSV (-6,06) > GLU1379_RSV (-3,53) > ARG1345_RSV (-2,80). De modo similar, os resíduos (energias de interação em kcal/mol) responsáveis pelas interações mais repulsivas foram: ASP1380_RSV (+4,25) > ILE1383_RSV (+1,20) > ILE1371_RSV (+0,53). A Figura 6 descreve estes resíduos juntamente com o raio do sítio de ligação em que se encontram, as energias de interação individuais e os átomos do MRK-1 que exercem a interação intermolecular mais significativa com o resíduo da polimerase estudado. Uma análise detalhada será conduzida avaliando cada região do MRK-1 separadamente.

Neste sentido, a região I mantém interações atrativas principalmente com (valores de energia em kcal/mol) VAL1384_RSV (-8,24), HIS1338_RSV (-6,53), ARG1345_RSV (-2,80) e ILE1381_RSV (-6,06). Esta região no MRK-1 compreende o grupo 4-ciclopropoxi-3-metoxibenzoil. A sua cadeia aromática em ressonância forma uma ligação pi-alquil muito forte com a cadeia lateral de VAL1384_RSV, favorecida por angulação e distância adequadas (4,70 Å é bom para interações pi-alquil). Há também outras interações alquil-alquil entre a mesma cadeia lateral e os grupos ciclopropoxi e metoxi (distâncias de centroide de 4,35 Å e 5,63 Å, respectivamente). HIS1338_RSV contém uma porção imidazol, que mantém uma interação de empilhamento pi-pi com o grupo benzoil do MRK-1 a 4,15 Å. Além disso, uma interação pi-alquil também é formada com o mesmo grupo benzoil, a uma distância de 3,50 Å. Os átomos de carbono da cadeia lateral de ARG1345_RSV mantêm uma interação

intermolecular alquil-alquil com o grupo 4-ciclopropoxi da região I, a uma distância de centroide de 5,38 Å. Ademais, os átomos de oxigênio I[O1] e I[O2] poderiam potencialmente manter ligações de hidrogênio com um dos átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio da cadeia lateral de ARG1345_RSV, mas as distâncias atômicas respectivas de 4,1 Å e 3,8 Å estão fora do limite adotado de 3,1 Å para ligações de hidrogênio. Além disso, o fato desse resíduo ter sido previsto como desprotonado torna-o ainda menos favorável para a ocorrência de tais ligações de hidrogênio. Embora ILE1381_RSV interaja principalmente com a região II (da qual a maior parte da energia de interação fortemente atrativa é provavelmente advinda), há uma ligação de hidrogênio não convencional entre o átomo de oxigênio da cadeia principal de ILE1381_RSV e I(C17)H coplanar ao anel aromático e a uma distância muito próxima (2,30 Å).

A região II, compreendendo o grupo hidrazida, é a região responsável pelo maior número de interações intermoleculares com a polimerase do RSV. É responsável por interações favoráveis com (energias em kcal/mol): PHE1385_RSV (-10,33) e ILE1381_RSV (-6,06). Também forma ligações intermoleculares com ASP1380_RSV (+4,25) e ILE1383_RSV (+1,20). Embora VAL1384_RSV (-8,24) e HIS1338_RSV (-6,53) estejam associados às regiões III e I, respectivamente, também interagem em menor grau com a região II. PHE1385_RSV possui uma forte ligação de hidrogênio com II[O3], a uma distância de 1,93 Å. ILE1381_RSV tem uma forte ligação de hidrogênio com II[N4(H)] a 2,30 Å e uma ligação de hidrogênio mais distante (2,94 Å) e menos favorecida pela geometria com II[O4]. A repulsão prevista para ASP1380_RSV é provavelmente resultante da interação desfavorável acceptor-aceptor de elétrons entre o grupo carboxil e II[O3] a 2,95 Å. No entanto, pode-se observar uma ligação de hidrogênio não convencional realizada pelo hidrogênio ligado ao Cα e II[O3] a 2,18 Å. Considerando ILE1383_RSV, o átomo de oxigênio da cadeia principal interage com II[N3], que é negativamente carregado e é provavelmente a razão para a energia de interação positiva calculada. Não obstante, a força desta repulsão não pode ser efetivamente mensurada. A região II interage com VAL1384_RSV e HIS1338_RSV através de ligações de hidrogênio não convencionais com II[O3] e II[O4], respectivamente.

A região III, englobando o grupo piridinil central do MRK-1, interage com (energias em kcal/mol) LEU1372_RSV (-7,78), GLU1379_RSV (-3,53) e ILE1371_RSV (0,53). Também interage com ILE1381_RSV (-6,06) e, em menor grau, com ILE1383_RSV (+1,20). Em LEU1372_RSV, há uma ligação de hidrogênio muito forte entre o oxigênio da cadeia principal e III[N1(H)] (1,61 Å). Há também uma interação pi-alquil com o grupo piridinil (os centroides distam 5,38 Å). Em GLU1379_RSV, há uma interação dipolo permanente-dipolo induzido entre o oxigênio da cadeia principal e III[C3(H)] a uma distância de 2,34 Å e uma ligação de hidrogênio não convencional entre o mesmo átomo de oxigênio e III[C26(H)] a 3,06 Å. Para ILE1371_RSV, o resíduo está afastado de MRK-1 e não pudemos tirar conclusões sobre quais interações intermoleculares respondem pela energia repulsiva calculada. A mais sugestiva seria uma interação desfavorável doador-doador de elétrons entre o C1 da cadeia principal (de ILE1371_RSV) e III[N1(H)]. O grupo piridinil da região III também mantém uma interação pi-alquil com a cadeia lateral de carbono de ILE1381_RSV. Há uma ligação de hidrogênio não convencional realizada por ILE1383_RSV com III[N2] a 2,76 Å, sobrepondo uma interação pi-alquil com o anel piridinil a 4,24 Å.

Finalmente, todas as interações consideradas para a região IV (fluorofenil) foram consideradas secundárias às interações dos respectivos resíduos com outras regiões do MRK-1. Estas foram com (energias de interação em kcal/mol): PHE1385_RSV (-10,33),

LEU1372_RSV (-7,78) e ILE1383_RSV (+1,20). Com PHE1385_RSV, há uma interação pi-pi em forma de T muito forte entre o fluorofenil e o anel aromático do resíduo a uma distância de 4,79 Å. Com LEU1372_RSV, há uma interação pi-alquil a 5,07 Å. Com ILE1383_RSV, há uma interação pi-alquil a 5,25 Å, mas com o grupo alquil quase coplanar ao fluorofenil.

Considerando a estrutura da polimerase de hMPV ligada a MRK-1, os resíduos que exerceram as energias de interação mais significativas são descritos. Os resíduos com energias de interação negativas (atrativas) (valores em kcal/mol) foram: ASN1294_hMPV (-10,31) > 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). Os resíduos com energias de interação positivas (repulsivas) foram: LEU1308_hMPV (+3,54) > MET1347_hMPV (+1,27). A Figura 7 mostra os respectivos resíduos, as suas energias de interação em kcal/mol, o seu raio do sítio de ligação e os átomos do MRK-1 envolvidos nas interações mais significativas para cada resíduo. Como mencionado, os valores considerados são os calculados para $\epsilon = 40$.

Na região I, o resíduo de hMPV que mais interage com o MRK-1 é MET1347_hMPV (+1,27 kcal/mol). Apesar da energia de interação positiva calculada, observa-se uma interação pi-enxofre realizada entre o átomo de enxofre de MET1347_hMPV e o grupo benzoil da região I e uma interação alquil-alquil entre a cadeia lateral de MET1347_hMPV e o grupo ciclopropil da região I. Verificações adicionais, como a construção de um mapa de potencial eletrostático molecular (MEP) [Silva et al, 2024. DOI : 10.1039/d4cp02895c] são importantes para verificar se interações repulsivas de fato ocorrem entre esse resíduo e MRK-1. Esta região também interage com HIS1263_hMPV (-4,81 kcal/mol) através de uma interação pi-pi entre o grupo imidazol do resíduo e o grupo benzoil da região I a 4,34 Å de distância de centroides e através de uma interação pi-alquil entre o grupo imidazol e o grupo metil dentro do 3-metoxi, onde o grupo metil é coplanar ao anel imidazol e os centroides se encontram a uma distância de 5,00 Å. Além disso, há uma interação com VAL1309_hMPV (-3,93 kcal/mol) na forma de uma interação pi-alquil a 5,08 Å entre o grupo benzoil e a cadeia lateral de carbono do resíduo. Na região II, interações extensivas com (energias de interação em kcal/mol): ILE1306_hMPV (-6,92), HIS1263_hMPV (-4,81), VAL1309_hMPV (-3,93), ASP1305_hMPV (-2,84) e LEU1308_hMPV (+3,54). A interação mais forte observada foi a com ILE1306_hMPV, favorecida por uma ligação de hidrogénio a 2,68 Å com II[N4(H)]. A região II também é altamente favorecida por ligações de hidrogénio realizadas por átomos de hidrogénio ligados à porção imidazol de HIS1263_hMPV. Estes átomos realizam uma ligação de hidrogénio convencional e uma não convencional com (distâncias) II[O3] (2,53 Å) e II[O4] (2,20 Å), respectivamente. VAL1309_hMPV interage com a região II através de uma ligação de hidrogénio não convencional com II[O3] num raio de 2,62 Å. Curiosamente, ASP1305_hMPV (análogo de ASP1380_RSV) possui um grupo carboxil com carga que provavelmente causa a interação atrativa calculada, mas não pudemos concluir qual é o átomo exato do MRK-1 com o qual interage, que é presumidamente da região II. Para LEU1308_hMPV, o seu átomo de oxigênio da cadeia principal interage com II[N3] através de uma repulsão eletrostática (note-se que II[N3] está negativamente carregado) e isto é suficiente para superar a ligação de hidrogénio realizada pelo mesmo oxigênio e II[N4(H)].

Na região III, as principais interações realizadas são aquelas com (energias em kcal/mol) ASN1294_hMPV (-10,31) e GLU1304_hMPV (-2,50). Além disso, há interações secundárias com ILE1306_hMPV (-6,92) e LEU1297hMPV (-3,97). Com ASN1294_hMPV, há uma rede de ligações de hidrogénio convencionais mantidas tanto pelos átomos de hidrogénio da sua

cadeia principal quanto da cadeia lateral e diferentes átomos de hidrogénio ligados a III[N1] (ou seja, III[N1(H)]), tornando-a a interação mais atrativa entre o MRK-1 e qualquer resíduo da polimerase de hMPV. Em GLU1304_hMPV, vemos uma extensa rede de interações dipolo permanente-dipolo induzido mantidas de um lado pela cadeia principal deste resíduo e do outro lado pelos grupos metil de III[C1] e III[C3]. Considerando ILE1306_hMPV, há uma forte (distância próxima de centroides de 3,64 Å e angulação adequada) interação pi-alquil realizada pela cadeia lateral de carbono do resíduo e o grupo piridinil do MRK-1. Adicionalmente, há uma interação alquil-alquil a um raio de 3,99 Å entre a mesma cadeia lateral e o grupo metil de III[C3]. Quanto a LEU1297_hMPV, há uma interação pi-alquil distante entre a cadeia lateral de carbono do resíduo e o anel piridinil a 5,56 Å e uma leve interação de van der Waals com III[C3(H)].

Na região IV do MRK-1, existem duas interações principais com (energias em kcal/mol) PHE1310_hMPV (-5,66) e LEU1297_hMPV (-3,97). Há interações secundárias adicionais com ILE1306_hMPV (-6,92) e VAL1309_hMPV (-3,93). As interações principais com PHE1310_hMPV ocorrem através de uma interação pi-pi em forma de T entre o grupo fluorofenil da região IV e a cadeia aromática do resíduo a uma distância de 5,74 Å e através de uma interação pi-alquil a uma distância de 4,05 Å. Com LEU1297_hMPV, há uma interação pi-alquil entre a sua cadeia lateral e o mesmo grupo fluorofenil a 5,06 Å que, apesar da distância, é favorecida por boa geometria e extensão dos átomos no grupo alquil em interação. Há também uma interação pi-alquil entre o fluorofenil e a cadeia lateral de ILE1306_hMPV, ocorrendo a uma distância de 5,05 Å, mas com uma geometria não tão favorável. Em VAL1309_hMPV, há uma leve repulsão eletrostática entre o seu átomo de oxigénio da cadeia principal e IV[F].

Conclusão

Os resultados encontrados confirmam os achados de Kleiner et al. (2023), demonstrando através da convergência energética utilizando as constantes dielétricas $\epsilon = 10$ e $\epsilon = 40$ para RSV e hMPV que MRK-1 possui atividade inibitória à polimerase L destes vírus. Ademais, pudemos verificar que todas as regiões do MRK-1, em geral, contibuem para a afinidade proteína-ligante. As interações próximas em geral sugerem um sítio de ligação pequeno. Conforme demonstrado com Kleiner et al., 2023, a ligação do MRK-1 não induzir um estado conformacional diferente na polimerase de RSV, dada à similaridade estrutural entre a proteína apo e a estrutura ligada. No entanto, as fortes energias de atração descritas segundo os cálculos de DFT sugerem que a ligação com MRK-1 enrigesse o sítio alostérico das polimerases e pode contribuir para impedir as mudanças conformacionais necessárias à tradução e replicação no ciclo viral.

Verifica-se também a grande conservação entre esse sítio alostérico entre as duas polimerases de RSV e hMPV, o que pode ser observado pelo fato de que, entre os 10 resíduos de cada polimerase escolhidos para aprofundamento das interações intermoleculares, havia 8 pares de resíduos análogos nas duas polimerases, a saber: LEU1372_RSV e LEU1297_hMPV; PHE1385_RSV e PHE1310_hMPV; GLU1379_RSV e GLU1304_hMPV; ASP1380_RSV e ASP1305_hMPV; ILE1381_RSV e ILE1306_hMPV; ILE1383_RSV e LEU1308_hMPV; HIS1338_RSV e HIS1263_hMPV; e VAL1384_RSV e VAL1309_hMPV. Essa conservação, que além de estrutural foi, por métodos de química quântica, encontrada como também energética, faz com que o MRK-1 possa ser considerado como um possível antiviral de ação

direta de amplo espectro, e sugere o teste de seu potencial inibitório em outros Mononegavirais para além dos pneumovirus. O sítio ILE1381_RSV é um sítio em que mutação pode levar a resistência (KLEINER et al., 2023). Isso pode ser justificado pela significativa energia de interação negativa calculada para esse resíduo. Dessa forma, uma mutação nesse sítio ocasionaria a perda de afinidade entre o ligante e o sítio alostérico.

De forma geral, nossos resultados permitem uma compreensão mais aprofundada da ligação de MRK-1 com as polimerase virais de RSV e hMPV. Além disso, identificamos resíduos com implicações energéticas significativas e não descritos anteriormente, tais como: LEU1372_RSV, GLU1379_RSV, ASP1380_RSV, ILE1383_RSV, ILE1371_RSV (e respectivos análogos em hMPV), MET1347_hMPV e ASN1294_hMPV. Muitos dos aminoácidos com interações importantes descritas com MRK-1 também possuem funções nativas na polimerase (OGINO; GREEN, 2019) e são sítios de resistência para outros antivirais. Assim, estes achados podem trazer avanços na descrição dos mecanismos de ação da polimerase multifuncional de Mononegavirais (especialmente RSV e hMPV) bem como o mecanismo de inibição de MRK-1.

Referências

AMIN, N.; KUPPER, J. The Effect of Explicit and Implicit Solvation Models on the Electric Properties of Amino Acids. *ChemistryOpen*, Weinheim, v. 9, n. 4, p. 556-568, abr. 2020. DOI: 10.1002/open.202000108.

BARBOSA, M. C. A. M. B. et al. Molecular fractionation with conjugate caps for ab initio calculations in nucleic acid complexes: an accurate and efficient method. *Molecular Theory and Simulation in Materials Science and Engineering*, Oxford, v. 9, n. 4, p. 045009, 2021. DOI: 10.1093/mtomcs/mfab017.

DANTAS, F. H. B. et al. Accurate interaction energy calculations in solvated protein–ligand complexes using the molecular fractionation with conjugate caps method. *RSC Advances*, Cambridge, v. 5, n. 66, p. 53896-53907, 2015. DOI: 10.1039/c5ra04395f.

GRIMME, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *Journal of Computational Chemistry*, Hoboken, v. 27, n. 15, p. 1787-1799, 2006. DOI: 10.1002/jcc.20495.

KLEINER, S. et al. Structural basis for non-nucleoside inhibitor binding to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus polymerases. *Communications Biology*, London, v. 6, n. 1, p. 544, maio 2023. DOI: 10.1038/s42003-023-04990-0.

MAZUREK, S. et al. DFT and QTAIM study of possible antiviral mechanism of Favipiravir towards SARS-CoV-2. *Pharmaceutics*, Basel, v. 12, n. 5, p. 415, maio 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050415.

MOMANY, F. A.; RONE, R. A. Validation of the CHARMM force field for peptides and proteins. *Journal of Computational Chemistry*, Hoboken, v. 13, n. 7, p. 886-900, set. 1992. DOI: 10.1002/jcc.540130714.

NOLAN, T. et al. Global Respiratory Syncytial Virus (RSV) disease burden in infants and young children in comparison with influenza: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 60, n. 2, p. 119-129, jan. 2015. DOI: 10.1093/cid/civ065.

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*, Lausanne, v. 10, p. 1490, jul. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01490.

ORABY, A. et al. Fragment-Based Drug Discovery of Potent Non-Nucleoside Inhibitors of Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase. *ACS Omega*, Washington, v. 9, n. 13, p. 14751-14766, mar. 2024. DOI: 10.1021/acsomega.4c01207.

OVALLE, J. E. et al. DFT calculations of amino acid specific interaction energies: How does a protein pocket influence inhibitor binding? *Computational and Theoretical Chemistry*, Amsterdam, v. 1218, p. 113726, dez. 2022. DOI: 10.1016/j.comptc.2022.113726.

OURIQUE, R. A. et al. Unveiling the Electronic Nature of Protein–Ligand Interactions through the Molecular Fractionation with Conjugate Caps Method. *Journal of Chemical Theory and Computation*, Washington, v. 12, n. 6, p. 2933-2944, jun. 2016. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00989.

RODRIGUES, E. B. et al. Molecular fractionation with conjugate caps for accurate protein–ligand binding energy calculations. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v. 556, p. 251-255, jan. 2013. DOI: 10.1016/j.cplett.2012.12.061.

SILVA, J. S. et al. Benchmarking of a Continuum Solvation Model for QM/MM-Based Protein–Ligand Interaction Energy Calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Cambridge, 2024. DOI: 10.1039/d4cp02895c.

SONDERGAARD, C. R.; OLSSON, M. H. M. Improving pKa predictions in proteins using an optimized continuum electrostatic approach. *Journal of Chemical Theory and Computation*, Washington, v. 7, n. 12, p. 4178-4191, dez. 2011. DOI: 10.1021/ct200133y.

TISCHER, C. C. et al. Respiratory Syncytial Virus Infection in the Pediatric Lung Transplant Recipient. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Bethesda, v. 323, n. 6, p. L807-L824, dez. 2022. DOI: 10.1152/ajplung.00302.2022.

VIANNA, L. P. et al. Molecular fractionation with conjugate caps method applied to protein–ligand interactions for drug discovery: a perspective. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Cambridge, v. 21, n. 47, p. 26176-26190, dez. 2019. DOI: 10.1039/c9cp03631h.

VICATOS, G. et al. Optimizing the dielectric constant for implicit solvation in protein–ligand docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Hoboken, v. 77, n. 4, p. 892-901, dez. 2009. DOI: 10.1002/prot.22481

.

WANG, L. et al. Molecular fractionation with conjugate caps for ab initio calculations of protein–ligand interaction energies. *The Journal of Physical Chemistry A*, Washington, v. 117, n. 14, p. 2865-2877, abr. 2013. DOI: 10.1021/jp400779t.

ZHANG, R. et al. Computational screening of large molecular systems by fragment-based quantum chemistry. Scientific Reports, London, v. 7, n. 1, p. 44645, mar. 2017. DOI: 10.1038/srep44645.

Anexos

Figura 1 - Ligante MRK-1 dividido em quatro regiões: I, II, III e IV

Figura 2 - Estrutura de MRK-1 ligado à polimerase de RSV (A) e hMPV (B). A polimerase está em azul e amarelo, respectivamente. As estruturas do tetrâmero de fosfoproteína estão mostradas em ciano e laranja, respectivamente.

Figure 3 - Quatro subsistemas utilizados para cálculo de energia de interação segundo o método MFCC. A. Subsistema compostos pelo ligante, resíduo a ser calculado e capas. B. Subsistema composto pelo resíduo a ser calculado e capas. C. Subsistema composto

Figure 4 - Gráfico de convergência de somatório de energias de interação por raio para complexo MRK-1-RSV polimerase. No eixo X, está descrito o raio do sítio de ligação analisado, que varia de 2,0 Å a 10,0 Å, com variação de 0,5 Å a cada raio. No eixo Y,

Figure 5 - Gráfico de convergência de somatório de energias de interação por raio para complexo MRK-1-hMPV polimerase. No eixo X, está descrito o raio do sítio de ligação analisado, que varia de 2,0 Å a 10,0 Å, com variação de 0,5 Å a cada raio. No eixo Y

Figure 6 - Gráfico com principais resíduos na interação MRK-1-RSV polimerase. É descrito (à direita) o raio de sítio de ligação em que o resíduo se encontra, a energia de interação individual deste resíduo com MRK-1 (azul para constante dielétrica de 40 e

Figure 7 - Gráfico com principais resíduos na interação MRK-1-hMPV polimerase. É descrito (à direita) o raio de sítio de ligação em que o resíduo se encontra, a energia de interação individual deste resíduo com MRK-1 (amarelo para constante dielétrica de

CÓDIGO: SB1771

AUTOR: ANDRIELLY OLIVEIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: MELQUISEDEC ABIARE DANTAS DE SANTANA

TÍTULO: EXPRESSÃO DE FOS NO TÁLAMO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES AGENTES ANESTÉSICOS APÓS ESTÍMULO NOCICEPTIVO

Resumo

A dor visceral representa um desafio científico pela complexidade de suas vias neurais e pela sobreposição entre componentes sensoriais e emocionais. O tálamo, especialmente seus núcleos da linha média e intralaminares, exerce papel central nesse processamento, funcionando como elo entre a transmissão nociceptiva e a integração cognitivo-afetiva. O presente estudo avaliou os efeitos da ketamina associada à xilazina e do isoflurano sobre a expressão de c-Fos em núcleos talâmicos de ratos Wistar submetidos a estímulo nociceptivo visceral. Após os procedimentos, os encéfalos foram analisados por imunohistoquímica e as células imunorreativas quantificadas nos núcleos Paraventricular (PV), Reuniens (Re), Central medial (CM) e Rombóide (Rh). No grupo controle, observou-se ativação predominante nos núcleos PV, Re e CM, confirmando sua participação no processamento da dor visceral. O grupo tratado com ketamina+xilazina apresentou ativação difusa em quase todos os núcleos, mas apenas o Rombóide (Rh) mostrou diferença significativa em relação ao controle ($p=0,027$), destacando-se como possível ponto-chave na integração sensorio-emocional da dor devido às suas amplas conexões com regiões corticais e subcorticais. Já o isoflurano exerceu efeito supressor pronunciado, restringindo a ativação ao núcleo PV e reduzindo de forma significativa a expressão de c-Fos ($p=0,007$), sugerindo inibição da propagação nociceptiva.

Palavras-chave: Dor visceral / Tálamo / c-Fos / Anestésicos

TITLE: FOS EXPRESSION IN THE THALAMUS OF RATS UNDERGOING DIFFERENT ANESTHETIC AGENTS AFTER NOCICEPTIVE STIMULATION

Abstract

Visceral pain represents a scientific challenge due to the complexity of its neural pathways and the overlap between sensory and emotional components. The thalamus, particularly its midline and intralaminar nuclei, plays a central role in this process, acting as a bridge between nociceptive transmission and cognitive-affective integration. This study evaluated the effects of ketamine combined with xylazine and of isoflurane on c-Fos expression in thalamic nuclei of Wistar rats subjected to visceral nociceptive stimulation. After the procedures, brains were analyzed by immunohistochemistry, and immunoreactive cells were quantified in the Paraventricular (PV), Reuniens (Re), Central medial (CM), and Rhomboid (Rh) nuclei. In the control group (saline), predominant activation was observed in the PV, Re, and CM nuclei, confirming their involvement in visceral pain processing. The ketamine+xylazine group showed widespread activation in almost all nuclei, but only the Rhomboid (Rh) nucleus presented a statistically significant increase compared to control

($p=0.027$), highlighting its role as a key site for the sensory-emotional integration of pain due to its extensive cortical and subcortical connections. Isoflurane, on the other hand, exerted a marked suppressive effect, restricting activation to the PV nucleus and significantly reducing c-Fos expression in this region ($p=0.007$), suggesting inhibition of thalamic nociceptive propagation.

Keywords: Visceral pain / Thalamus/ c-Fos/ Anesthetics

Introdução

“Uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou semelhante àquela relacionada a uma lesão tecidual real ou potencial” esse é o conceito de dor criado pelo International Association for the Study of Pain (IASP). A percepção da dor é individual e influenciada por experiências passadas, demonstrando a complexidade desse fenômeno que tem sua importância como mecanismo crucial de alerta e proteção do organismo (BASTOS et al. 2007).

Embora um estímulo nocivo possa desencadear uma lesão real, não é garantido que resulte em dor imediata, assim é necessário a distinção entre os termos dor e nocicepção: o primeiro envolve a percepção consciente de um estímulo aversivo, enquanto o segundo refere-se aos mecanismos pelos quais estímulos nocivos são detectados pelo sistema nervoso periférico, codificados, transferidos e processados inconscientemente pelo sistema nervoso central, resultante da ativação dos receptores sensoriais especializados, chamados nociceptores (MISCHKOWSKI, D. et al, 2018).

Tálamo

O tálamo é uma estrutura localizada no diencefalo, onde se evidenciam vários núcleos, cada um deles trabalhando em transmitir um tipo de sinal aferente para o córtex cerebral (SHERMAN; GUILLER, 2001). Dentre eles, se destacam os núcleos da linha média (LM) e os núcleos intralaminares (IL). Os núcleos IL localizam-se dentro da lâmina medular interna do tálamo e dividem-se em grupo anterior: núcleo central medial (CM), paracentral (PC) e central lateral (CL) (STANDRING, 2016); e grupo posterior: núcleo parafascicular (PF), presente em ratos, e centromediano (CMn), ausente nessa espécie (JONES, 2007). Já os núcleos LM, subdividem-se em ventrais: núcleos rombóide (Rh) e reuniens (Re), e dorsais: os núcleos, paratenial (PT), intermediodorsal (IMD) e paraventricular do tálamo (PVT) (GROENEWEGEN; BERENDSE, 1994).

c-Fos

O gene c-fos pertence aos genes de expressão imediata (IEGs), e codifica a proteína FOS. São ativados rapidamente por estímulos extrínsecos e sem a necessidade de uma nova síntese proteica (Morgan e Curran, 1995). É largamente utilizado como marcador anatômico de neurônios ativados, pois apresenta baixa expressão sob condições basais, rápida indução, resposta transitória e fácil detecção da expressão (Morgan, et. al, 1987). A imunohistoquímica com anticorpos c-fos é uma ferramenta essencial para compreender a neuroanatomia dinâmica, incluindo a plasticidade neural, atividade funcional e a modulação sináptica (Hoffman, Smith, Verbalis, 1993).

Anestésicos

A palavra anestesia tem origem grega e pode ser traduzida como “insensibilidade”. O dentista William W. Morton, em 1846, demonstrou a possibilidade de executar uma cirurgia sem dor e sem a consciência do paciente, utilizando éter (REZENDE, 2009).

Os agentes anestésicos estão divididos em dois grupos: inalatórios e intravenosos.

Neste trabalho destacam-se o isoflurano e a ketamina. O isoflurano, anestésico inalatório, possui fácil eliminação, tem baixo risco de toxicidade hepática ou renal e é indicado para anestesia geral (Nocite, 1987). Já a ketamina, é um anestésico intravenoso que provoca a anestesia dissociativa, atua diminuindo as atividades talamocorticais, e aumentando as atividades límbicas e hipocampusais. Entre suas vantagens estão: rápido tempo de ação, amnésia, analgesia profunda e a sedação com manutenção de funções vitais, além do baixo custo (Domino et al. 1965).

Assim, este estudo busca compreender como os agentes anestésicos atuam nas bases neurais do processamento da dor, especialmente no tálamo. Para isso, será utilizado o marcador neuronal c-Fos para identificar áreas ativadas e avaliar o efeito modulador dos fármacos. Os resultados poderão ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de ação da anestesia e subsidiar a melhoria de protocolos experimentais, promovendo bem-estar animal e reduzindo sofrimento e mortalidade em procedimentos invasivos.

Metodologia

Nesta pesquisa foram utilizados 12 ratos machos, Wistar, adultos jovens, número avaliado como o mínimo para se obter os resultados esperados. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3 animais por gaiola), em ambiente sob condições ideais de temperatura (22-23°C) e no ciclo claro/escuro 12/12 horas, com alimentação e água à disposição.

Todos os procedimentos seguiram as normas do Comitê de Ética para Uso de Animais da UFRN (CEUA-UFRN), em conformidade às normas e princípios da Lei Arouca, a qual versa sobre o tratamento de animais em pesquisas e atividades científicas (protocolo de número 009/2012). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neuroanatomia, Departamento de Morfologia, UFRN, Campus Central.

Delineamento experimental

Cada grupo foi composto por 4 animais, sendo administrado uma dose de ácido acético intraperitoneal a 5% na dosagem de 0.5ml/100g de peso do animal. O grupo controle não recebeu nenhuma dose prévia de nenhum dos anestésicos testados. Os grupos experimentais receberam, previamente, uma dose de um dos anestésicos testados neste estudo (Ketamina-xilazina ou isoflurano). A ketamina foi utilizada na dose de 100mg/kg, e xilazina 5mg/kg, sendo feito repiques de metade da dose mãe quando havia a superficialização do plano anestésico. O isoflurano foi utilizado a 4% para indução e 1,5% para manutenção. Após 90 min, os animais foram eutanasiados e submetidos à perfusão transcardíaca para posterior remoção dos encéfalos.

Perfusões e microtomias

Após alcançar o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, submetidos à toracotomia e cardiopunção no ventrículo esquerdo, utilizando agulha de 16G (1,6 x 17 mm). A agulha foi conectada a uma bomba peristáltica, passando-se 300 ml de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4 (TF), acrescida com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000 ml de solução salina), a uma velocidade de 2 ml/minuto. Em seguida, foi adicionado 600ml de Solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído 4% tamponado e ácido pícrico 0,4%), em PB, a um fluxo de 5 ml/minuto.

Após a perfusão foi realizada a craniotomia, e em seguida, os encéfalos passaram pela fixação aldeídica, acrescida de sacarose a 30% por 4 horas e, posteriormente, alocados em outra solução de sacarose a 30% em PB até serem submetidos à microtomia.

Os encéfalos foram congelados em gelo seco e seccionados em um micrótomo de deslizamento, obtendo-se cortes coronais de 30 µm, os quais foram distribuídas sequencialmente em 6 compartimentos, em um meio líquido contendo PB. Cada um desses compartimentos continha 1 de 6 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte foi de aproximadamente 180 µm dentro do mesmo compartimento. As secções foram armazenadas em PB e conservadas a 4°C até a realização das reações imunohistoquímicas.

Imunohistoquímica

As secções dos compartimentos foram submetidas a imunoistoquímica para revelação da proteína c-Fos. Foi utilizado o protocolo avidina-biotina-peroxidase (ABC), que consistiu nas etapas: Após 3 lavagens de 10 minutos cada, em tampão fosfato 0,1 M, PH 7,4 em agitador orbital, as secções foram submetidas ao pré-tratamento para abolição de artefatos e recuperação de antigenicidade com boridreto de sódio e água oxigenada. Após 3 lavagens de 20 minutos cada, as secções foram incubadas no anticorpo primário específico para c-Fos (Rabbit anti-c-fos - Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) (Free floating sections: dilution 1:2000) diluído em tampão fosfato 0,1M, PH 7,4, em Triton X 100 a 0,4%, contendo soro normal do animal em que foi obtido o anticorpo secundário a 2% (Donkey serum) por um período de 12 a 72 horas, em rotor com rotação lenta, à temperatura ambiente (12 a 24 horas) ou a 4°C (24 a 72 horas). Seguiram-se 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato em agitador orbital, e em seguida as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotinilado contra as proteínas do animal em que foi obtido o anticorpo primário (biotinylated donkey anti-rabbit, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. Westgrove, USA) (Dilution 1:400, free floating), em rotor, por um período de 90 minutos.

Logo após, foram realizadas mais 3 lavagens de 10 minutos cada e então as secções foram

colocadas em contato com o complexo avidina-biotina-HRP (Protocolo ABC Kit elite da Vector), à diluição de 1:100, durante 90 minutos. Para visualização da reação, após 4 lavagens de 10 minutos cada, em tampão fosfato, em agitador orbital, as secções foram postas em contato com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (substrato) e a tetrahidrocloroto-diaminobenzidina (DAB) (cromógeno). Ao final da reação, as secções foram submetidas a quatro lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato em agitador orbital.

As secções foram montadas no sentido rostrocaudal em lâminas gelatinizadas. Após secarem, foram mergulhadas rapidamente em solução de tetróxido de ósmio a 0.005% para intensificação da reação. Em seguida as secções passaram por uma bateria de álcoois de graduação sucessivamente mais altas até o álcool absoluto, finalizando com o xilol. As lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando-se um meio de montagem sintético à base de polímeros plásticos.

Quantificação da imunomarcção

A contagem das células Fos-positivas foi realizada manualmente no software Nis Elements, tomando como referência o atlas estereotático do encéfalo de rato (Paxinos & Watson, 2007). Foram avaliados os núcleos talâmicos de interesse nos grupos controle e experimentais.

Análise estatística

A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas previamente. Os núcleos que apresentaram distribuição normal dos dados foram submetidos ao teste t independente, por sua vez os núcleos que tiveram em pelo menos um grupo, a distribuição não-normal dos dados foram submetidos ao teste não-paramétrico, U de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas no software RStudio, considerando signi

Resultados e Discussões

A compreensão dos efeitos dos anestésicos nos núcleos talâmicos é de profundo interesse para esclarecer os mecanismos da modulação nociceptiva, e como consequência ofertar a otimização de protocolos que assegurem o bem-estar animal. Os núcleos da linha média e intralaminares do tálamo têm sido reconhecidos pelo seu papel na percepção de informações táteis e nociceptivas. Várias evidências embasam essa interpretação: estudos anatômicos demonstram que esses núcleos recebem aferências nociceptivas oriundas das vias espinotalâmica e espinorreticulotalâmico; experimentos eletrofisiológicos mostraram que tais estruturas respondem a estímulos nocivos, enquanto estudos de neuroimagem funcional revelam ativação talâmica durante a percepção vibrotátil e em processos de modulação da dor. Ademais, como esses núcleos projetam-se para o córtex do cíngulo, sugere-se que sua participação não se restrinja ao processamento sensorial, mas envolva também o componente afetivo da experiência dolorosa (VAN DER WERF; WITTER; GROENEWEGEN, 2002). Estudos anteriores já reconheciam a relevância dos núcleos da linha média e intralaminares,

na modulação do processo da dor por apresentarem conectividade bidirecional específica com áreas do córtex e do estriado, e também por sua participação em uma variedade de funções distintas, destacando-se a vigilância e a excitação, a nocicepção, o estresse, a memória, a cognição e os comportamentos motivados ((GROENEWEGEN; BERENDSE, 1994, VAN DER WERF; WITTER; GROENEWEGEN, 2002).

Após estímulo nociceptivo visceral, a expressão de c-fos foi observada em núcleos da linha média e intralaminares do tálamo no grupo controle. O núcleo Paraventricular (PV) apresentou maior abundância de células imunorreativas (1.665 células), seguido do núcleo Reuniens (Re) com 142 células e Central medial (Cm) com 81 células. Nos núcleos Rombóide (Rh)(3 células), núcleo Intermédiodorsal (IMD)(9 células) e Central lateral (Cl)(6 células), a ativação foi menos expressiva. O núcleo Parafascicular (PF) não apresentou células imunorreativas no grupo controle.

A avaliação dos mesmos núcleos após a administração do agente anestésico ketamina associada à xilazina revelou ativação neuronal em todos os núcleos da linha média — PV (1.537 células), PT (242 células), IMD (105 células), Rh (91 células) e Re (548 células) — e nos núcleos intralaminares — Cm (93 células), Cl (124 células), PC (8 células) e PF (53 células). O mesmo padrão foi observado em camundongos, segundo Hu et al. (2024): “O KET induz ativação generalizada em todo o cérebro, com atividade aumentada em um cluster-chave que inclui núcleos corticais e cerebrais que governam processos sensoriais, emocionais e motores complexos, destacando assim sua notável influência nas funções de ordem superior” (p.12). Em contraste, o grupo de animais tratados com o anestésico isoflurano, demonstrou ativação restrita ao PV. Esse achado sugere uma ação supressora do isoflurano sobre a expressão de c-Fos, corroborando evidências de que agentes anestésicos podem modular diferencialmente a atividade neuronal em núcleos talâmicos ((BU et al., 2022)

.

Modulação da expressão de c-fós após a administração de anestésicos

Para avaliar a capacidade dos anestésicos na modulação da atividade neuronal, provocada pela indução da nocicepção visceral, foram analisados os grupos tratados com ketamina+xilazina e isoflurano em comparação com o grupo controle.

No grupo ketamina+xilazina houve a expressão de atividade neuronal para todos os núcleos da linha média e intralaminares, no entanto não apresentou resultados significantes estatisticamente quando comparados ao grupo controle ($p>0,05$), exceto o núcleo Rh que apresentou um valor de $p=0,027$. entrando em concordância com A literatura que sugere que a ketamina, inibe preferencialmente as entradas glutamatérgicas mediadas por receptores NMDA nos interneurônios GABAérgicos, levando a uma atividade excitatória anormal no córtex, hipocampo e sistema límbico, em última instância, à perda da consciência. (BROWN; LYDIC; SCHIFF, 2010, (HU et al., 2024) O núcleo Rh, presente na linha média do tálamo, é um grupo pequeno de células, situado imediatamente dorsal ao núcleo Reuniens (Re). recebe aferências de estruturas como o tronco encefálico, particularmente aferentes serotoninérgicos dos núcleos raí, além de outras fontes significativas como da formação reticular, do núcleo tegmental dorsal lateral, da substância negra, do núcleo supramamilar. ((VERTES; LINLEY; HOOVER, 2010). Além disso o Rh também recebe aferências corticais decorrentes dos córtices infralímbico, pré-límbico, cingulado anterior e agranular medial (VERTES, 2003).

O núcleo Rombóide (Rh) apresenta projeções amplas para diferentes áreas corticais, incluindo regiões pré-frontais, cingulado, motoras, somatossensoriais, viscerais, insulares e entorrinal. Essa ampla distribuição indica que o Rh não se restringe a circuitos límbicos, mas atua como um importante elo entre processamento sensorial, funções cognitivas e integração emocional (VAN DER WERF; WITTER; GROENEWEGEN, 2002). Dispõe também de amplas projeções subcorticais, com fibras que se estendem por regiões relevantes no processamento da dor, como, o núcleo accumbens e a amígdala, neste último com ênfase ao núcleo basolateral (BLA) (VERTES; LINLEY; HOOVER, 2015).

No grupo tratado com a combinação de ketamina e xilazina, observou-se expressão de atividade neuronal em todos os núcleos da linha média e intralaminares do tálamo. No entanto, a maioria desses núcleos não apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparada ao grupo controle ($p > 0,05$). Uma exceção notável foi o núcleo Rombóide (Rh), que demonstrou um aumento estatisticamente significativo na expressão de atividade neuronal ($p = 0,027$). Este achado no núcleo Rh corrobora a literatura que sugere um papel relevante deste núcleo na modulação da dor e na integração de informações sensoriais e emocionais. A ketamina, em particular, é conhecida por sua ação inibitória sobre as entradas glutamatérgicas mediadas por receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, o que pode levar a alterações na atividade excitatória em diversas áreas cerebrais, incluindo o córtex e o sistema límbico, contribuindo para a perda da consciência (BROWN; LYDIC; SCHIFF, 2010; HU et al., 2024). O núcleo Rombóide (Rh), um pequeno grupo de células localizado na linha média talâmica, imediatamente dorsal ao núcleo Reuniens (Re), recebe aferências de múltiplas fontes. Estas incluem projeções serotoninérgicas do tronco encefálico, particularmente dos núcleos da rafe, além de contribuições significativas da formação reticular, do núcleo tegmental dorsal lateral, da substância negra e do núcleo supramamilar (VERTES; LINLEY; HOOVER, 2010). Adicionalmente, o Rh recebe aferências corticais importantes provenientes dos córtices infralímbico, pré-límbico, cingulado anterior e agranular medial (VERTES, 2003). A ampla distribuição das projeções do núcleo Rh para diversas áreas corticais – como regiões pré-frontais, cinguladas, motoras, somatossensoriais, viscerais, insulares e entorrinal – sugere que sua função transcende os circuitos límbicos. Ele atua como um elo crucial entre o processamento sensorial, funções cognitivas e a integração emocional (VAN DER WERF; WITTER; GROENEWEGEN, 2002). Complementarmente, o Rh possui amplas projeções subcorticais, incluindo o núcleo accumbens e a amígdala (com ênfase no núcleo basolateral – BLA), regiões intimamente envolvidas no processamento da dor e nas respostas afetivas a ela (VERTES; LINLEY; HOOVER, 2015).

Em contra partida, o grupo tratado com o Isoflurano, exibiu redução significativa na expressão de c-fos, em destaque, o núcleo PV ($p = 0,007$), enquanto nos demais núcleos a ativação foi ausente. O que pode ter como explicação a supressão da expressão de c-Fos evocado por estímulos nociceptivos nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal que está incluída como via importante no processo de transmissão da nocicepção (ZHANG et al., 2021).

Conclusão

Este estudo evidencia que os núcleos da linha média e intralaminares do tálamo desempenham papel central na integração do processamento nociceptivo e na modulação da dor visceral, corroborando a literatura que atribui a essas estruturas funções sensoriais e

afetivas. A expressão de c-Fos, utilizada como marcador de ativação neuronal, mostrou-se um recurso eficaz para mapear a atividade neuronal em resposta a estímulos nociceptivos e à administração de anestésicos.

No grupo controle, observou-se ativação significativa nos núcleos Paraventricular (PV), Reuniens (Re) e Central medial (CM), indicando que estes núcleos respondem diretamente ao estímulo doloroso. A administração de ketamina associada à xilazina promoveu ativação generalizada em quase todos os núcleos analisados, porém apenas o núcleo Rombóide (Rh) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, sugerindo que este núcleo pode ser particularmente sensível à modulação induzida por anestésicos dissociativos e desempenha papel relevante na integração de informações sensoriais, cognitivas e emocionais. As projeções amplas do Rh para áreas corticais e subcorticais reforçam seu potencial papel como elo entre nocicepção e resposta afetiva à dor.

Em contraste, o isoflurano apresentou efeito supressor pronunciado, com ativação restrita ao núcleo PV e redução significativa da expressão de c-Fos, indicando que este anestésico inalatório limita a propagação da atividade neuronal induzida por estímulos nociceptivos, possivelmente atuando na supressão da transmissão talâmica de sinais dolorosos.

Os achados demonstram que diferentes anestésicos modulam seletivamente a atividade neuronal talâmica, destacando a importância de compreender seus efeitos sobre os circuitos de dor para otimizar protocolos experimentais e promover bem-estar animal. Além disso, os resultados reforçam a relevância do tálamo, e especialmente do núcleo Rombóide, como região-chave na integração de estímulos nociceptivos e na modulação da experiência dolorosa.

Referências

VERTES, R. P.; LINLEY, S. B.; HOOVER, W. B. Limbic circuitry of the midline thalamus. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 54, p. 89–107, jul. 2015.

VERTES, R. P.; LINLEY, S. B.; HOOVER, W. B. Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat. *Brain Structure and Function*, v. 215, n. 1, p. 1–28, 13 abr. 2010

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, v. 51, n. 1, p. 32–58, 2003.

ZHANG, D. et al. Identifying c-fos Expression as a Strategy to Investigate the Actions of General Anesthetics on the Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, v. 20, n. 1, p. 55–71, 10 set. 2021.

VAN DER WERF, Y. D.; WITTER, M. P.; GROENEWEGEN, H. J. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Research Reviews*, v. 39, n. 2-3, p. 107–140, set. 2002.

BROWN, E. N.; LYDIC, R.; SCHIFF, N. D. General Anesthesia, Sleep, and Coma. New England Journal of Medicine, v. 363, n. 27, p. 2638–2650, 30 dez. 2010.

GROENEWEGEN, H. J.; BERENDSE, H. W. The specificity of the “nonspecific” midline and intralaminar thalamic nuclei. Trends in Neurosciences, v. 17, n. 2, p. 52–57, jan. 1994.

HU, Y. et al. Comparative Brain-Wide Mapping of Isoflurane and Ketamine-Activated Nuclei and Functional Networks. PubMed, 10 jan. 2024.

BU, X. et al. Glutamatergic neurons in paraventricular nucleus of the thalamus regulate the recovery from isoflurane anesthesia. BMC Anesthesiology, v. 22, n. 1, 11 ago. 2022.

BASTOS, D. F. et al. Dor. Revista da Sociedade Brasileira de Psicologia Hospitalar, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 85–96, jun. 2007

MISCHKOWSKI, D. et al. Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses. Pain, v. 159, n. 4, p. 699–711, abr. 2018.

SHERMAN, S. M.; GUILLERY, R. W. Exploring the Thalamus. Elsevier Science, 2001

STANDRING, S. Gray’s Anatomy: the anatomical basis of clinical practice. Elsevier, 2016.

MORGAN, J. et al. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. Science, v. 237, n. 4811, p. 192–197, 1987. DOI: 10.1126/science.3037702.

HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. Frontiers in Neuroendocrinology, v. 14, n. 3, p. 173–213, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/frne.1993.1006>.

REZENDE, J. M. de. Breve história da anestesia geral. In: _____. À sombra do Plátano: crônicas de história da medicina. p. 103–109, 2009.

NOCITE, J. R. Isoflurano, vantagens e desvantagens. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 37, n. 4, p. 253–259, jul./ago. 1987.

DOMINO, E. F. et al. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man. Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 6, p. 279–291, 1965. DOI: 10.1002/cpt196563279.

Anexos

grafico 1

CÓDIGO: SB1777

AUTOR: WINICIUS MATEUS MAGALHAES COSTA

ORIENTADOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

TÍTULO: Fenologia de *Myrcia* (Myrtaceae) na Mata Atlântica com base em dados de herbário.

Resumo

Os herbários são coleções botânicas que possuem uma grande quantidade de informações. O processo de digitalização dessas coleções tem permitido a disponibilização de cada vez mais espécimes com dados fenológicos. A utilização desses registros permite a reconstrução de séries temporais longas para avaliar linhagens de plantas mais resilientes ou vulneráveis aos efeitos das mudanças climáticas. O presente trabalho tem como objetivo 1) coletar dados fenológicos de 6 espécies de *Myrcia* com base em registros de herbário, 2) avaliar a congruência desses resultados com trabalhos de campo e assim 3) fornecer um calendário da reprodução de cada uma delas que venha a subsidiar ações de manejo e conservação. Um banco de dados foi formado com imagens e informações textuais de exsicatas digitalizadas utilizando a rede speciesLink (speciesLink). A distribuição temporal das fenofases foi estimada a partir da estatística circular. Um mapa de distribuição espacial dos registros amostrados foi gerado a partir do QGIS para cada espécie. Um total de 180 registros foram analisados com *Myrcia multiflora* e *Myrcia glabra* representando 65,5% desse total. Foram encontradas informações de campo para *Myrcia costeira*, *Myrcia multiflora* e *Myrcia vellozi*. As datas de pico das fenofases de para estas 3 espécies com dados de campo estavam dentro do intervalo recuperado pelos dados de herbário, corroborando o uso dos dados de herbário para a construção de calendário de oferta de recursos.

Palavras-chave: Herbário; Fenologia; Myrtaceae; Conservação.

TITLE: Phenology of *Myrcia* (Myrtaceae) in the Atlantic Forest based on herbarium data.

Abstract

Herbaria are botanical collections that contain a large amount of information. The digitization of these collections has enabled the availability of an increasing number of specimens with phenological data. The use of these records allows the reconstruction of long-term time series to assess plant lineages that are more resilient or vulnerable to the effects of climate change. The present study aims to: (1) collect phenological data of six *Myrcia* species based on herbarium records; (2) evaluate the congruence of these results with field studies; and (3) provide a reproductive calendar for each species to support management and conservation actions. A database was assembled with images and textual information from digitized specimens using the speciesLink network (speciesLink). The temporal distribution of phenophases was estimated using circular statistics. A spatial distribution map of the sampled records was generated with QGIS for each species. A total of 180 records were analyzed, with *Myrcia multiflora* and *Myrcia glabra* accounting for 65.5% of the total. Field

information was found for *Myrcia costeira*, *Myrcia multiflora*, and *Myrcia vellozoi*. The peak dates of phenophases for these three species with field data fell within the range recovered from herbarium data, supporting the use of herbarium records to construct resource availability calendars.

Keywords: Herbarium; Phenology; Myrtaceae; Conservation.

Introdução

As coleções de história natural são ferramentas fundamentais que auxiliam no entendimento da biodiversidade da Terra. A abrangência de seus dados cobre escalas temporais de milhões de anos até o presente, sendo utilizadas em estudos relacionados à biologia evolutiva, filogenética, conservação e ecologia (Suarez & Tsutsui, 2004). Em razão dessa importância, sua manutenção é uma tarefa urgente (Davis, 1996; Ponder et al. 2001).

As coleções botânicas, em especial, possuem um grande volume de dados. Atualmente, existem 3.567 herbários no mundo (<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>). Nesse contexto, os projetos de digitalização têm avançado continuamente, tornando esses dados mais acessíveis a cientistas e também ao público em geral (Hidle, 2006). Como resultado, um número crescente de espécimes com dados fenológicos está disponível e esta informação tem se mostrado rica para a pesquisa científica (citar ex)

Fenologia é o estudo de eventos biológicos que se repetem (Visser, 2022). Dentro desse conceito está a reprodução das plantas, tais como eventos de frutificação e floração (Fenner 1998). Em função do aquecimento global, atrasos e antecipações desses eventos estão sendo registrados (Parmesan, 2007; Chambers et al. 2013), com impacto na manutenção da biodiversidade, uma vez que muitas espécies de animais utilizam as flores, frutos e sementes como alimento ou abrigo (Mendonza et al. 2017). Contudo, o conhecimento que temos sobre estes impactos baseia-se principalmente em ambientes situados no hemisfério norte, visto que esse fenômeno tem sido pouco estudado nos trópicos (Chambers et al. 2013).

Nesse contexto, abordagens para explorar a fenologia nos ambientes tropicais são pertinentes e algumas já foram propostas (Morellato et al. 2016). Uma dessas abordagens consiste em combinar os registros de herbários para reconstruir séries temporais mais extensas (Proença et al. 2012; Silva & Proença, 2014) ou testar a presença de sinal filogenético (e.g., Staggemeier et al. 2015), de modo a identificar linhagens de plantas mais resilientes ou mais vulneráveis aos efeitos do aquecimento global.

Diante disso, este projeto tem como objetivo coletar dados fenológicos de *Myrcia anceps* (Berg, 1857), *Myrcia costeira* (Santos et al. 2015), *Myrcia glabra* (Berg, 1857), *Myrcia micropetala* (Niedenzu, 1893), *Myrcia multiflora* (de Candolle, 1828) e *Myrcia vellozoi* (Mazine et al. 2014) com base em registros de herbário e testar a congruência entre esses dados e aqueles obtidos em campo para as espécies com dados disponíveis. Esses dados serão incluídos no projeto PVA22165-2024 – Fenologia e mudanças climáticas: quais as previsões para o futuro das plantas da Mata Atlântica? –, com o objetivo de entender o impacto do aquecimento global nos grupos amostrados. Nesta iniciação científica, como produto será ofertado um calendário fenológico de cada uma das espécies que servirá de base para ações de manejo e conservação. O gênero foi escolhido devido à sua representatividade no Brasil (Santos et al. 2025), bem como sua importância para a fauna (Gressler et al. 2006; Staggemeier et al. 2017) e flora (Oliveira-Filho & Fontes, 2000).

Metodologia

Um banco de dados foi formado a partir de imagens e informações textuais de exsicatas digitalizadas de 6 espécies de *Myrcia*, disponíveis na base de dados speciesLink (disponível em: <https://specieslink.net/search/>). Para essa busca foram recuperadas as informações da espécie combinando o nome científico e registros que tivessem imagem disponível. Um arquivo textual com as informações detalhadas destas coletas foi salvo e colunas adicionais incluídas para tabulação das informações fenológicas que foram obtidas através da análise das imagens. Foram incluídos aqui apenas registros checados por experientes taxonomistas. As fenofases observadas foram classificadas em quatro estágios reprodutivos da planta, a saber: botão floral, flor em antese, frutos imaturos e frutos maduros, diferenciados com base no tamanho e no formato deles. Os registros duplicados foram combinados e erros de georreferenciamento ou indisponibilidade de coordenadas corrigidos.

A distribuição temporal das fenofases foi estimada a partir da estatística circular (Staggemeier et al. 2020, Morellato et al. 2010) e parâmetros descritivos foram extraídos para representar a fenologia de cada espécie (ângulo médio, data média e número de registros). A sazonalidade fenológica foi testada com o teste de Rayleigh e sua intensidade expressa através do comprimento do vetor r (Morellato et al. 2010). Para as fenofases sem sazonalidade, a data média não foi representada. A fenologia de cada espécie será comparada com as observações in situ das espécies com dados disponíveis em Staggemeier et al. (2010, 2015). Um mapa da distribuição espacial dos registros analisados foi feito a partir do QGIS versão 3.40 (disponível em: <https://qgis.org>).

Resultados e Discussões

Um total de 180 registros foi amostrado, dos quais *Myrcia glabra* e *Myrcia multiflora* representam 65,5% desse total (Tabela 1). *Myrcia micropetala* apresentou o menor número de registros analisados, totalizando 6 registros (Tabela 1), esta é uma espécie endêmica da Bahia e com distribuição restrita. Do total de registros, 55% estavam em botão, aproximadamente 36,6% estavam em antese, cerca de 31,6% apresentaram frutos imaturos e aproximadamente 16,6%, frutos maduros (Tabela 1).

A distribuição espacial dos registros concentrou-se na Mata Atlântica (Figura 1), com apenas *Myrcia multiflora* sendo uma espécie de ampla distribuição. No total, foram gerados 21 histogramas circulares (Figura 2). Das seis espécies, apenas *Myrcia micropetala* e *Myrcia vellozi* não possuem um gráfico para cada fenofase, devido à primeira não apresentar, entre os registros amostrados, as fenofases de botão floral e fruto maduro, e à segunda não apresentar, entre os registros, a fenofase de fruto maduro.

Com base nos registros analisados, a distribuição temporal das fenofases de botão floral e antese (floração) de *Myrcia anceps*, *M. costeira*, *M. micropetala* e *M. multiflora* possuem a data média de pico de atividade no mês de novembro, já *Myrcia vellozi* em janeiro (Figura 2). O período de floração de *Myrcia glabra* ocorre entre os meses de março e maio, com pico em abril, diferentemente do padrão registrado para a família na literatura que predomina entre os meses de outubro a março, com maior frequência de espécies entre novembro e janeiro (Staggemeier et al. 2010, 2015) (Figura 2). O período de amadurecimento dos frutos variou bastante entre as espécies (Figura 2) e pode estar relacionado a diferenças na morfologia dos frutos e sementes que têm distintas necessidades fisiológicas (Staggemeier et al. 2015).

Em um estudo realizado de julho de 2005 a dezembro de 2007, no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Staggemeier et al. (2010) monitoraram a fenologia reprodutiva de 550 árvores pertencentes a 34 espécies de Myrteae, por meio de observações mensais feitas durante o período mencionado. Cinquenta e nove indivíduos de *Myrcia multiflora*, 12 indivíduos de *Myrcia vellozoi* e 10 indivíduos de *Myrcia costeira* estiveram entre os grupos amostrados. Para cada indivíduo, foram calculadas cinco variáveis fenológicas para cada fenofase reprodutiva: data de início, data de pico, duração, tempo de desenvolvimento da flor e tempo de desenvolvimento do fruto.

A data de pico de *Myrcia multiflora* para botão floral (21 de dezembro), flor (12 de janeiro), fruto imaturo (3 de fevereiro) e fruto maduro (25 de março) cai dentro do intervalo recuperado pelos dados de herbário (Figura 2). A data de pico de *Myrcia vellozoi* para botão floral (24 de novembro), flor (16 de dezembro) e fruto imaturo (21 de janeiro) também é recuperada pelos dados de herbário (Figura 2). Entre as datas de pico de *Myrcia costeira* para botão floral (26 de novembro), flor (9 de janeiro), fruto imaturo (8 de março) e fruto maduro (25 de maio), apenas a data de floração não foi recuperada pelos dados de herbário (Figura 2), evidenciando um padrão geral de congruência entre os dados analisados e aqueles observados em campo. Não foram encontrados dados de campo para as demais espécies de *Myrcia* analisadas neste estudo.

Conclusão

Os estudos de fenologia de campo possibilitam validar a capacidade de predição de modelos teóricos construídos a partir de bases de dados já disponíveis, como os herbários (Silva & Proença, 2014) e os resultados encontrados aqui corroboram essa afirmação. A correspondência entre os dados de herbário e os dados de campo reforça um padrão já registrado em outros estudos mas ainda pouco explorado em florestas tropicais as quais têm padrões fenológicos mais complexos. Este trabalho segue em andamento e mais registros serão incluídos para cada espécie na próxima fase. Tendências espaciais ainda serão exploradas. As informações de períodos de reprodução recuperadas aqui são úteis para delinear melhores estratégias de manejo e conservação dos recursos ofertados por estas espécies de *Myrcia*.

Referências

Berg, O., Fl. bras., 14(1): 186, 1857.

Berg, O., Flora Brasilensis, 14(1): 119, 1857.

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.

de Candolle, Prodr., 3: 244, 1828.

Davis, P. S. (1996). Museums and the natural environment: the role of natural history museums in biological conservation. Leicester Museum Studies.

Fenner, M. (1998). The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1(1), 78-91.

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.

Hine, C. (2006). Databases as scientific instruments and their role in the ordering of scientific work. *Social Studies of Science*, 36(2), 269-298.

Lavoie, C., & Lachance, D. (2006). A new herbarium-based method for reconstructing the phenology of plant species across large areas. *American Journal of Botany*, 93(4), 512-516.

Mazine, F. F., Santos, M. F., & Lucas, E. (2014). *Phytotaxa*, 173(1): 98.

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.

Miller-Rushing, A. J., Primack, R. B., Primack, D., & Mukunda, S. (2006). Photographs and herbarium specimens as tools to document phenological changes in response to global warming. *American Journal of Botany*, 93(11), 1667-1674.

Morellato, L. P. C., Alberti, L. F., & Hudson, I. L. (2009). Applications of circular statistics in plant phenology: a case studies approach. In *Phenological research: methods for environmental and climate change analysis* (pp. 339-359). Dordrecht: 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.

Niedenzu, F., *Nat. Pflanzenfam.* [Engler & Prantl], 3(7): 76, 1893.

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.

Parmesan, C. (2007). Influences of species, latitudes and methodologies on estimates of phenological response to global warming. *Global Change Biology*, 13(9), 1860-1872.

Ponder, W. F., Carter, G. A., Flemons, P., & Chapman, R. R. (2001). Evaluation of museum collection data for use in biodiversity assessment. *Conservation Biology*, 15(3), 648-657.

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.

Robbirt, K. M., Davy, A. J., Hutchings, M. J., & Roberts, D. L. (2011). Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: a case study with the orchid *Ophrys sphegodes*. *Journal of Ecology*, 99(1), 235-241.

Santos, M. F., Lucas, E., & Sano, P. T. (2015). Five new South American species of *Myrcia* s.l. (Myrtaceae). *Phytotaxa*, 234(2), 159.

Santos, M. F., Amorim, B. S., Burton, G. P., Fernandes, T., Gaem, P. H., Lourenço, A. R. L., Lima, D. F., Rosa, P. O., Santos, L. L. D., Staggemeier, V. G., Vasconcelos, T. N. C., & Lucas, E. J. Myrcia in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10660>. Acesso em: 25 mar. 2025.

Silva, J. S., & Proença, C. E. B. (2014). Padrões fenológicos no Distrito Federal: congruência entre dados de herbário e estudos em campo. *Heringeriana*, 6(1), 87–89.

Staggemeier, V. G., Diniz-Filho, J. A. F., & Morellato, L. P. C. (2010). A influência compartilhada da filogenia e da ecologia nos padrões reprodutivos de 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.

Suarez, A. V., & Tsutsui, N. D. (2004). The value of museum collections for research and society. *BioScience*, 54(1), 66-74.

Vasconcelos, T., & Boyko, J. D. (2024). mvh: An R tool to assemble and organize virtual herbaria from openly available specimen images. *Applications in Plant Sciences*, e11631.

Visser, M. (2022). Phenology: Climate change is shifting the rhythm of nature. In *Frontiers 2022: Noise, Blazes and Mismatches: Emerging Issues of Environmental Concern* (pp. 41-58). United Nations Environment Programme (UNEP).

Anexos

Tabela 1. Total de registros fenológicos e número de registros por fenofase.

Figura 1. Distribuição espacial dos registros amostrados (mapa da esquerda) para representar a fenologia de 6 espécies do gênero *Myrcia* (mapas menores).

Figura 2. Distribuição temporal dos registros amostrados para representar a fenologia de 6 espécies do gênero *Myrcia*.

CÓDIGO: SB1786

AUTOR: MARIA LUIZA GREGORIO ALVES

ORIENTADOR: RIVA DE PAULA OLIVEIRA

TÍTULO: ANÁLISE DO EFEITO DO RETENO NO ESTRESSE OXIDATIVO, DINÂMICA MITOCONDRIAL, E NEURODEGENERAÇÃO NO ORGANISMO MODELO CAENORHABDITIS ELEGANS

Resumo

Este estudo investigou os efeitos tóxicos do reteno, um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) não prioritário, utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. HPAs são compostos orgânicos amplamente distribuídos no ambiente, gerados principalmente pela queima incompleta de matéria orgânica e combustíveis fósseis. Como poluentes persistentes, estão associados à contaminação do solo, da água e do ar, representando um importante problema de saúde pública e ambiental devido ao seu potencial carcinogênico, mutagênico e tóxico para diversos organismos. A exposição ao composto comprometeu diferentes aspectos fisiológicos e celulares do organismo, como a taxa de eclosão de ovos, motilidade, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), longevidade, apoptose em células germinativas, dinâmica mitocondrial e integridade dos neurônios dopaminérgicos. Embora a postura de ovos e o crescimento corporal não tenham sofrido alterações relevantes, houve queda na eclosão ao final do período reprodutivo, sugerindo efeitos embrionários tardios. Observou-se também redução significativa dos dobramentos corporais em doses mais altas, indicando possível comprometimento neuromotor. O reteno induziu aumento da produção de ERO e ativou apoptose em células germinativas, além de alterar a morfologia mitocondrial e aumentar a massa dessas organelas, especialmente em concentrações elevadas, possivelmente por falhas na mitofagia. Quanto à longevidade, os resultados revelaram uma resposta n

Palavras-chave: reteno, *Caenorhabditis elegans*, estresse oxidativo, mitotoxicidade, n

TITLE: Efeitos Tóxicos do Reteno em *Caenorhabditis elegans*: Indução de Estresse Oxidativo, Disfunção Mitocondrial e Neurodegeneração

Abstract

This study systematically investigated the toxic effects of retene, a non-priority polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), using *Caenorhabditis elegans* as an experimental model. PAHs are organic compounds widely distributed in the environment, primarily generated by the incomplete combustion of organic matter and fossil fuels. As persistent pollutants, they are associated with soil, water, and air contamination, posing a significant public health and environmental problem due to their carcinogenic, mutagenic, and toxic potential to various organisms. Exposure to retene compromised multiple physiological and cellular aspects of the organism, including egg hatching rate, motility, production of reactive oxygen species (ROS), lifespan, apoptosis in germ cells, mitochondrial dynamics, and integrity of

dopaminergic neurons. Although egg laying and body growth were not significantly affected, there was a reduction in hatching at the end of the reproductive period, suggesting late embryonic effects. A significant reduction in body bends at higher doses was also observed, indicating possible neuromotor impairment. Retene exposure increased ROS production and triggered apoptosis in germ cells, in addition to altering mitochondrial morphology and increasing mitochondrial mass, especially at higher concentrations, possibly due to impaired mitophagy. Regarding lifespan, results revealed a non-linear response, with a significant increase in mean lifespan at the extreme concentrations (1 an

Keywords: retene, *Caenorhabditis elegans*, oxidative stress, mitotoxicity, neurod

Introdução

A poluição do ar envolve misturas tóxicas de gases e partículas, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), provenientes de fontes naturais (incêndios florestais, erupções vulcânicas) e antropogênicas (queima de combustíveis fósseis, processos industriais e queimadas agrícolas). Entre essas fontes, destaca-se a queima da casca da castanha de caju, que libera grandes quantidades de HPAs e material particulado. Os HPAs, formados pela combustão incompleta de matéria orgânica, possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Embora a US-EPA tenha classificado 16 como prioritários, outros, como o reteno, apresentam toxicidade relevante. O reteno, abundante na fumaça de incêndios e emissões industriais, induz estresse oxidativo, danos ao DNA, disfunção mitocondrial e alterações comportamentais em modelos animais, apesar de não estar entre os compostos prioritários. O nematoide *Caenorhabditis elegans* é um modelo experimental amplamente utilizado em toxicologia por sua simplicidade anatômica, ciclo de vida curto e conservação genética com humanos. Possui enzimas da família CYP450, relevantes no metabolismo de HPAs, e permite investigar mecanismos como estresse oxidativo, apoptose e disfunção mitocondrial. Embora existam estudos com outros HPAs nesse organismo, não há pesquisas específicas sobre o reteno, o que representa uma lacuna de conhecimento. Este estudo visa avaliar os efeitos tóxicos do reteno em *C. elegans*, contribuindo para a compreensão de seu impacto biológico e mecanismos de ação.

Metodologia

O presente estudo foi conduzido utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental para avaliação dos efeitos tóxicos do reteno. Foram utilizadas as cepas selvagem N2 (Bristol) e as linhagens transgênicas SJ4143 (*myo-3p::GFP(mit)*), SJ4103 (*myo-3p::GFP(mit)*), MD701 (*bcIs39[lim-7p::ced-1::GFP]*) e BY250 (*dat-1p::GFP*), 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 e NaOH, resultando na recuperação de ovos viáveis. Após incubação em meio M9 por 12–16 h, as larvas eclodidas (estágio L1) foram utilizadas para os ensaios. O reteno (Retene, ≥98% pureza, Sigma-Aldrich) foi inicialmente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de solução estoque de 50 mg/mL. As diluições foram preparadas em *E. coli* OP50 para atingir concentrações finais de 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL, mantendo a concentração final de DMSO ≤0,1% em todos os grupos, incluindo o controle negativo (DMSO 0,1%). As bactérias tratadas foram aplicadas sobre as placas NGM previamente solidificadas. Os seguintes ensaios foram realizados: Progênie: 10 animais por grupo foram individualizados em placas

contendo reteno e transferidos diariamente para novas placas, com contagem de ovos e larvas eclodidas por 6 dias consecutivos. Tamanho corporal: após 72 h de exposição, 30 animais por grupo foram fotografados em microscópio óptico e analisados no software ImageJ para determinação do comprimento corporal. Dobramentos corporais: em larvas L4, foram contabilizados os movimentos laterais do corpo em intervalos de 20 s, repetidos três vezes por animal. Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO): animais foram incubados com H2DCF-DA (50 μ M) por 1 h, lavados e analisados em microscópio de fluorescência, com quantificação média de intensidade utilizando o ImageJ. Longevidade: populações de 60 animais por grupo foram cultivadas em placas com 50 μ M de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUDR) para inibir a progênie. A sobrevivência foi monitorada diariamente até a morte de todos os animais. Apoptose em células germinativas: na linhagem MD701, foi realizada a contagem de células com sinal GFP na região gonadal após 24 h de exposição. Massa mitocondrial: a linhagem SJ4143 foi utilizada para quantificação da intensidade média de fluorescência GFP, indicando conteúdo mitocondrial, após 24 h de tratamento. Morfologia mitocondrial: na linhagem SJ4103, a integridade mitocondrial na musculatura corporal foi classificada como normal, fragmentada ou severamente fragmentada, conforme protocolo adaptado de Regmi et al. (2014). Neurodegeneração dopaminérgica: na linhagem BY250, o estado dos neurônios dopaminérgicos foi avaliado por escores visuais, considerando integridade e presença de sinais degenerativos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica, com número amostral adequado para cada ensaio. A análise estatística foi conduzida no GraphPad Prism 6.0, utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas, ou teste log-rank (Mantel-Cox) para curvas de sobrevivência. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

4.1 Efeitos do reteno na fertilidade, crescimento e motilidade de *C. elegans* A toxicidade do reteno em *C. elegans* foi avaliada por meio de parâmetros fisiológicos essenciais, incluindo fertilidade, crescimento corporal e controle neuromuscular. Cinco concentrações foram testadas: 1, 5, 10, 25 e 50 μ g/mL, permitindo avaliar efeitos dependentes da dose. Os dados mostram que o número total de ovos produzidos pelos animais tipo selvagem (N2) não apresentou alteração significativa (Figura 5A), sugerindo que a oviposição não é diretamente comprometida pelo reteno em concentrações subletais. Este resultado indica que o efeito tóxico do reteno pode não se manifestar na produção inicial de gametas, mas em etapas subsequentes de desenvolvimento embrionário. Entretanto, a análise do perfil diário de oviposição revelou diminuição na eclosão dos ovos, especialmente no quinto e sexto dias, em concentrações mais elevadas (Figura 5B). Isso sugere que o reteno interfere na viabilidade embrionária, possivelmente por indução de estresse oxidativo ou ativação de mecanismos de apoptose em células germinativas. Estudos anteriores demonstram que HPAs podem atravessar membranas celulares e afetar a expressão de genes envolvidos na sobrevivência embrionária, incluindo aquelas relacionadas a reparo de DNA e controle do ciclo celular (Wang et al., 2018). Quanto ao crescimento, a exposição por 48 h não alterou significativamente o comprimento dos vermes (Figura 6A), indicando que o desenvolvimento corporal não é diretamente sensível às concentrações testadas. Esse achado sugere que o reteno apresenta uma toxicidade seletiva, afetando funções fisiológicas específicas sem impactar globalmente o crescimento. Por outro lado, a análise da motilidade revelou redução significativa nos dobramentos corporais em concentrações ≥ 10 μ g/mL (Figura 6B). A diminuição da motilidade sugere comprometimento do controle neuromuscular e possivelmente alterações na integridade muscular ou nos sinais dopaminérgicos que regulam

a locomoção. A toxicidade neuromuscular observada é consistente com estudos que mostram que HPAs podem interferir na função neuronal, promovendo disfunção sináptica e diminuição da eficiência contrátil dos músculos (Fang et al., 2020). Esses achados indicam que, embora fertilidade e crescimento não sejam diretamente prejudicados, o reteno pode comprometer funções motoras e neuromusculares, destacando seu potencial efeito neurotóxico mesmo em doses subletais.

4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) demonstrou aumento significativo após 48 h de exposição, com elevação de aproximadamente 25% em 10 µg/mL e 60% em 50 µg/mL (Figura 8). A geração aumentada de ERO evidencia que o reteno induz estresse oxidativo em *C. elegans*, consistente com seu perfil químico como hidrocarboneto aromático policíclico (HPA). O estresse oxidativo é um mecanismo amplamente reconhecido na toxicidade de HPAs, sendo mediado pelo acúmulo de radicais livres e disfunção mitocondrial (Peixoto et al., 2019). O aumento das ERO pode estar diretamente relacionado à redução da motilidade observada, uma vez que danos oxidativos podem afetar proteínas contráteis musculares, canais iônicos e estruturas neuronais essenciais para o controle motor. Além disso, a produção excessiva de ERO pode desencadear sinais de apoptose em células germinativas e ativar mecanismos de reparo celular que, embora protetores, podem comprometer a viabilidade e funcionalidade das células. Esses dados indicam uma relação estreita entre estresse oxidativo, disfunção neuromuscular e indução de morte celular programada, corroborando evidências de que HPAs promovem efeitos tóxicos multissistêmicos em organismos modelo (Zhou et al., 2021).

4.3 Longevidade

A avaliação do efeito do reteno sobre a longevidade de *C. elegans* revelou aumento modesto, mas significativo, do tempo médio de vida em algumas concentrações: 11,7% em 1 µg/mL e 13,1% em 50 µg/mL (Figura 9, Quadro 2). O tempo máximo de vida também apresentou elevação, especialmente em 50 µg/mL (≈25%). Esse fenômeno sugere que, além de induzir estresse oxidativo, o reteno pode ativar respostas adaptativas compensatórias, possivelmente via hormese, um processo no qual pequenas doses de um estressor induzem mecanismos de proteção que aumentam a resistência celular e a longevidade (Calabrese & Mattson, 2017). A longevidade prolongada pode estar associada à ativação de vias antioxidantes, regulação de genes de reparo de DNA e aumento da biogênese mitocondrial, como sugerido pelos dados de fluorescência mitocondrial em SJ4143 (Figura 11). Entretanto, vale ressaltar que o controle com DMSO apresentou toxicidade, evidenciando a necessidade de cautela na interpretação e reforçando que efeitos observados podem refletir tanto a resposta ao estressor químico quanto efeitos solvente-dependentes.

4.4 Apoptose em células germinativas

A avaliação da apoptose na linhagem germinativa, utilizando a cepa MD701 (*lim-7p::ced-1::GFP*), mostrou aumento significativo do número de células apoptóticas em concentrações mais elevadas (25 e 50 µg/mL) após 5 dias de exposição (Figura 10). Este resultado indica que o reteno induz morte celular programada, provavelmente como mecanismo de eliminação de células danificadas pelo estresse oxidativo. A indução de apoptose nas células germinativas é consistente com estudos prévios demonstrando que HPAs podem ativar vias dependentes de ROS e fatores de transcrição de reparo celular, promovendo eliminação de células comprometidas (Huang et al., 2020). Esse efeito explica parcialmente a redução da eclosão observada nos ovos, sem afetar a oviposição, evidenciando que a toxicidade se manifesta principalmente em etapas pós-fecundação.

4.5 Massa e morfologia mitocondrial

O tratamento com reteno alterou a massa mitocondrial nas células intestinais da cepa SJ4143, com aumento da fluorescência em concentrações ≥10 µg/mL após 48 h (Figura 11), sugerindo indução de biogênese mitocondrial como resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Em animais mais velhos (5 dias), a fluorescência aumentou uniformemente sem diferença estatística entre concentrações (Figura 12), indicando efeito

generalizado de exposição prolongada. A morfologia mitocondrial em células musculares (SJ4103) apresentou alterações significativas após 48 h, com efeitos mais evidentes após 5 dias em concentrações $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ (Figura 13, Quadros 3 e 4). Essas alterações incluem fragmentação, perda de integridade da rede e aumento da circularidade mitocondrial, sugerindo disfunção mitocondrial. Considerando que mitocôndrias são essenciais para produção de ATP e manutenção da contração muscular, tais mudanças podem contribuir para a redução da motilidade observada, estabelecendo uma ligação direta entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e alterações fisiológicas (Youle & van der Bliek, 2012).

4.6 Neurodegeneração Animais transgênicos dopaminérgicos (vtIs7 [dat-1p::GFP]) apresentaram neurodegeneração dose-dependente após 48 h e 5 dias de exposição. Concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ causaram danos severos, incluindo dendritos quebrados, perda de integridade neuronal e degeneração do corpo celular (Figura 14, Quadros 5 e 6). Esses resultados sugerem que o reteno exerce neurotoxicidade direta, possivelmente mediada por estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, corroborando a diminuição da motilidade e evidenciando que os efeitos do reteno são multissistêmicos. A neurodegeneração observada em dopaminérgicos reforça o risco ambiental de HPAs, mostrando que compostos como o reteno podem afetar não apenas funções reprodutivas e metabólicas, mas também o sistema nervoso, com implicações para saúde de organismos superiores e ecossistemas aquáticos ou terrestres contaminados (Li et al., 2019).

4.7 Integração dos resultados Em síntese, os dados indicam que o reteno apresenta toxicidade multifacetada em *C. elegans*. Embora não comprometa diretamente oviposição ou crescimento corporal, promove: Estresse oxidativo dependente da dose. Alterações na morfologia e massa mitocondrial. Apoptose em células germinativas. Comprometimento da motilidade e neurodegeneração. Efeitos adaptativos sobre a longevidade média e máxima. Esses achados sugerem que o reteno ativa respostas celulares complexas, com implicações para toxicologia ambiental, saúde reprodutiva e neurodegeneração, reforçando a necessidade de monitoramento de HPAs não prioritários como agentes ambientais emergentes.

Conclusão

Este estudo representa a primeira investigação abrangente sobre os efeitos tóxicos do reteno em *Caenorhabditis elegans*, revelando que esse HPA não prioritário tem potencial para causar alterações fisiológicas e celulares profundas. Observou-se aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio, apoptose em células germinativas, disfunção e alterações estruturais mitocondriais, além de degeneração de neurônios dopaminérgicos — efeitos que ameaçam a homeostase do organismo como um todo. A presença de respostas não lineares na longevidade, com elevações estatisticamente significativas em concentrações extremas, sugere ainda um possível efeito hormético que demanda validação por meio de estudos adicionais direcionados a vias regulatórias como *daf-16* e *skn-1*. Esses achados reforçam a urgência de reavaliar o risco ambiental associado ao reteno, evidenciando que compostos até então considerados de menor prioridade podem ter efeitos tóxicos substanciais em organismos expostos no ambiente. Considerando a persistência, bioacumulação e transporte atmosférico de HPAs, o reteno pode representar uma ameaça significativa à saúde de ecossistemas aquáticos e terrestres, com implicações potenciais para a cadeia alimentar e para a saúde humana. Por fim, este trabalho destaca o valor de *C. elegans* como um modelo poderoso para o monitoramento de contaminantes emergentes e para a geração de dados científicos que subsidiem políticas ambientais mais rigorosas e estratégias de mitigação eficazes, contribuindo para a preservação ambiental e a saúde pública de forma integrada.

Referências

A Promising Indicator of Neurobehavioral Toxicity Using the Nematode *Caenorhabditis Elegans* and Computer Tracking - Phillip L. Williams, David B. Dusenbery, 1990. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/074823379000600306>>. Acesso em: 12 abr. 2025. ABBASS, Mustafa et al. Benzo[a]pyrene and *Caenorhabditis elegans*: defining the genotoxic potential in an organism lacking the classical CYP1A1 pathway. *Archives of Toxicology*, v. 95, n. 3, p. 1055–1069, 2021a. ABDEL-SHAIFY, Hussein I.; MANSOUR, Mona S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 25, n. 1, p. 107–123, 1 mar. 2016. AJAYI, Babajide O.; ADEDARA, Isaac A.; FAROMBI, Ebenezer O. Benzo(a)pyrene induces oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, expression of nuclear factor-kappa B and deregulation of wnt/beta-catenin signaling in colons of BALB/c mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 95, p. 42–51, 1 set. 2016. BAI, Hongzhen et al. Chronic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure causes DNA damage and genomic instability in lung epithelial cells. *Oncotarget*, v. 8, n. 45, p. 79034–79045, 15 set. 2017. BERRY, Raymond; LÓPEZ-MARTÍNEZ, Giancarlo. A dose of experimental hormesis: When mild stress protects and improves animal performance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 242, p. 110658, 1 abr. 2020. BHARGAVA, Arpit et al. Mapping the Mitochondrial Regulation of Epigenetic Modifications in Association With Carcinogenic and Noncarcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure. *International Journal of Toxicology*, v. 39, n. 5, p. 465–476, 1 set. 2020. BIJWADIA, Shefali R.; MORTON, Katherine; MEYER, Joel N. Quantifying Levels of Dopaminergic Neuron Morphological Alteration and Degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. 177, p. 10.3791/62894, 20 nov. 2021. BILLIARD, Sonya M. et al. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 133, n. 1, p. 55–68, 1 set. 2002. BLACKWELL, T. Keith et al. SKN-1/Nrf, respostas ao estresse e envelhecimento em *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, Nrf2 Regulated Redox Signaling and Metabolism in Physiology and Medicine. v. 88, p. 290–301, 1 nov. 2015. BLOCK, Michelle L.; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, Lilian. Air Pollution: Mechanisms of Neuroinflammation & CNS Disease. *Trends in neurosciences*, v. 32, n. 9, p. 506–516, set. 2009. BOULIN, Thomas; ETCHBERGER, John F.; HOBERT, Oliver. Reporter gene fusions. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. [S.l.]: WormBook, 2006. BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71–94, maio 1974a. C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, v. 282, n. 5396, p. 2012–2018, 11 dez. 1998. CHANDEL, Navdeep S. Mitochondria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 13, n. 3, p. a040543, 3 jan. 2021. CHEN, Wen; ZHAO, Huakan; LI, Yongsheng. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, p. 333, 6 set. 2023. CHOI, Sun-Haeng et al. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on mitochondrial DNA copy number. *Human & Experimental Toxicology*, v. 42, p. 09603271231216968, 1 mar. 2023. CHRISTENSEN, Michael et al. A Primary Culture System for Functional Analysis of *C. elegans* Neurons and Muscle Cells. *Neuron*, v. 33, n. 4, p. 503–514, 14 fev. 2002. COSTA, C. et al. Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: Role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology*, v. 271, n. 3, p. 83–86, 27 maio 2010. CRAIG, Lorraine et al. Air pollution and public health: a guidance document for risk

managers. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, v. 71, n. 9–10, p. 588–698, 2008. CYPSEY, James R.; TEDESCO, Pat; JOHNSON, Thomas E. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology*, v. 41, n. 10, p. 935–939, out. 2006. 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, dez. 2021a. DA SILVA JUNIOR, Francisco Carlos; REGINA, Silvia; DE MEDEIROS, Batistuzzo. A Look Beyond the Priority: A Comprehensive Investigation of the Toxicity of Retene. *ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS*, v. 63, n. 1, p. 81, ago. 2022. 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, 7 set. 2017a.

CÓDIGO: SB1789

AUTOR: JOÃO VITOR ALMEIDA DA COSTA

ORIENTADOR: RODRIGO JULIANI SIQUEIRA DALMOLIN

TÍTULO: Análise transcriptômica de genes e RNAs de enhancers nos subgrupos de Meduloblastoma G3 e G4

Resumo

Meduloblastoma (MB) é a neoplasia maligna cerebral pediátrica mais frequente, com os subgrupos Grupo 3 (G3) e Grupo 4 (G4) exibindo prognósticos particularmente mais desfavoráveis. A regulação gênica mediada por enhancers, através da transcrição de RNAs de enhancer (eRNAs) e de super-enhancers (SEs), é crucial para a regulação epigenética, muito ligada a identidade celular e a tumorigênese. Este estudo propõe uma análise transcriptômica integrativa de amostras de MB, em especial de G3 e G4, que contém dados de recorrência e metástases. Usaremos dados de RNA-seq padrão, assim como anotações de eRNAs e SEs típicos para decifrar a assinatura transcricional dependente de reforçadores nesses tumores. A caracterização dos reguladores não-codantes e suas redes gênicas-alvo visa elucidar mecanismos moleculares da doença e identificar possíveis oportunidades terapêuticas para estes subgrupos de alto risco.

Palavras-chave: meduloblastoma; eRNA; super-enhancer; transcriptômica; heterogeneidade

TITLE: Transcriptomic Analysis of Genes and Enhancer RNAs in Medulloblastoma Subgroups G3 and G4

Abstract

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant pediatric brain tumor, with Group 3 (G3) and Group 4 (G4) subgroups exhibiting particularly unfavorable prognoses. Enhancer-mediated gene regulation, through the transcription of enhancer RNAs (eRNAs) and super-enhancers (SEs), plays a critical role in epigenetic regulation and is closely linked to cellular identity and tumorigenesis. This study proposes an integrative transcriptomic analysis of MB samples, with emphasis on G3 and G4 subgroups, including data from recurrent and metastatic cases. We will utilize standard RNA-seq data alongside annotations of canonical eRNAs and SEs to decipher the enhancer-dependent transcriptional signature in these tumors. The characterization of these non-coding regulators and their target gene networks aims to elucidate novel molecular mechanisms of the disease and identify potential therapeutic opportunities for these high-risk subtypes.

Keywords: medulloblastoma; eRNA; super-enhancer; transcriptomics; heterogeneity

Introdução

O meduloblastoma (MB) é o tumor maligno do sistema nervoso central mais comum na infância, representando um significativo desafio clínico devido à sua alta heterogeneidade molecular e variabilidade nos desfechos terapêuticos. Classificado molecularmente em quatro subgrupos distintos (WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4), esta neoplasia apresenta diversidade em sua histopatologia, comportamento biológico e prognóstico. Particularmente, os subgrupos Grupo 3 (G3) e Grupo 4 (G4) permanecem como entidades clinicamente desafiadoras, frequentemente associadas a metástases ao diagnóstico, taxas de recidiva elevadas e sobrevida global insatisfatória, refletindo a carência de terapias específicas e eficazes. Esta complexidade fenotípica é sustentada por uma intrincada rede de regulação gênica que vai além das mutações driver convencionais, envolvendo mecanismos epigenéticos e regulatórios que modulam programas transcricionais oncogênicos.

Neste contexto, a regulação da expressão gênica mediada por elementos cis-regulatórios, particularmente os enhancers e seus RNAs transcritos (eRNAs), emerge como uma camada crítica de controle na tumorigênese. Estas sequências genômicas distais, quando ativadas, transcrevem eRNAs curtos, não-poliadenilados, que servem como marcadores funcionais da atividade enhancer e facilitam a comunicação cromatínica com os promotores de seus genes-alvo. Mais recentemente, os super-enhancers (SEs) - aglomerados genômicos de enhancers co-ocupados por altas densidades de fatores de transcrição e co-ativadores - foram identificados como reguladores mestres da identidade celular e da expressão de oncogenes críticos em diversos cânceres. A desregulação destes elementos está intimamente ligada à aquisição e manutenção de estados transcricionais oncogênicos, influenciando processos como auto-renovação celular, invasão e resistência terapêutica.

Apesar deste potencial, o papel específico dos eRNAs e dos SEs na progressão do meduloblastoma, particularmente nos subgrupos G3 e G4 e em contextos clinicamente agressivos (recidiva e metástase), permanece largamente inexplorado. A caracterização do landscape transcriptômico dependente de enhancers nestes tumores pode revelar novos mecanismos patogênicos, não capturados pela análise convencional de genes codificantes de proteínas. A hipótese central que norteia este trabalho postula que a atividade específica de eRNAs e SEs constitui um driver molecular fundamental para a agressividade clínica e heterogeneidade intra subgrupo no MB, regulando redes gênicas pro-oncogênicas associadas à recidiva e capacidade metastática.

Portanto, este projeto propõe uma análise transcriptômica integrativa de amostras de MB, com ênfase em G3 e G4, primários, recidivados e metastáticos, utilizando controles cerebelares pediátricos e adultos. Ao integrar dados de RNA-seq com anotações curadas de eRNAs e de SEs propostos, objetivamos decifrar a assinatura transcricional dependente de enhancers, identificar reguladores chave da agressividade tumoral e propor novos biomarcadores e alvos terapêuticos para os subgrupos de pior prognóstico.

Metodologia

Aquisição dos Dados

Para a execução deste estudo, será utilizado um dado público de RNA-seq, disponível na plataforma de repositório genômico Gene Expression Omnibus (GEO). Especificamente, será utilizado o dataset depositado sob o número de acesso GSE148389. Esse dataset contém amostras de tecido normal adulto e pediátrico, tumores primários de Meduloblastoma (SHH, G3, G4) mas também recidivos e metastáticos para G3 e G4. A seleção desse conjunto de dados se baseia na necessidade de comparar o perfil de expressão de genes, eRNAs e SEs em diferentes estágios da doença, permitindo a identificação de potenciais biomarcadores relacionados à agressividade.

Processamento dos Dados

Os dados brutos de RNA-seq, armazenados no formato .SRA (Sequence Read Archive), serão primeiramente convertidos para o formato .FASTQ, que é amplamente utilizado em análises de bioinformática. Essa conversão será realizada utilizando o pacote SRA Toolkit, uma ferramenta robusta que facilita o download e manipulação de dados do NCBI SRA.

Após a conversão, o controle de qualidade das sequências de RNA será realizado usando o software FastQC (versão 0.11.9). O FastQC avalia diversos parâmetros de qualidade das leituras, incluindo qualidade de base por posição, conteúdo de GC, presença de adaptadores e duplicação de sequências, podendo filtrá-los.

Com os relatórios de qualidade em mãos, as sequências serão submetidas a uma etapa de filtragem e limpeza utilizando o software Fastp (versão 0.23.2), que é crucial para minimizar o ruído nos dados e melhorar a precisão das análises de expressão.

Após o controle de qualidade e filtragem, as sequências serão alinhadas ao genoma de referência humano (hg38) utilizando o alinhador rápido splice-aware STAR.

Para a identificação e quantificação de eRNAs e RNAs vindos das regiões de super-enhancers, serão utilizadas as anotações FANTOM5 para enhancers validados e do ENCODE para regiões de SE, que serão comparados entre si e com os genes típicos (mRNAs, lncRNAs e outros), que utilizam a anotação gênica GENCODE Release 44

Análise de Expressão Gênica Diferencial

A análise de expressão gênica diferencial (DGE) é fundamental para identificar genes cujo nível de expressão varia significativamente entre as diferentes condições experimentais. Neste estudo, a análise de DGE será conduzida utilizando o pacote DESeq2 no R. O DESeq2 é amplamente reconhecido por sua robustez na análise de dados de RNA-seq, permitindo a normalização adequada das contagens e a aplicação de testes estatísticos rigorosos para identificar genes diferencialmente expressos.

Os resultados de DGE serão considerados significativos se apresentarem um valor-p ajustado por FDR (False Discovery Rate) inferior a 0,05.

Análise de Enriquecimento Funcional

Os genes identificados como diferencialmente expressos nas análises de DGE serão submetidos a uma análise de enriquecimento funcional para investigar os processos biológicos que estão sendo alterados em resposta à progressão do tumor G3/G4 para metástase ou presença de recorrência. A análise de enriquecimento funcional será realizada utilizando o pacote clusterProfiler no R, que permite a realização de testes de sobre-representação para termos do Gene Ontology (GO).

A análise de GO será focada em processos biológicos (GO Biological Process), que abrangem uma ampla gama de funções celulares e moleculares. Termos com p-valor ajustado por BH (Benjamini-Hochberg) inferior a 0,05 serão considerados enriquecidos, destacando os processos biológicos mais relevantes que podem estar associados a estados agressivos.

Resultados e Discussões

Resultados

A integração dos três níveis de anotação — expressão gênica consolidada, sinais de eRNA e anotações de super-enhancers — revelou um conjunto concordante de 29 genes cujo comportamento diferencial está associado à presença de metástase em meduloblastoma Grupo 3, que foi o único considerado devido a significância considerando o p valor e o log2FoldChange. Ao extrair os nomes dos genes de cada arquivo e calcular a interseção, identificamos uma assinatura composta por lncRNAs oncológicos, reguladores de cromatina, fatores de sinalização e componentes da identidade neuronal (APOA1-AS, C1QTNF7, C1QTNF7-AS1, CASC8, E2F3, EPS8, FADS2, FKBP5, GREB1, HDAC5, JMJD1C, KCNB1, MACROD2, NRG1, PCAT1, POU5F1B, PTPRG, PTPRO, PVT1, RPTOR, RTN1, SHB, SIK3, SLC1A7, SLC7A5, ST7, STIM2, TRPM3, ZNF385B), observados de forma consistente nos três conjuntos analisados.

A leitura funcional desta sobreposição indica dois eixos moleculares claros: por um lado, a ativação coerente de elementos não-codificantes pró-tumorais (por exemplo PVT1, PCAT1, CASC8 e POU5F1B) concomitante com a indução de reguladores de transcrição e de cromatina (E2F3, RPTOR, HDAC5, JMJD1C), sugerindo um programa transcricional pró-proliferação e resistência; por outro lado, a repressão de genes associados à identidade e à funcionalidade neuronal, em particular canais iônicos e sinais de adesão (KCNB1, TRPM3 e vários membros do cluster protocaderina), o que aponta para perda de características de adesão/neuronalidade no fenótipo metastático.

Os perfis de eRNA corroboram esse modelo ao mostrar ativação de enhancers próximos a genes envolvidos em remodelamento do microambiente e sobrevivência (por exemplo FN1, IGFBP5, D2HGDH, BCL11A e FOSL2-AS1), implicando que a atividade enhancer é funcionalmente traduzida em programas de matriz extracelular, sinalização e regulação epigenética que apoiam disseminação e invasão. Simultaneamente, as anotações de super-enhancers reportam eventos localizados tanto em regiões com ganho de atividade (por exemplo loci anotados com ATP5F1A e SMARCA4) quanto em regiões de forte repressão sobre o cluster protocaderina (PCDHGA/B), configurando um cenário em que reprogramação de enhancers e super-enhancers pode coordenar a ativação de lncRNAs e fatores pró-oncogênicos enquanto suprime máquinas de adesão celular.

Do ponto de vista mecanístico, os dados concentram-se em uma hipótese unificadora: a remodelação do landscape enhancer/super-enhancer estabelece eRNA-mediated hubs que promovem expressão de lncRNAs e fatores de

transcrição pró-tumorais (PVT1/PCAT1 + E2F3/RPTOR/HDAC5/JMJD1C), ao passo que a coordenação da repressão de genes de adesão e canais iônicos (PCDHs, KCNB1, TRPM3) facilita desagregação tecidual e aumento da plasticidade migratória. Esses componentes — detectáveis de forma concordante nas camadas de expressão, eRNA e anotação de SE — definem uma assinatura molecular coerente associada à metastização em MB-G3 e fornecem um mapa detalhado de alvos putativos que interligam regulação epigenética, RNA não-codificante e perda de identidade neuronal no processo de progressão tumoral.

Discussão

A integração dos dados de expressão (merged), atividade de eRNAs e anotações de super-enhancers revela um programa molecular coerente associado à metástase em meduloblastoma Grupo 3: uma co-ativação de lncRNAs pró-tumorais (PVT1, PCAT1, CASC8, POU5F1B) em conjunto com ativação de reguladores de transcrição e remodeladores de cromatina (E2F3, RPTOR, HDAC5, JMJD1C) que delineia um eixo pró-proliferação e resistência. Paralelamente, observa-se repressão consistente de genes ligados à identidade neuronal e à adesão celular, incluindo canais iônicos (KCNB1, TRPM3) e membros do cluster protocaderina, configurando perda de características neurais que pode favorecer desagregação tecidual e mobilidade. Os sinais de eRNA apontam para hubs enhancers próximos a genes de matriz extracelular e sobrevivência (por exemplo FN1, IGFBP5), sugerindo que a reprogramação enhancer→eRNA sustenta remodelamento do microambiente tumoral concomitante à ativação de lncRNAs. A presença destes mesmos loci nas anotações de super-enhancers reforça a ideia de que ganhos de atividade enhancer de alta intensidade coordenam respostas transcricionais robustas, enquanto loci reprimidos (p.ex. sobre PCDH) promovem desinstitucionalização da identidade celular. Assim, os dados descrevem um circuito onde remodelamento epigenético e expressão de RNA não-codificante se entrelaçam para promover plasticidade fenotípica, acoplando programas de proliferação, resistência ao estresse e alterações na interação com a matriz que, em conjunto, caracterizam o estado metastático em MB-G3.

Conclusão

A sobreposição concordante entre expressão gênica, eRNAs e super-enhancers identifica uma assinatura de 29 genes que integra ativação de lncRNAs e reguladores epigenéticos com repressão de programas neuronais e de adesão, definindo um estado molecular associado à metástase em meduloblastoma Grupo 3. Este perfil sugere que a reprogramação do landscape enhancer/super-enhancer constitui um eixo central na transição para um fenótipo metastático, unindo regulação epigenética, RNA não-codificante e perda de identidade neuronal em um mesmo pano de fundo molecular.

Referências

Lin CY, Erkek S, Tong Y, et al. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature*. 2016;530(7588):57-62. doi:10.1038/nature16546

Li J, Pan C, Boese AC, et al. Super-enhancer-associated dependencies in medulloblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023;42(1):80. doi:10.1186/s13046-022-02506-y

Laneve P, Rea J, Caffarelli E, et al. Long noncoding RNAs: emerging players in medulloblastoma. *Front Pediatr*. 2019;7:67. doi:10.3389/fped.2019.00067

Zhao Y-N, Li K, Han X-S, Pan Y-W. The mechanism of non-coding RNAs in medulloblastoma. *Oncol Lett*. 2021;22(5):758. doi:10.3892/ol.2021.13019

Varon M, Levy T, Mazor G, et al. The long noncoding RNA TP73-AS1 promotes tumorigenicity of medulloblastoma cells. *Int J Cancer*. 2019;145(12):3402-3413. doi:10.1002/ijc.32788

Zhang J, Li N, Fu J, Zhou W. Long noncoding RNA HOTAIR promotes medulloblastoma growth, migration and invasion by sponging miR-1/miR-206 and targeting YY1. *Biomed Pharmacother*. 2020;124:109887. doi:10.1016/j.biopha.2020.109887

Gao R, Zhang R, Zhang C, Zhao L, Zhang Y. Long non-coding RNA CCAT1 promotes cell proliferation and metastasis in human medulloblastoma via MAPK pathway. *Tumori*. 2018;104(1):43-50.

Kool M, Korshunov A, Remke M, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):473-84. doi:10.1007/s00401-011-0922-8

Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*. 2013;155(4):934-947. doi:10.1016/j.cell.2013.09.053

Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*. 2013;153(2):307-319. doi:10.1016/j.cell.2013.03.035

Kool M, Korshunov A, Northcott PA, et al. Group 3 and Group 4 medulloblastoma enhancer landscapes exhibit subtype-specific regulatory features. *Nat Commun*. 2020;11:5519. doi:10.1038/s41467-020-19268-3

CÓDIGO: SB1790

AUTOR: BARBARA KALLYANA VARELA ANGELO

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Descrição e Análise das Interações Quânticas entre os Hormônios Testosterona e Progesterona com a Enzima Hepática AKR1D1

Resumo

A enzima $\Delta 4$ -3-cetosteróide 5 β -redutase humana (AKR1D1) atua como reguladora da disponibilidade biológica de esteróides 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 esteróides: 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 demonstrou papel determinante no posicionamento dos ligantes em ambos os sistemas.

Palavras-chave: AKR1D1. Testosterona. Progesterona. Hormônios esteróides. DFT. MFCC.

TITLE: Description and Analysis of Quantum Interactions between the Hormones Testosterone and Progesterone with the Liver Enzyme AKR1D1

Abstract

The human $\Delta 4$ -3-ketosteroid 5 β -reductase enzyme (AKR1D1) acts as a regulator of the biological availability of steroids and the metabolic profile, being 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 showed higher total interaction energy with the enzyme compared to progesterone, and the TRP230 residue played a decisive role in the positioning of ligands in both systems.

Keywords: AKR1D1. Testosterone. Progesterone. Steroid hormones. DFT. MFCC.

Introdução

Os hormônios esteróides, especialmente os anabólicos androgênicos e glicocorticóides, 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 esteróide 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 esteróide masculino, sendo precursor para outros esteróides 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 Δ^4 -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 esteróides no fígado humano possui duas fases. A fase I envolve reações de oxidação, redução e hidrólise, sendo realizada por enzimas monooxigenases da superfamília do citocromo P450s, oxidoredutases 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 Δ^4 -3-cetosteróides: as 5α redutases (SRD5A1 e SRD5A3) e a 5β redutase (AKR1D1) (DRURY, 2010).

A AKR1D1 aparentemente inibe a ação anabólica e androgênica dos hormônios esteróides 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 (RIZNER e PENNING, 2014).

Justificativa

Sabe-se que a enzima AKR1D1 é fundamental para o equilíbrio das concentrações e para o metabolismo dos hormônios esteróides 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 da testosterona e da progesterona com 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

Disponíveis no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank (RCSB - PDB), um repositório de dados estruturais de macromoléculas biológicas, as estruturas cristalográficas foram obtidas para a realização dos cálculos. 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 raios-X monocromáticos em uma amostra cristalina, sendo possível definir a impressão digital de arranjos atômicos periódicos na amostra. Com essa impressão, obtém-se os elementos químicos da amostra e seus espaçamentos atômicos, possibilitando a criação do cristal 3D (BUNACIU, UDRISTIOIU E ABOUL-ENEIN, 2015). Dentre os dois monômeros, A e B, presentes na proteína, que é um dímero, o monômero A foi o selecionado para o estudo por apresentar menos falhas estruturais em decorrência do processo de cristalografia.

Algumas informações importantes podem ser perdidas no processo de obtenção do cristal. Portanto, são necessários processos de otimização das estruturas cristalográficas quando são realizados estudos com as mesmas, para que os modelos sejam energeticamente estáveis. (RYDE, 2016; ZHANG, 2017). Para a realização desse processo, utilizou-se o software Discovery Studio.

Foi feita 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 no cristal (CALDARARU et al., 2019). A otimização geométrica dos átomos de hidrogênio foi realizada empregando o 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 progressivamente aumentado a cada 0,5 Å, até que a diferença de energia observada fosse inferior a 10% do 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, considera 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 determinados resíduos de aminoácidos. Como a quebra da cadeia polipeptídica deixa as extremidades dos resíduos com valências livres, são adicionados os aminoácidos precedente e do subsequente, denominados caps, para fechar essa valência (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: $E(L - R_i) = E(L + C1-i R_i C_{i+1}) - E(L + C1-i C_{i+1}) - E(C1-i R_i C_{i+1}) + E(C1-i C_{i+1})$ onde $E(L - R_i)$ representa a energia de interação entre o ligante (L) e o resíduo de aminoácido (R_i). Os termos $C1-i$ e C_{i+1} correspondem, respectivamente, ao aminoácido anterior e posterior (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), utilizando o DFT como base. Para a descrição do 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 à utilização de um meio dielétrico contínuo (ϵ) como forma de 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 $\epsilon=40$ foi empregada para melhor estabilização das energias de interação, por representar de forma mais próxima o ambiente fisiológico, e a constante $\epsilon=10$, por se aproximar mais do vácuo, foi usada para permitir comparação dos resultados e reduzir riscos de inconsistências no cálculo das energias de interação (DANTAS et al., 2015; OURIQUE et al., 2016).

Resultados e Discussões

Como descrito na metodologia, para obtenção dos resultados foram utilizadas as constantes dielétricas de 40 ($\epsilon=40$) e a constante 10 ($\epsilon=10$) 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 $\epsilon=40$ o complexo TES-AKR1D1 convergiu no raio 5,0 Å com uma energia de -45,7 kcal/mol e obteve uma energia total até o raio 10 Å de -50 Kcal/mol (Figura 2) e na $\epsilon=10$ o sistema também convergiu no raio 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 $\epsilon=40$, 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 $\epsilon=10$ 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).

Como pode-se observar, 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 tiveram uma interação muito baixa e possivelmente não possuem 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 justificado pela proximidade dos resíduos com o ligante.

A partir deste ponto, serão considerados apenas os resultados obtidos com a constante dielétrica $\epsilon=40$, 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 esteróides, desempenhando um papel central na síntese de ácidos biliares, na ativação de receptores órfãos e na regulação da disponibilidade de glicocorticóides. 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 esteróides mediado pela AKR1D1, este estudo investigou as interações da enzima com os principais hormônios esteróides masculino e feminino, 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 utilizando 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. Nos dois sistemas, o triptofano (TRP230) foi o resíduo com maior energia, o que possivelmente está relacionado com sua função de posicionar o ligante na enzima.

A energia de atração total observada no complexo TES-AKR1D1 foi superior à do 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 esteróides 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.; UDRIȘTIOIU, 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 5 α -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 17 α -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, Arie. 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 - Estrutura química do delta(4)-3-cetosteróide.

Figura 2 - Total da energia de interação em função do raio considerando duas constantes dielétricas, $\epsilon=10$ e $\epsilon=40$, para o complexo TES-AKR1D1.

Figura 3 - Total da energia de interação em função do raio considerando duas constantes dielétricas, $\epsilon=10$ e $\epsilon=40$, para o complexo STR-AKR1D1.

Figura 4 - Painel gráfico com os valores energéticos alcançados pelos principais resíduos envolvidos nas interações TES-AKR1D1.

Figura 5 - Paine gráfico com os valores energéticos alcançados pelos principais resíduos envolvidos nas interações STR-AKR1D1.

CÓDIGO: SB1791

AUTOR: LUCAS VINÍCIUS DOS SANTOS COSTA

ORIENTADOR: VIVIANE SOUZA DO AMARAL

TÍTULO: Associação entre consanguinidade e a prevalência de cardiopatias congênitas no Rio Grande do Norte.

Resumo

As cardiopatias congêntias são alterações na embriogênese cardíaca que geram defeitos morfológicos em sua estrutura. Essas alterações podem ser subdivididas em cianóticas e acianóticas, a depender de sua relação com o aporte de sangue oxigenado que o paciente recebe. Sabe-se que as síndromes genéticas possuem relação com a consanguinidade, pois há uma menor variação genética, o que predispõe a genes defeituosos. Este estudo observacional, analítico e transversal visa compreender a relação das cardiopatias congêntias com a consanguinidade.

Nesse sentido, utilizou-se o projeto guarda-chuva intitulado: “Diagnóstico Situacional das Cardiopatias Congêntias Cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte” da Dra. Suerda Emiliana Cavalcanti Dantas de Amorim. A partir de informações coletadas, mediante prévia autorização, tais pacientes foram contactados e submetidos a um formulário, onde foram observados os aspectos da consanguinidade.

Palavras-chave: Consanguinidade; Cardiopatia Congênita

TITLE: Association between consanguinity and the prevalence of congenital heart diseases in Rio Grande do Norte.

Abstract

Congenital heart diseases are changes in cardiac embryogenesis that lead to morphological defects in its structure. These changes can be subdivided into cyanotic and acyanotic, depending on their relationship with the oxygenated blood supply that the patient receives. It is known that genetic syndromes are related to consanguinity, as there is less genetic variation, which predisposes to defective genes. This observational, analytical, and cross-sectional study aims to understand the relationship between congenital heart diseases and consanguinity. In this sense, the umbrella project entitled: 'Situational Diagnosis of Surgical Congenital Heart Diseases in the State of Rio Grande do Norte' by Dr. Suerda Emiliana Cavalcanti Dantas de Amorim was used. Based on information collected, with prior authorization, such patients were contacted and submitted to a questionnaire, where aspects of consanguinity were observed.

Keywords: Consanguinity; Heart Defects, Congenital

Introdução

O Rio Grande do Norte é considerado o estado brasileiro com uma das maiores prevalências de consanguinidade e doenças genéticas no Brasil (REIS et al., 2023). Este plano de trabalho é proposto para ser desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, campus Natal, visto a relevância das cardiopatias congênitas de ordem genética na saúde dos norte-rio-grandenses.

Nesse contexto, as cardiopatias congênitas entram como um grupo de anomalias estruturais do coração presentes desde o nascimento, afetando o desenvolvimento cardíaco fetal. Estas condições podem ter diversas origens, incluindo fatores genéticos, que estão imbricados com a consanguinidade elevada, e desempenham um papel crucial na predisposição e na severidade das anomalias cardíacas (ROSA, Rosana Cardoso M. et al).

Diante do alto número de doenças genéticas observadas no Rio Grande do Norte, surge a necessidade de investigar a relação entre a consanguinidade e a origem das cardiopatias congênitas. Portanto, é importante compreender o contexto da consanguinidade no estado e seu impacto na origem dessas anomalias cardíacas, bem como suas consequências no que tange à necessidade de procedimentos cirúrgicos em pacientes do estado, a fim de diminuir consideravelmente os índices de mortalidade das cardiopatias congênitas (AMORIM, S.E.C; 2023). Dessa forma, visa-se aplicar questionários e revisar bancos de dados de 2018 a 2022 do hospital de referência nas cirurgias cardíacas pediátricas extraídos do estudo maior, a fim de auxiliar na tomada de decisão de autoridades, profissionais da área de saúde e políticas públicas.

Assim, frente aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), postulados pela Organização das Nações Unidas (ONU) para serem atingidos até o ano de 2030, serão contemplados pontos importantes, em especial, a saúde e bem estar - elencada no terceiro tópico, com o fito de mitigar os índices de mortes evitáveis e reduzir significativamente a mortalidade, principalmente, infantil.

Metodologia

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal

Objetivo Geral: Investigar a associação entre consanguinidade e a prevalência de cardiopatias congênitas no Rio Grande do Norte.

○ Objetivos Específicos:

- Avaliar a taxa de consanguinidade entre famílias de crianças com cardiopatias congênitas;
- Comparar a prevalência de cardiopatias congênitas entre crianças de casamentos consanguíneos e não consanguíneos;
- Identificar possíveis padrões genéticos comuns nas famílias estudadas.

■ Avaliar as causas genéticas das cardiopatias e suas implicações cirúrgicas.

○ Objetivos específicos da atuação do bolsista:

■ Entrar em contato com os pais para consulta de disponibilidade;

■ Aplicação de formulário padronizado;

■ Levantamento bibliográfico;

■ Escrita de relatório parcial e final das atividades realizadas;

■ Elaborar resumos para trabalhos científicos e congressos

Tal estudo foi realizado com base no projeto guarda-chuva intitulado: “Diagnóstico Situacional das Cardiopatias Congênitas Cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte” da Dra. Suerda Emiliana Cavalcanti Dantas de Amorim. A partir de informações coletadas, mediante prévia autorização, tais pacientes foram contactados e submetidos a um formulário, onde foram observados os aspectos da consanguinidade. O formulário foi elaborado de modo a avaliar questões de origem genética das cardiopatias com perguntas como:

A criança possui diagnóstico de cardiopatia congênita?

☐ Sim

☐ Não

Se sim, qual o diagnóstico clínico?

A criança já realizou cirurgia cardíaca?

☐ Sim

☐ Não

Se sim, qual o tipo de cirurgia e quando foi realizada?

Existe histórico de cardiopatias congênitas em outros membros da família?

☐ Sim

☐ Não

Se sim, quem?

Existe algum grau de parentesco entre os pais da criança?

☐ Sim

☐ Não

Se sim, qual o grau de parentesco?

Resultados e Discussões

É notório que a consanguinidade ou endogamia possui influência no aparecimento de doenças genéticas e que as cardiopatias congênitas também detém essa influencia genética, sobretudo as relacionadas a síndromes como a Síndrome de Down, por exemplo (Bittles Alan., 2011). Nessa perspectiva, é possível que genes passados entre famílias endogâmicas possam se relacionar com a maior incidências dessas alterações cardíacas. Tais eventos podem ser observados em regiões isoladas denominadas de "clusters", onde o efeito fundador pode ser evidenciado. (BITTLES, A. H.; BLACK, M., 2010). Desse modo, este presente estudo corrobora a importante relação entre fatores genéticos e a ocorrência de cardiopatias congênitas, reforçando o que já vem sendo documentado por diversos autores na literatura.

Trata-se de um recorte de um estudo maior intitulado: “Diagnóstico Situacional das Cardiopatias Congênitas Cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte” da Dra. Suerda Emiliana Cavalcanti Dantas de Amorim. A partir do contato com 552 pacientes, apenas 238 responderam positivamente e, mediante prévia autorização, coletou-se informações através de formulário, onde foram observados os aspectos das cardiopatias e da consanguinidade. O formulário foi elaborado de modo a avaliar questões de origem genética das cardiopatias, sendo um estudo observacional, analítico e transversal.

Dentre os resultados observados, foi notório o elevado grau de associação de cardiopatias com síndromes genéticas em que, dentre 238 participantes do estudo, cerca de 20 apresentavam Síndrome de Down, o que corresponde a 8 em cada 100 pacientes e mostra maior prevalência em relação às síndromes genéticas. Além disso, foram observadas, também, outras síndromes como: Noonan, Di George, Marfan e Williams. Assim, quando comparado aos número de nascidos vivos no Rio Grande do Norte, pode-se perceber uma maior taxa dessas cardiopatias em pacientes síndrômicos.

A redução da variabilidade genética decorrente da consanguinidade pode favorecer a expressão de mutações recessivas que, em populações de alta consanguinidade, levam a uma maior taxa de malformações, incluindo as cardíacas. No presente estudo, a consanguinidade entre os pais foi identificada em 3,8% dos casos ($n = 9$), com maior prevalência entre primos de primeiro grau (Reis et al., 2023). Embora esse número seja relativamente pequeno, é consistente com estudos que indicam uma associação direta entre casamentos consanguíneos e aumento da incidência de doenças autossômicas recessivas, incluindo defeitos cardíacos congênitos (ROSA, Rosana Cardoso M. et al., 2013). Existem limitações acerca da aplicação de formulários para o estudo sobre a consanguinidade, haja vista que muitos responsáveis pelas crianças, sobretudo mulheres, muitas vezes, perdem os sobrenomes de suas famílias, o que dificulta a identificação dessa relação de parentesco com seus maridos. Outrossim, surgiram dificuldades para responder ao formulário por parte dos participantes, sendo a maior parte da população estudada de baixo nível socioeconômico. Nesse sentido, ao questionar os participantes sobre se seriam parentes, alguns responderam que eram casados por exemplo, o que dificultou a análise dos resultados.

O cruzamento de dados sobre síndromes genéticas e consanguinidade pode significar que ambos os fatores estão implicados na etiologia das cardiopatias congênitas e devem ser considerados em estratégias de prevenção e diagnóstico. Autores como Amorim, Suerda (2022), defendem a ampliação do aconselhamento genético, especialmente em regiões onde a prática da consanguinidade ainda ocorre por motivos socioculturais.

Ainda é importante destacar que grande parte dos diagnósticos sindrômicos relatados foram baseados em avaliação clínica, o que limita a precisão diagnóstica. A ampliação do acesso a testes genéticos moleculares poderia não apenas confirmar diagnósticos, como também contribuir para o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos nas cardiopatias (Souza et al., 2021). O diagnóstico precoce e preciso pode impactar positivamente no tratamento clínico e cirúrgico, além de auxiliar o planejamento familiar.

Assim, os resultados desta pesquisa dialogam com a literatura vigente ao indicar que a genética exerce papel central na gênese das cardiopatias congênitas, seja por meio de síndromes identificáveis clinicamente, seja por heranças genéticas recessivas favorecidas por uniões consanguíneas. Ainda que este estudo possua limitações.

Neste cenário, torna-se evidente a importância de se investir em estratégias públicas de saúde voltadas à educação genética da população, especialmente em regiões onde a consanguinidade ainda é uma prática culturalmente aceita ou frequente. Programas de aconselhamento genético, aliados ao fortalecimento das redes de atenção básica e especializada, podem contribuir significativamente para a redução da incidência de cardiopatias congênitas e outras doenças genéticas evitáveis.

Em suma, este trabalho contribui para o entendimento das possíveis causas genéticas das cardiopatias congênitas na população estudada e destaca a urgência de políticas públicas voltadas à prevenção, diagnóstico precoce e aconselhamento genético, reforçando a necessidade de uma abordagem multidisciplinar e preventiva no cuidado com a saúde da criança.

Conclusão

Este estudo, apesar de suas limitações metodológicas e do número relativamente restrito de participantes, fornece evidências importantes sobre a associação entre cardiopatias congênitas, síndromes genéticas e consanguinidade no contexto populacional do Rio Grande do Norte. Os dados obtidos revelam que as cardiopatias congênitas possuem uma relação significativa com alterações genéticas herdadas ou de origem sindrômica, indicando um perfil clínico que merece atenção redobrada por parte dos profissionais de saúde, especialmente aqueles que atuam em áreas de atenção primária e em regiões com maior prevalência de casamentos consanguíneos.

Durante a análise dos formulários e históricos clínicos, observou-se que uma proporção expressiva dos pacientes apresentava alguma síndrome genética associada à cardiopatia. Dentre essas, destacaram-se, em ordem de prevalência, as síndromes de Down, Noonan, DiGeorge, Marfan e Williams. Tal achado está em consonância com a literatura científica nacional e internacional, que aponta essas condições como comorbidades frequentes em crianças cardiopatas. A presença dessas síndromes reforça a importância da triagem genética e do diagnóstico precoce para o manejo adequado dessas crianças, tanto no aspecto clínico quanto cirúrgico.

Adicionalmente, identificou-se que uma parcela significativa dos responsáveis relatou algum grau de consanguinidade no relacionamento conjugal. Essa constatação é preocupante, pois, como já amplamente documentado, a consanguinidade reduz a variabilidade genética, aumentando a chance de herança de doenças recessivas e malformações congênitas, incluindo

as cardiopatias. Embora o número de casos consanguíneos não permita generalizações absolutas, o dado é relevante e aponta para a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a temática.

Neste cenário, torna-se evidente a importância de se investir em estratégias públicas de saúde voltadas à educação genética da população, especialmente em regiões onde a consanguinidade ainda é uma prática culturalmente aceita ou frequente. Programas de aconselhamento genético, aliados ao fortalecimento das redes de atenção básica e especializada, podem contribuir significativamente para a redução da incidência de cardiopatias congênitas e outras doenças genéticas evitáveis.

Em suma, este trabalho contribui para o entendimento das possíveis causas genéticas das cardiopatias congênitas na população estudada e destaca a urgência de políticas públicas voltadas à prevenção, diagnóstico precoce e aconselhamento genético, reforçando a necessidade de uma abordagem multidisciplinar e preventiva no cuidado com a saúde da criança.

Referências

BITTLES, A. Assessing the influence of consanguinity on congenital heart disease. *Annals of Pediatric Cardiology*, v. 4, n. 2, p. 111, 2011.

BITTLES, A. H.; BLACK, M. L. The impact of consanguinity on neonatal and infant health. *Early Human Development*, v. 86, n. 11, p. 737–741, nov. 2010.

OLIVEIRA, P. H. A. et al. Síndromes Genéticas Associadas a Defeitos Cardíacos Congênitos e Alterações Oftalmológicas – Sistematização para o diagnóstico na prática clínica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Disponível em: “Síndromes Genéticas Associadas a Defeitos Cardíacos Congênitos”

PACTO Global da ONU - Rede Brasil. Disponível em: <https://www.pactoglobal.org.br/ods-e-agenda-2030/>. Acesso em: 7 jun. 2024.

ROSA, Rosana Cardoso M. et al. Cardiopatias congênitas e malformações extracardíacas. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 31, n. 2, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-05822013000200017>.

AMORIM, Suerda Emiliana Cavalcanti Dantas de. Diagnóstico situacional das cardiopatias congênitas cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte. 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

Reis, L. C., Murillo Vizcardo, L. E., Maia Coutinho, F., Fadi Geha, Y., da Silva Júnior, W. F., Arante, T., de Lima Silva, E. V. Consanguinity and genetic diseases in Brazil: an overview. *International Journal of Medical Reviews*, 2023; 10(1): 435-446. doi: 10.30491/ijmr.2022.305198.1221

Souza, C. F. M., Schwartz, I. V. D., Ruschel, S. P., Puga, A. C., Reis, A. M., Costa, F. S., Dias, R. P., Flores, R. Z., & Schuler, L. (2021). O ENSINO DE GENÉTICA NA

MEDICINA: COMO OS ALUNOS PERCEBEM A GENÉTICA CLÍNICA. Revista Brasileira de Educação Médica, 20(2–3), 33–40. <https://doi.org/10.1590/1981-5271V20.2-3-006>

Góes, Andréa Carla de Souza e 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) [online]. 2014, v. 20, n. 3 [Acessado 10 Setembro 2022], pp. 561-577. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1516-73132014000300004>>. ISSN 1980-850X.

Campion M, Goldgar C, Hopkin RJ, Prows CA, Dasgupta S. Genomic education for the next generation of health-care providers. Genet Med. 2019 Nov;21(11):2422-2430. doi: 10.1038/s41436-019-0548-4. Epub 2019 May 21. PMID: 31110330.

MELO, Josievertton Bruno Vital de. RAROS – REPORTAGEM EM PROFUNDIDADE SOBRE DOENÇAS RARAS NO RIO GRANDE DO NORTE. 2021. 24 f. TCC (Graduação) - Curso de Comunicação Social, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ações de Educomunicação em Doenças Raras. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sgtes/educomunicacao-em-doenca-raras>. Acesso em: 26 fev. 2024.

BVSMS. Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/>>. Acesso em: 28 fev. 2024.

DATASUS. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 20 Jun. 2024.

MELO, Josievertton Bruno Vital de. RAROS – REPORTAGEM EM PROFUNDIDADE SOBRE DOENÇAS RARAS NO RIO GRANDE DO NORTE. 2021. 24 f. TCC (Graduação) - Curso de Comunicação Social, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

MELO, Josievertton 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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 199, de 30 de Janeiro de 2014. Brasília, Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html. Acesso em: 26 fev. 2023.

CÓDIGO: SB1800

AUTOR: SARAH ELISABETH ARAUJO FRANCO

COAUTOR: MARCEL MIRANDA DE MEDEIROS SILVA

ORIENTADOR: MARIA DE FATIMA FREIRE DE MELO XIMENES

TÍTULO: Flebotomíneos de importância em saúde pública em área remanescente de Mata Atlântica em Parnamirim

Resumo

Com a expansão urbana, as leishmanioses também se expandiram em estados do Nordeste e outros. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a diversidade, abundância e a taxa de infecção natural de flebotomíneos, dípteros hematófagos. Dentre eles as espécies que transmitem protozoários do gênero *Leishmania* entre humanos, cães e outros animais. As amostras de fêmeas foram coletadas com armadilhas luminosas CDC e levadas ao laboratório para dissecação, com intestino e glândula salivar separados para análise de infecção por *Leishmania* e as demais partes usadas para clarificação, montagem em lâminas e análise microscópica. A identificação taxonômica resultou em *Psychodopygus wellcomei*, *Psathyromyia abonnenci* e maioria *Evandromyia walkeri*. Das 60 fêmeas analisadas, obtivemos resultado positivo para *Leishmania infantum* em *Ev. walkeri* (6 das 21 testaram positivo; 28,57%), *Psathyromyia cf. brasiliensis* (1/1; 100% infectada) e *Psychodopygus wellcomei* (4 das 36 testaram positivo; 11,11%). Esses resultados remetem para a necessidade de vigilância entomológica permanente, preservação das áreas verdes e educação em saúde.

Palavras-chave: Flebotomíneos. Leishmaniose. Infecção natural.

TITLE: SANDS FLIES OF PUBLIC HEALTH IMPORTANCE IN THE REMAINING AREA OF ATLANTIC FOREST IN PARNAMIRIM

Abstract

With urban expansion, leishmaniasis has also expanded in Northeastern states and beyond. Thereby, the present study aims to evaluate the diversity, abundance, and natural infection rate of phlebotomines, hematophagous dipterans, including species that transmit protozoa of the genus *Leishmania* among humans, dogs, and other animals. Female specimens were collected using CDC light traps and taken to the laboratory for dissection, with the intestine and salivary gland separated for analysis of *Leishmania* infection and the remaining parts used for clearing, slide mounting, and microscopic analysis. Taxonomic identification resulted in *Psychodopygus wellcomei*, *Psathyromyia abonnenci*, and majority *Evandromyia walkeri*. 60 of the analyzed females tested positive for *Leishmania infantum* in *Ev. walkeri* (6 out of 21 tested positive; 28.57%), *Psathyromyia cf. brasiliensis* (1/1; 100% infected), and *Psychodopygus wellcomei* (4 out of 36 tested positive; 11.11%). These results highlight the

need for continuous entomological surveillance, preservation of green areas, and health education.

Keywords: Sand flies. Leishmaniasis. Natural infection.

Introdução

A leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais pertencem à subfamília Phlebotominae da família dos dípteros Psychodidae. Essa enfermidade é transmitida através da picada de insetos hematófagos vetores do gênero *Lutzomyia*, *Psychodopygus*, *Pintomyia* e *Nyssomyia*, os flebotomíneos (figura 1), são vetores de agentes patogênicos diferentes tais como vírus, bactérias, e os protozoários responsáveis pelas várias formas de leishmanioses (Maroli et al, 2015). Ademais, os flebotomíneos são os únicos insetos hematófagos comprovados como vetores de protozoários responsáveis pelas várias formas de leishmanioses (Maroli et al, 2015). Ademais, os flebotomíneos são os únicos insetos comprovados como vetores de protozoários do gênero *Leishmania*, como a *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* no Rio Grande do Norte e outros estados da região Nordeste (Killick-Kendrick, 1999). Eles medem cerca de três milímetros, se reproduzem na areia (desse modo, flebotomíneos imaturos não são facilmente identificados), possuem pernas longas e finas, são amarelados e pilosos, por isso, conhecidos comumente como mosquito-palha. Voam saltitando e ao pousar mantêm suas asas levantadas. São insetos de hábitos crepusculares e noturnos, bem como a maioria dos insetos hematófagos.

Quanto à alimentação, as fêmeas são hematófagas e tem a picada telmofágica, isto é, cortam a pele dos hospedeiros para absorver sangue, o que auxilia na produção de seus ovos, já os machos se alimentam apenas de seiva vegetal. Algumas espécies são seletivas em seus hábitos alimentares, mas as mais generalistas se alimentam de diferentes animais, bem como humanos, cães, raposas e roedores, ainda assim, o cão é o principal reservatório (Macedo-Silva VP, et al. 2014). Como a maioria dos ectoparasitas que se alimentam de sangue, elas injetam proteínas salivares e outros compostos bioquímicos, que agem como anticoagulantes, promovendo o fluxo contínuo de sangue (Bowles et al., 2015). Possuem voo quase totalmente silencioso, em combinação com o seu pequeno tamanho (Killick-Kendrick, 1999, Maroli et al., 2012; Bowles et al., 2015), o que pode explicar sua capacidade de efetuar múltiplas picadas sem ser percebido.

A picada do flebotomíneo fêmea *Lutzomyia longipalpis* pode infectar pessoas em áreas urbanas e rurais, resultando em uma preocupação significativa em saúde pública em várias partes do mundo, pois com a expansão urbana, unido ao aumento da degradação ambiental em exponencial, os insetos são forçados a sair de seu habitat natural à procura de alimento, consequentemente, as leishmanioses também se expandem (Killick-Kendrick, 1999). No viés da manifestação clínica, há mais de uma forma de apresentação da leishmaniose, a visceral (calazar), cutâneo-mucosas e a tegumentar (cutânea) (Ministério da Saúde 2007.).

Em suma, o objetivo deste estudo consiste em inventariar espécies de flebotomíneos e suas associações bioecológicas em uma área remanescente de mata atlântica (Mata do Jiqui) em Parnamirim, visto que, a ocorrência de flebotomíneos em áreas de mata próximas a centros urbanos, assim como as características de sua distribuição em relação à vegetação e os perfis de distribuição populacional das espécies nos diferentes ambientes, é importante visto que as estratégias de intervenção incluem: o manejo do vetor por meio do controle do ambiente, o

diagnóstico e tratamento precoces dos casos humanos e a promoção de medidas educacionais para as comunidades em risco. Logo, a compreensão dos processos ecológicos associados à ocorrência das espécies vetoras nos diversos ambientes é fundamental para entender a adaptação e colonização desses insetos nas áreas de ocupação humana e, conseqüentemente, a introdução e veiculação dos patógenos e ocorrência da doença (Jeronimo, 2004; Macedo, 2014; Nascimento et al., 2008; Ximenes et al., 2000, 2007, 2009; Pinheiro et al., 2013, 2020, 2021).

Metodologia

Para as capturas, foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC (Center for Disease Control), que consistem em uma base onde se encontra uma lâmpada e um ventilador (sugador) ligados a uma bateria de seis volts e instaladas a 1,5 metros do solo e funcionando por 12 horas ininterruptas, como são insetos hematófagos noturnos as capturas são realizadas entre o pôr e o nascer do sol. Em períodos chuvosos, coloca-se uma placa de metal acima da lâmpada para proteger o material. Acoplada a essa base existe uma sacola confeccionada com tecido fino para armazenamento dos insetos, onde também contém a etiqueta dizendo o número da CDC, facilitando depois a triagem para endereçar o ponto exato da coleta. O objetivo da armadilha é atrair os insetos pela luminosidade, fazendo-os serem sugados pelo ventilador para dentro da gaiola, onde ficam armazenados até a retirada para triagem. As coletas ocorrem em uma área remanescente de mata atlântica (Mata do Jiqui) em Parnamirim, sob a responsabilidade da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN).

Após as capturas, as armadilhas foram recolhidas em campo e transportadas até o Laboratório de Pesquisa em Entomologia (LABENT) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), mantidos a -20°C até o momento da triagem, montagem e identificação. Após a triagem, foi feita a sexagem dos espécimes armazenados, acondicionados em frascos contendo álcool 70% e etiquetados com a identificação da data e ponto de captura. Posteriormente, o material triado foi processado, isto é, clarificação, diafanização e montagem das lâminas. Em algumas fêmeas foi feito a dissecação, onde seu abdômen foi enviado para o Instituto de Medicina Tropical (IMT) na UFRN em microtubos com álcool 70%, para avaliar traços de infecção de *Leishmania*, a cabeça e final do abdômen permanece no LABENT para identificação.

Os flebotômíneos foram então montados na lâmina pós clarificação, separando cabeça e tórax para melhor visão microscópica na identificação das espécies. A identificação foi feita em microscópios ópticos e estereomicroscópio, por meio de observação de características morfológicas, baseada em chave dicotômica especializada (Galati, 2017).

Após identificação os insetos serão organizados separadamente, etiquetados e armazenados no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Análises estatísticas:

A análise para determinação e comparação de diversidade de insetos entre os ambientes foi feita pelo Índice de Diversidade Shannon-Wiener (H') (MAGURRAN 1988). Para cálculo desse índice, será utilizado o software Ecological Methodology versão 5.2 (KENNEY;

KREBS 2000). O índice de abundância de espécies (ISA) e o índice padronizado de abundância de espécies (SISA) (ROBERTS; HSI 1979) serão utilizados para análise de abundância dos dados obtidos. Os valores de ISA serão determinados e convertidos em SISA, com valores entre 0 e 1, utilizando-se o Microsoft Office Excel 2007.

Para a extração de DNA, o tórax e parte do abdômen das fêmeas de flebotomíneos foram individualmente dissecados em estereomicroscópio. Assim, o DNA é extraído de acordo com as instruções do fabricante pelo QIAamp DNA mini-kit (Qiagen, Hilden, Germany). O DNA é eluído em volume de 100 µL e então é submetido ao Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) com o intuito de quantificar e avaliar o grau de pureza da amostra. A amostra de DNA é armazenada a -20°C até a realização da qPCR.

Na reação em cadeia da Polimerase (qPCR) utilizando TaqMan, o volume final da reação o usando foi 10 µl contendo 4 µl de amostra de DNA, 5 µl Taqman Master Mix (Applied Biosystems), 0,375µl de cada primer (375 nM) e 0,25µL (250 nM) de sonda. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Todas as amostras foram testadas em duplicate. O ponto de corte foi definido com valor de Ct definido pelo limite mínimo de detecção e qualquer valor de Ct abaixo desse limite foi considerado negativo. A reação foi realizada no QuantStudio 3 (Thermo-Fisher).

Resultados e Discussões

O Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral entre 1980 e 2005, 82,5% dos quais na região Nordeste. Desde então, a leishmaniose visceral gradualmente se espalhou para outras regiões do país. Em 1998, as outras regiões relataram 15% de todos os casos. De 1998 a 2005 foram registrados casos autóctones em 1.904 municípios diferentes do país (34,2%) sugerindo o avanço de leishmania para as áreas urbanas.

Foi realizada uma coleta na EMPARN em 25 de março de 2024 com mais de 600 fêmeas nas quatro CDCs instaladas no local, os resultados variam entre *Psychodopygus wellcomei*, *Evandromyia evandroi* e majoritariamente *Evandromyia walkeri*. Dessas, 60 foram analisadas (Gráfico 1) e obteve-se resultado positivo para *Leishmania infantum* em *Evandromyia walkeri* (6 das 21 testaram positivo; 28,57%), *Psathyromyia cf. brasiliensis* (1/1; 100% infectada) e *Psychodopygus wellcomei* (4 das 36 testaram positivo; 11,11%). As fêmeas restantes estão em processo de identificação e verificação de virologia, além disso, foram encontrados mais 216 machos, dos quais se destacam 116 *Ps. wellcomei*, 95 *Ev. walkeri* e 5 *Pa. brasiliensis*, mostrando a predominância dos *Ps. wellcomei* nos períodos chuvosos de março.

A espécie de flebotomíneo *Ps. wellcomei* é a principal vetora de *Leishmania braziliensis* no ambiente florestal da região amazônica e tem como hábito picar o indivíduo mesmo durante o dia, sendo uma espécie de importância médico-sanitária. Já a *Ev. evandroi* é comum no Nordeste e encontrada em vários locais de área de mata no Rio Grande do Norte, e vem sendo encontrada também em ambientes peridomiciliares, mostrando o poder de adaptação da espécie a ambientes sob ação antrópica – ambientes degradados, modificados, alterados pelos humanos – e risco potencial de transmissão de espécies de *leishmania*. Quanto a *Ev. walkeri*, ainda não se conhece sua importância epidemiológica, contudo, já foi encontrada infectada com o agente etiológico da leishmaniose tegumentar (cutânea).

Reservatórios silvestres e o controle de vetores representam grandes desafios para o controle da doença, uma vez que há necessidade de um melhor conhecimento do comportamento do vetor nas áreas urbanas, também pelo fato das atividades de controle envolverem altos custos operacionais. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde tem apoiado a investigação sobre o diagnóstico laboratorial da infecção e doença em humanos e cães. No entanto, é importante uma avaliação da eficácia das estratégias de controle e o desenvolvimento de novas tecnologias que possam contribuir para a vigilância e o controle da leishmaniose visceral no país.

Conclusão

Urge, então, análises de mais amostras para que possamos mostrar o real papel dessas espécies como vetores de *Leishmania infantum*, os resultados encontrados, com foco em *Ps. wellcomei* e *Ev. walkeri* infectados com *L. infantum*, remetem à necessidade de vigilância entomológica permanente, a preservação das áreas verdes e constante educação em saúde.

Referências

- Medeiros Silva et al. Diversity and bioecological characteristics of phlebotominae species (Diptera: Psychodidae) in endemic areas of visceral and cutaneous leishmaniasis—an update. (2025) Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jme/tjaf069>>
- Bowles, Colonel David E.; Britch, Dr. Seth C.; Linthicum, Dr. Kenneth J.; Dr. Johnson, Richard N; Linton, Dr. Yvonne-Marie; White, Dr, Graham B. 2015. Technical Guide No. 49 - Sand Flies (Diptera: Psychodidae:
- Galati, E. A. B. et al. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Parasite, v. 24, n. 26, 2017. <doi: 10.1051/parasite/2017027>.
- Jeronimo, S. M. et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. Scand J Infect Dis, v. 36, n. 6-7, p. 443–449, 2004.
- Kenney, A. J.; Krebs, C. J. Programs for Ecological Methodology, 2 ed. University of British Columbia. Vancouver, Canada. 2000.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinical Dermatology 17:279-289. Disponível em: <[http://www.cidjournal.com/article/S0738-081X\(99\)00046-2/abstract](http://www.cidjournal.com/article/S0738-081X(99)00046-2/abstract)>.
- Macedo, V.P.S.; Martins D.; Queiroz, P. V.; Pinheiro M.P.G.; Freire C.C.; Queiroz JW.; Dupnik K., Pearson, R.; Wilson, M.; Jeronimo S.M.B. Ximenes M.F.F. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Liehamnia infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Journal of Medical Entomology 51: 237-244. 2014
- Magurran, A. E. Ecological diversity and its measurement. Cambridge University Press, London, p. 179, 1988.

- Maroli, M.; Feliciangeli, M. D.; Bichaud, L.; Charrel, R. N.; Grandoni, L. 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Medical and Veterinary Entomology. Review article. (2012), doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x Disponível em: <http://leishmaniasis.net/sites/default/files/EDENext022_0.pdf>.
- Nascimento, E. T. et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. Cad. Saúde Pública 24: 2964-2967, 2008.
- Pinheiro, M.P.G.; SILVA, J.H.T.; Cavalcanti, K.B.; Azevedo, P.R.M.; Ximenes M.F.F.M. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of northeast Brazil. Journal of Vector Ecology 38: 1-10. 2013
- Pinheiro, M. P. G.; Ximenes M.F.F.M. Anthrophily of *Lutzomyia wellcomei* (Diptera: Psychodidae) in an atlantic forest conservation unit in northeast Brazil. Journal of Medical Entomology, v. 53, n. 6, p. 1444–1448, 2016.
- Pinheiro, M.P.G., Silva-Inacio, C.L.S.; Silva, M. M.M., Araujo, P.S.F., Fagundes P. S., Ximenes, M.F.F.M. Potential vectors of *Leishmania* spp. in an Atlantic Forest conservation unit in northeastern Brazil under anthropic pressure. Parasites & Vectors. 2021.
- Shimabukuro, P. H. F.; Andrade, A. J. DE; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. Zookeys, 660:67–106, 2017. <<https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>>.
- Ximenes, M.F.F.M. et al. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Journal of Medical Entomology 37(1):162-169. 2000
- Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4: e584. doi: 10.1371/journal.pntd.0000584.

Anexos

Foto autoral de Flebotomíneos fêmeas e machos capturados via CDC sendo triados em lupa estereoscópica.

Gráfico 1: Análise em flebotomíneos fêmea para *Leishmania infantum* em *Evandromyia walkeri* (6 das 21 testaram positivo; 28,57%), *Psathyromyia* cf. *brasiliensis* (1 testada e deu positivo; 100%) e *Psychodopygus wellcomei* (4 das 36 testaram positivo; 11,11%).