

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA  
REGIÃO CENTRO-OESTE

ANA LIGIA BARBOSA MESSIAS

**EFEITOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE  
FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO  
TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, PROPRANOLOL E HESPERIDINA.**

CAMPO GRANDE – MS  
2024

ANA LIGIA BARBOSA MESSIAS

**EFEITOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE  
FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO  
TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, PROPRANOLOL E HESPERIDINA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor.

Linha de Pesquisa: Atenção à saúde integral da Criança, Adolescente e Gestante.

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares.

CAMPO GRANDE – MS

2024




**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**  
**Doutorado**

Aos vinte e sete dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e quatro, às dezoito horas, na videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Durval Batista Palhares (UFMS), Alexandra Maria Almeida Carvalho (UFMS), Almir de Sousa Martins (-), Deborah Ribeiro Nascimento (IAPES) e Fabiana Alves (FASEH), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **ANA LÍGIA BARBOSA MESSIAS**, CPF \*\*\*.186.671-\*\*, Área de concentração em Saúde e Sociedade, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**EFEITOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, PROPRANOLOL E HESPERIDINA**" e orientação de Durval Batista Palhares. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AValiação
Dr. Durval Batista Palhares (Interno) Presidente da Banca Examinadora	 Documento assinado digitalmente <b>DURVAL BATISTA PALHARES</b> Data: 29/09/2024 11:27:44-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Alexandra Maria Almeida Carvalho (Interno)	 Documento assinado digitalmente <b>ALEXANDRA MARIA ALMEIDA CARVALHO</b> Data: 30/09/2024 09:14:03-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dr. Almir de Sousa Martins (Externo)	 Documento assinado digitalmente <b>ALMIR DE SOUSA MARTINS</b> Data: 30/09/2024 18:41:30-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Deborah Ribeiro Nascimento (Externo)	 Documento assinado digitalmente <b>DEBORAH RIBEIRO NASCIMENTO</b> Data: 30/09/2024 20:24:32-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dra. Fabiana Alves (Externo)	 Documento assinado digitalmente <b>FABIANA ALVES</b> Data: 01/10/2024 05:27:26-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação
Dr. Cesar Augusto Sobrinho (Interno) (Suplente)	 Documento assinado digitalmente <b>CESAR AUGUSTO SOBRINHO</b> Data: 01/10/2024 08:45:36-0300 Verifique em <a href="https://validar.iti.gov.br">https://validar.iti.gov.br</a>	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovação <input type="checkbox"/> Aprovação c/ revisão <input type="checkbox"/> Reprovação

RESULTADO FINAL:  APROVAÇÃO  APROVAÇÃO COM REVISÃO  REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES: A pós-graduanda apresentou sua defesa em tempo hábil, foi clara e concisa e respondeu todas as perguntas dos examinadores. Por unanimidade concordaram com a aprovação da Defesa da Tese.

  
Documento assinado digitalmente  
**ANA LÍGIA BARBOSA MESSIAS**  
Data: 01/10/2024 10:48:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) Aluno(a)

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Dedico este trabalho aos meus pais João Messias (in memoriam) e Lucrecia Vieira Barbosa, dedico ao meu filho João Lucas Leite Barbosa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, soberano sobre todas as coisas.

Ao Prof. Dr. Durval Batista Palhares, pela oportunidade de contribuir com esse estudo tão relevante para a ciência. Deixo aqui registrado que aprendi muito mais que teoria; levo comigo não apenas o aprendizado técnico, mas também o exemplo de ética e cuidado que o senhor representa. Sua dedicação e carinho com cada paciente, assim como sua disponibilidade para compartilhar sabedoria, experiência e um olhar visionário sobre a pesquisa científica, fazem do senhor um exemplo para todos nós.

A família “Palhares”, Dra. Marilene, Dr. Durval e Alexandre, pela confiança no meu trabalho; gratidão, respeito e admiração eterna. O empenho e disposição de vocês me comoveu muitas vezes. Sempre serão grandes exemplos de resiliência e determinação para mim!

Ao Prof. Dr. Almir de Sousa Martins, por transmitir seus conhecimentos de forma genuína e generosa. Pelo apoio incondicional e paciência que recebi em momentos importantes, e a nunca desistir, mesmo diante de desafios. Suas palavras de incentivo e conselhos foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

A minha mãe, por me apoiar incondicionalmente, pelo incentivo diário, e por ser meu exemplo de força. Te amo! Ao meu filho João Lucas, que sempre compreendeu minhas ausências. Você foi minha principal motivação.

Aos membros da banca, Dra. Déborah Ribeiro Nascimento, Dra. Fabiana Alves, Dra. Alexandra Maria Almeida Carvalho e Dr. César Augusto Sobrinho, pelas valiosas contribuições e direcionamentos. É um privilégio ter a possibilidade de aprender com suas ideias e reflexões.

A Dra. Paula Cristhina Niz Xavier pelo auxílio nas coletas e cuidado no preparo dos medicamentos no laboratório.

Ao IAPES – Instituto de Assistência e Pesquisa em Educação e Saúde – por apoiar financeiramente o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina (FAMED), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

A todos portadores da FOP, e aos voluntários sadios, pois sem a colaboração de vocês não haveria a possibilidade de desenvolver esse trabalho.

A Suzana Balaniuc, gostaria de expressar imensurável e sincera gratidão, durante essa jornada desafiadora; carinhosamente, minha “sister” do coração. Sua paciência, atenção e força me alcançaram em vários momentos menos fáceis. Sem sua ajuda e apoio, teria sido muito mais difícil.

A Lorena F. Lima, sou grata pela amizade, pelos momentos compartilhados. Sem o seu incentivo quando me inscrevi na seleção, este sonho não teria se tornado realidade.

A Letícia da Silva Oliveira, por sua competência e por ter tornado o final dessa jornada mais leve.

A todos amigos e colegas que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram durante esse estudo, levarei para a vida toda.

Ao finalizar esta etapa da minha vida acadêmica, sinto uma profunda gratidão por todos que estiveram ao meu lado nesta jornada desafiadora e gratificante; eu não poderia ter chegado até aqui sem o apoio e a orientação de muitas pessoas.

## RESUMO

A Fibrodissiplasia Ossificante Progressiva (FOP), é uma doença congênita, genética e rara. Caracterizada por malformações esqueléticas irreversíveis e intratáveis, com ossificações heterotópicas devastadoras, até o momento sem cura. Terapias anti-inflamatórias revelam potencial de melhora e controle das crises agudas. O tratamento com ácido ascórbico combinado com propranolol (FOPCON) tem demonstrado benefícios para os sintomas da FOP, por suas capacidades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiangiogênicas. A Hesperidina é um flavonóide antioxidante, com efeitos anti-inflamatórios, porém seu mecanismo de ação associado ao ácido ascórbico, na estabilização da FOP em alguns pacientes, é desconhecido, considerando que o acesso aos estudos de tecido de pacientes com FOP é praticamente inviável. Objetivo: analisar a expressão de mRNA de quatro genes alvo envolvidos na fisiopatologia da FOP, sendo eles COL1, ADRB2, TNF $\alpha$  e RUNX2 em células escamosas da boca (CEB), de pacientes portadores tratados com FOPCON (n = 8), portadores tratados com FOPCON+H (n = 7), versus controles saudáveis (n = 5), mediante tratamento durante seis meses. Comparou-se os resultados deste estudo com amostras de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) de estudos anteriores. Método: O RNA total foi extraído seguido por transcrição reversa e PCR em tempo real. O perfil de expressão relativa de quatro genes, em células escamosas da boca de pacientes com FOP versus controle foi significativamente diferente. Teste t não pareado e ANOVA foram utilizados. Resultados: as expressões basais de mRNA, confirmaram as diferenças significativas nos perfis de expressão dos genes TNF- $\alpha$  (p < 0,05) e COL1 (p < 0,05) e também para os genes ADRB2 (p < 0,05) e RUNX2 (p < 0,05), que antes apresentou apenas tendências de aumento. Os tratamentos dos pacientes FOP com o composto FOPCON (AA+PP) e FOPCON Hesperidina (AA+PP+H), apresentou efeitos sobre a expressão gênica de COL1, TNF- $\alpha$ , ADRB2 e Runx2 em FOP, caracterizando um perfil fenotípico distinto de CEB de FOP. Conclusão: O tratamento teve efeito na modulação gênica. O FOPCON (ácido ascórbico + propranolol), permitiu a modulação dos genes mesmo com adição de Hesperidina. Embora não exista sensibilidade no método capaz de diferenciar o efeito potenciador da Hesperidina, não houve prejuízo no tratamento com FOPCON e manteve a mesma condição em termos de expressão gênica. Os usos de células do epitélio bucal se tornam um potencial material, tanto para avaliação do tratamento no seu aspecto clínico e na obtenção de dados moleculares importantes, relacionados com a fisiopatologia da FOP.

**Palavras-chaves:** Fibrodissiplasia Ossificante Progressiva; Expressão de mRNA da FOP; células epiteliais; mucosa bucal; raspagens de células escamosas.

## ABSTRACT

Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) is a congenital, genetic, and rare disease. It is characterized by irreversible and untreatable skeletal malformations, with devastating heterotopic ossifications, and currently, there is no cure. Anti-inflammatory therapies show potential for improvement and control of acute crises. Treatment with ascorbic acid combined with propranolol (FOPCON) has demonstrated benefits for FOP symptoms due to its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-angiogenic properties. Hesperidin is an antioxidant flavonoid with anti-inflammatory effects; however, its mechanism of action, when combined with ascorbic acid in the stabilization of FOP in some patients, is unknown, considering that access to tissue studies from FOP patients is practically unfeasible. Objective: to analyze the mRNA expression of four target genes involved in the pathophysiology of FOP, namely COL1, ADRB2, TNF $\alpha$ , and RUNX2, in buccal epithelial cells (BEC) of patients treated with FOPCON (n = 8), patients treated with FOPCON+H (n = 7), versus healthy controls (n = 5), following treatment for six months. The results of this study were compared with samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from previous studies. Method: Total RNA was extracted, followed by reverse transcription and real-time PCR. The relative expression profile of four genes in buccal epithelial cells from FOP patients versus controls was significantly different. An unpaired t-test and ANOVA were used. Results: Basal mRNA expressions confirmed significant differences in the expression profiles of TNF- $\alpha$  (p < 0.05) and COL1 (p < 0.05) genes and also for the ADRB2 (p < 0.05) and RUNX2 (p < 0.05) genes, which previously only showed an increasing trend. The treatments of FOP patients with the FOPCON compound (AA+PP) and FOPCON Hesperidin (AA+PP+H) showed effects on the gene expression of COL1, TNF- $\alpha$ , ADRB2, and RUNX2 in FOP, characterizing a distinct phenotypic profile of FOP BEC. Conclusion: The treatment had an effect on gene modulation. FOPCON (ascorbic acid + propranolol) allowed gene modulation even with the addition of Hesperidin. Although there was no sensitivity in the method capable of differentiating the enhancing effect of Hesperidin, there was no harm in the treatment with FOPCON, and it maintained the same condition in terms of gene expression. The use of buccal epithelial cells becomes a potential material, both for evaluating treatment in its clinical aspect and for obtaining important molecular data related to the pathophysiology of FOP.

**Keywords:** Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP mRNA expression; epithelial cells; buccal mucosa; squamous cell scrapings.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Gene alvo e primers Oligonucleotídeos selecionados .....	38
<b>Tabela 2</b> – Perfil de expressão relativa de genes alvo em células de mucosa bucal FOP vs. Controle .....	46
<b>Tabela 3</b> – Perfil comparativo de expressão dos genes alvo da FOP em diferentes fontes celulares .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática histológica dos estágios de ossificação heterotópica endocondral na FOP .....	20
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática atualizada do ACVR humano, indicando d o m í n i o s e localizações de mutações do gene ACVR1/ALK2.GS, glicina-serina .....	21
<b>Figura 3</b> - Modelo esquemático de sinalização BMP na Fibrodisplasia Ossificante Progressiva .....	23
<b>Figura 4</b> - Hallux Valgus, Sinal patognomônico da FOP.....	25
<b>Figura 5</b> - Ossificação heterotópica na região dorsal, proximal .....	25
<b>Figura 6</b> - Padrão limitante anatômico de progressão das ossificações heterotópicas .....	26
<b>Figura 7</b> - E s t r u t u r a molecular da Hesperidina.....	30
<b>Figura 8</b> - Gráficos de dispersão <i>Scatter plot</i> apresentando a comparação da expressão dos genes alvo de CEB em FOP .....	44
<b>Figura 9</b> - Perfil de expressão relativa de mRNA de FOP CEB vs. Controles saudáveis .....	45
<b>Figura 10</b> - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de <i>Col1</i> .....	47
<b>Figura 11</b> - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	48
<b>Figura 12</b> - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de <i>ADBR2</i> .....	49
<b>Figura 13</b> – Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de <i>RUNX2</i> .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
AA	Ácido ascórbico
AA+H	Ácido ascórbico + Hesperidina
ACVR1	Gene do receptor da activina A tipo 1
ADRBQ	Gene adrenoceptor
ADRB2	Gene adrenoceptor Beta 2
ALK2	Gene da activina tipo 2
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
AR	Artrite reumatoide
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> – Proteína morfogênica óssea
BMP4	Gene da proteína Morfogenética Óssea tipo 4
CEB	Células Escamosas da Boca
COL1	Gene produtor de colágeno Tipo I
COL3	Gene produtor de colágeno Tipo III
COX-2	Inibidores seletivos da ciclooxigenase-2
DA	Dopamina

DEPEC	Pirocarbonato de dietila
DNase	Enzima desoxirribonuclease
dNTP	Mix contendo desoxinucleotídeos, citosina (dCTP), guanina (dGTP), timina (dTDP) e adenina (dATP)
FAMED	Faculdade de Medicina
FOP	Fibrodiasplasia Ossificante Progressiva
FOPCON	Ácido ascórbico com propranolol
HSD	Hesperidina
HST	Hesperitina
IPTC	Células-tronco pluripotentes
LCL	Linhas celulares linfo blastoides
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
IL-1	Interleucina do tipo 1
IL-6	Interleucina do tipo 6
MEC	Matriz extracelular
mg/kg	Miligramas por quilo
mg/kg/dia	Dosagem: miligramas por quilo de peso ao dia
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NE	Noradrelalina
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeos
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
OA	Cartilagens de osteoartrite (OA)
OH	Ossificação heterotópica
PF-4	Fator plaquetário
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina 2
PP	Propranolol
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico humano
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT	Transcrição reversa
RUNX2	Fator de Transcrição da Família RUNX 2

sscDNA	DNA complementar de fita simples
STZ	Estreptozotocina
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral tipo alfa
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VEGF	Fator de Crescimento endotelial vascular
Vitamina C	Ácido ascórbico
$\Delta$ CT	Delta CT (CT amostra – CT normalizador)
$\Delta\Delta$ CT	Delta delta CT
7nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Fibrodisplasia Ossificante Progressiva</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Histologia e Fisiopatologia da FOP</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Quadro clínico e diagnóstico (FOP)</b> .....	23
<b>2.4</b>	<b>Abordagem terapêutica da FOP</b> .....	27
<b>2.5</b>	<b>Flavonóides e potencial efeito antioxidante, anti-inflamatório e angiogênico</b> .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	33
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudo</b> .....	34
<b>4.2</b>	<b>Participantes da pesquisa</b> .....	34
<b>4.3</b>	<b>Crítérios de inclusão e exclusão</b> .....	35
<b>4.4</b>	<b>Procedimentos de coleta</b> .....	35
4.4.1	Coleta de raspado de mucosa oral .....	36
<b>4.5</b>	<b>Tratamento dos grupos (<i>modelo in vivo</i>)</b> .....	36
4.5.1	Tratamento com FOPCON (Grupo 3) .....	36
4.5.2	Tratamento com FOPCON + H (Grupo 4).....	36
<b>4.6</b>	<b>Preparo dos medicamentos</b> .....	37
<b>4.7</b>	<b>Modelo de experimento <i>in vivo</i></b> .....	37
4.7.1	Extração do RNA total e tratamento com DNase .....	37
4.7.2	Primers Oligonucleotídeos e genes alvo selecionados.....	38
4.7.3	Transcrição reversa (RT) .....	38
4.7.4	Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (Qpcr) .....	39
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	39
<b>4.9</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>ANEXOS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença genética rara de herança autossômica dominante. Sua característica principal é o desenvolvimento de ossificação extra esquelética, de maneira extensiva e progressiva, um processo também conhecido como ossificação heterotópica (OH), levando à incapacidade física cumulativa a cada crise (Pignolo, Shore e Kaplan, 2011).

Na fisiopatologia da doença, a via de sinalização envolvendo as proteínas morfogênicas de osso (Bone Morphogenetic Proteins- BMPs) estão comprometidas, devido à mutação em heterozigose que ocorre no Receptor tipo 1 da Ativina (Activin A receptor, Type1 - ACVR1), ativado pelas BMPs. A alteração desta via durante o estágio embrionário está correlacionada a malformações múltiplas durante sua ontogenia e, na vida pós-natal, corresponde a OH. Um diagnóstico de FOP é suspeito em um probando apresentando malformação de hálux valgo, ossificação heterotópica e confirmado pela identificação de uma variante patogênica heterozigótica no gene ACVR1/ALK2. (Barruet et al., 2021; Hino et al., 2015; Valer et al., 2019; De Brasi et al., 2021).

Sua condição patológica temo como característica a ocorrência de crises agudas (surtos) em inflamações locais que frequentemente culminam na formação de OH com perda significativa da mobilidade dos membros, comprometendo tendões, ligamentos, aponeuroses, fásia e outros tecidos conjuntivos do sistema músculo esquelético, redução da expansão da caixa torácica e comprometimento da articulação temporomandibular. Porém os olhos, coração, diafragma, músculos esfínterianos e músculos lisos viscerais, normalmente são poupados (Hino et al., 2015; 2017). (Kamal e Aprilya, 2020).

Exacerbações agudas podem durar semanas ou meses, acompanhadas ou não de febre baixa evidenciando um achado clínico, sendo que os primeiros sinais geralmente surgem antes da primeira década de vida. No entanto, em casos menos frequentes, o primeiro episódio pode ocorrer já na idade adulta. A progressão da FOP é tipicamente de axial para apendicular, cranial para caudal e proximal para distal (Gonçalves et al., 2005; Mantick et al., 2018; Pignolo et al., 2021).

Sem tratamento curativo até o momento, intervenções terapêuticas de abordagem multidisciplinar têm como objetivo principal o manejo sintomático da patologia, com ênfase na preservação da mobilidade e funcionalidade dos pacientes. O tratamento dos surtos agudos é geralmente baseado na administração criteriosa de corticosteroides em altas doses, anti-inflamatórios não esteroidais e inibidores de leucotrienos, os quais oferecem analgesia e um



controle eficiente da inflamação, embora não impeçam a progressão da ossificação heterotópica (Delai et al., 2004; Pignolo, Shore e Kaplan, 2011; 2018; Shah et al., 2019).

Dada à complexidade da etiologia dessa doença, cujo impacto físico é devastador, com consequências emocionais e sociais para o paciente e sua família, torna-se essencial o cuidado multidisciplinar aos portadores de FOP, com o objetivo de prolongar sua qualidade de vida (Kaplan et al., 2008). Com essa perspectiva, esta proposta representa uma continuidade e expansão das pesquisas já conduzidas por um grupo de pesquisadores de diferentes disciplinas e especialidades, sendo estas: Biologia Molecular, Medicina (pediatria e genética), Odontologia, Farmácia e Bioquímica, Fisioterapia e Enfermagem.

Palhares e colaboradores têm sugerido, desde 1997, o uso terapêutico de ácido ascórbico (AA) (Palhares, 1997; Palhares e Leme, 2001; Palhares et al., 2010). Posteriormente, o AA associado ao betabloqueador não-seletivo propranolol, patenteado como FOPCON (Martins et al., 2015), revelou-se eficaz no controle da doença, diminuindo a frequência de surtos e a formação de osso ectópico (Palhares et al., 2019).

As pesquisas de biologia molecular conduzidas por esse grupo, proporcionaram avanços no entendimento do comportamento da expressão de genes envolvidos, direta e indiretamente, nos processos de inflamação, fibrose e ossificação heterotópica, além de explorar esses genes com o uso de FOPCON (Balaniuc et al., 2019; Nascimento, 2014; Nascimento et al., 2017; 2021; Nascimento, 2018). A continuidade desses estudos é fortalecida pela sugestão de que a FOP seja uma doença de ordem inflamatória (Barruet et al., 2018; Haviv et al., 2019).

Já estabelecida a participação do sistema imune (Wolken et al., 2018), resta esclarecer na FOP a participação do sistema nervoso autônomo na regulação da inflamação e nas etapas de formação do osso ectópico (Salisbury et al., 2010; Salisbury et al., 2011), bem como a possível atuação coadjuvante do sistema renina angiotensina no controle da doença em resposta ao uso do betabloqueador não seletivo combinado ao ácido ascórbico (Balaniuc et al., 2019).

É importante destacar que o tratamento com FOPCON foi proposto baseado nas capacidades anti oxidativa e anti-inflamatória do ácido ascórbico (AA), bem como sua atividade na síntese de colágenos, associados ao potencial efeito antiangiogênico do propranolol (PP) (Palhares et al., 2019). Até o presente momento, nenhum outro grupo de pesquisa avaliou o efeito desses compostos em pacientes com FOP, antes e após tratamento *in vivo*, de forma controlada e contínua.

Recentemente, este grupo de pesquisa tem se interessado pelos benefícios da Hesperidina (HSD), um flavonoide antioxidante com potencial para melhorar doenças associadas ao estresse oxidativo e distúrbios relacionados à obesidade, devido aos seus efeitos

antiadipogênico, anti-inflamatório, antioxidante e anti-hipercolesterolêmico (Haidari et al., 2015).

A HSD é um bioflavonoide extraído da casca da laranja, reconhecido por seus benefícios no combate ao estresse oxidativo, por estimular o processo de osteogênese e por contribuir para a redução da neovascularização e inflamação (Mosqueda-Solís et al., 2018).

As ações farmacológicas relatadas, incluindo atividades anti-hiperlipidêmicas, cardioprotetoras, anti-hipertensivas e antidiabéticas, são atribuídas principalmente à sua ação antioxidante e à supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias. Com base nas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, inibidoras do estresse oxidativo e antiangiogênicas da HSD, surge a possibilidade de potencializar os efeitos do FOPCON (ácido ascórbico + propranolol) por meio da adição de uma dose diária de HSD ao tratamento na forma de ácido ascórbico + Hesperidina (AA+H), administrada entre as doses regulares de FOPCON desacelerando o processo inflamatório e osteogênico (Palhares, 1997; Palhares e Leme, 2001; Palhares et al., 2010; Nascimento et al., 2019).

Acredita-se também que a ingestão diária de doses terapêuticas de HSD, dado seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidante e anti-angiogênico, possa ampliar os efeitos benéficos de FOPCON no processo inflamatório e osteogênico, com a hipótese de uma possível redução dos episódios de surtos e conseqüentemente, amenizando a fisiopatologia da formação de osso ectópico típico, nas crises da fibrodysplasia ossificante progressiva.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou um estudo *in vivo*, de tratamento clínico acompanhado de uma análise de genes alvo da FOP, utilizando-se esfregaço de células escamosas da boca (CEB) como material biológico não invasivo para teste do efeito do tratamento no nível molecular.

O objetivo principal foi confirmar o papel dos genes alvo na fisiopatologia da FOP, além de avaliar sua participação no controle da inflamação e na prevenção da ossificação heterotópica, quando modulados em resposta ao tratamento com ácido ascórbico e propranolol (FOPCON) e ao tratamento com FOPCON e uma combinação de ácido ascórbico + Hesperidina (AA+H).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP)

A fibrodisplasia ossificante progressiva (FOP) foi inicialmente mencionada pelo médico francês Guy Patin, em 1692. Após alguns anos, foi descrita cientificamente no ano de 1736, pelo médico John Freke, do Saint Bartholomew's Hospital, em Londres, em uma carta dirigida à Royal Society of Medicine, datada de 14 de abril de 1736 e publicada em 1740 (Kaplan et al., 2008; Pignolo et al., 2021).

Em 1918, Jules Rosenstirn apresentou uma revisão extensa da literatura com 115 casos da doença (Gonçalves et al., 2005; Garcia-Pinzas et al., 2013). Em 2006, Stonham, Burton-Fanning e outros médicos relataram pacientes de diferentes gêneros, idades e até mesmo famílias inteiras com FOP e seus fenótipos (Shore et al., 2006). A doença ficou inicialmente conhecida como Miosite Ossificante Progressiva, mas foi oficialmente renomeada como Fibrodisplasia Ossificante Progressiva na década de 1970 pelo Dr. Victor McKusick, da Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins.

Apesar de sua baixa prevalência, cerca de 0,6 - 1,3 casos por milhões de indivíduos, tem agregado espaço de discussão em âmbito mundial devido à condição altamente limitante incapacitante que proporciona aos acometidos, em um curto intervalo de tempo (Dias et al., 2022). Não há predileção étnica, racial, de gênero ou geográfica para FOP, e é descrita como a doença mais catastrófica entre os transtornos de OH em humanos (Pignolo, Shore e Kaplan, 2011; Miao et al., 2012; Qi et al., 2017; Kaplan et al., 2008).

Estima-se que existam, aproximadamente, 900 casos de FOP em todo o mundo, sendo descrita uma prevalência de 0,65 por milhão na América do Norte, 0,47 por milhão na Europa ocidental e 0,27 por milhão de habitantes na América Latina. Os dados sobre a FOP no Brasil ainda são escassos, com poucos relatos semelhantes na literatura (Pignolo et al., 2021; Silva et al., 2022).

Crianças com FOP aparentam ser normais ao nascer, exceto pelas malformações congênitas dos dedões dos pés. Durante a primeira década de vida, ocorrem episódios esporádicos de inchaços dolorosos em tecidos moles (surtos), geralmente desencadeados por lesões em tecidos moles, injeções intramusculares, infecções virais, alongamentos musculares, quedas ou fadiga (Pignolo et al., 2011).

Os surtos são geralmente esporádicos e imprevisíveis, transformando músculos, tendões, ligamentos, fâscias e aponeuroses em osso heterotópico, pela inflamação subjacente

tornando o movimento inviável devido a calcificação dos músculos e anquilose de todas as articulações (Dzukou et al., 2005).

Após surtos repetidos em diferentes áreas, ocorre a ossificação progressiva e cumulativa dos tecidos moles, gerando efeitos debilitantes permanentes na FOP com risco aumentado envolvendo os quadris, punhos e joelhos somados com a idade, sendo a mandíbula tipicamente uma das últimas áreas criticamente envolvidas (Kaliya-Perumal, Carney e Ingham, 2020).

Alguns pacientes podem apresentar limitação da abertura da boca por encurtamento do esternocleidomastóideo e da musculatura próxima da articulação têmporo-mandibular, gerando dificuldades na fala, deglutição e alimentação, resultando em desnutrição e redução gradual de peso, perda da acuidade auditiva por calcificações e fusões de ligamentos, tendões e ossos do ouvido médio (Bridges et al., 1994; Connor, Evans, 1982; Delai et al., 2004; Kaplan et al., 2011; Pignolo et al., 2011; Paim et al., 2003; Freire et al., 1995).

Os efeitos debilitantes da FOP começam a se tornar fatais quando ocorre o envolvimento dos músculos intercostais, articulações costovertebrais e tecido mole para vertebral torácico, resultando na síndrome da insuficiência torácica. Os pacientes acabam indo a óbito devido às complicações cardiorrespiratórias, como pneumonias ou insuficiência cardíaca direita, com expectativa média de vida, a cerca de 40 anos (De Brasi et al., 2021).

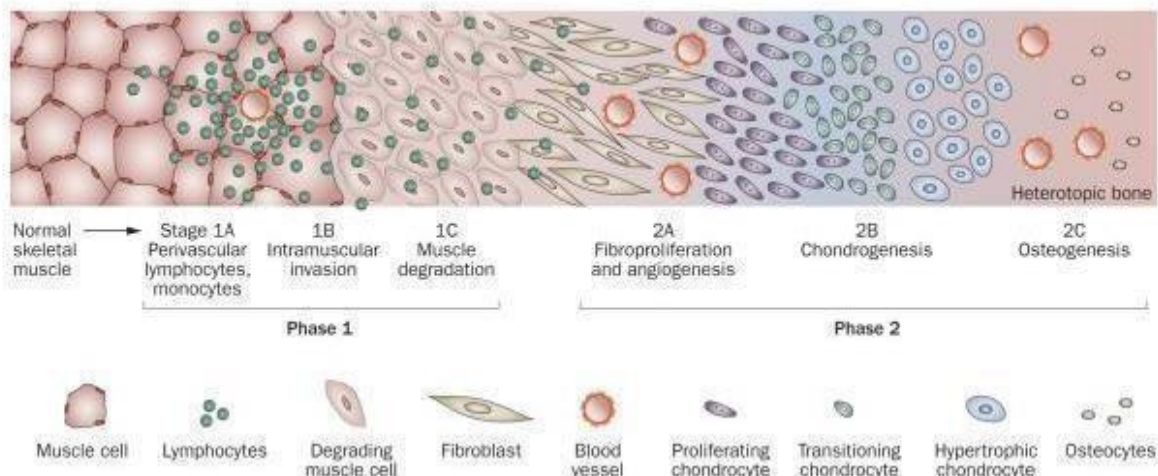
## **2.2 Histologia e Fisiopatologia da FOP**

Uma análise histológica dos estágios de formação de lesões de FOP revelou que uma fase de destruição tecidual antecede uma fase de proliferação do tecido. Na primeira fase, ocorre a formação de lesões na FOP envolvendo inflamação e destruição de tecidos conjuntivos afetados, caracterizado por intenso infiltrado mononuclear e perivascular envolvendo macrófagos, linfócitos e mastócitos. A segunda fase, por sua vez, apresenta substituição de desenvolvimento de tecido novo (Hino et al., 2015; Shore e Kaplan, 2010).

A formação de lesões na FOP envolve inflamação e destruição de tecidos conjuntivos (fase 1) seguida por uma fase de substituição de desenvolvimento de novo tecido (fase 2). A evidência histológica inicial de indução de lesão é a presença de linfócitos perivascularres abundantes (estágio 1A) em tecido conjuntivo, como músculo esquelético. Os linfócitos se expandem para o tecido (estágio 1B) e a perda da estrutura do tecido conjuntivo segue (estágio 1C). À medida que o tecido é degradado, ele é rapidamente substituído por células fibroproliferativas (estágio 2A). Angiogênese e vascularização ocorrem (estágio 2B), seguidas

por condrogênese e osteogênese (estágio 2C) e a formação de osso heterotópico.

Figura 1 – Representação esquemática histológica dos estágios de ossificação heterotópica endocondral na FOP, dividida em 2 fases principais: 1) inflamação com destruição de tecidos conectivos, e 2) formação óssea.



Fonte: Adaptado de Shore e Kaplan, (2010).

A fisiopatologia da doença está relacionada às mutações genéticas específicas que afetam a regulação da formação óssea. Em 2006, após muitos anos de estudos, a equipe do Dr. Frederick Kaplan (Escola de Medicina da Universidade da Pensilvânia) identificou a base molecular da FOP e mapeou o gene causador da doença, chamado de *ACVR1*, que está localizado no cromossomo 2q23–24, gene que codifica o receptor de ativina A tipo I, também conhecido como ALK2 (activin like kinase 2). Devido a mutação do gene, ocorre uma desregularização da produção de Proteína Morfogenética Óssea - (BMP), (do inglês, bone morphogenetic protein), onde existe a calcificação dos tecidos conectivos (Shore e Kaplan et al., 2010).

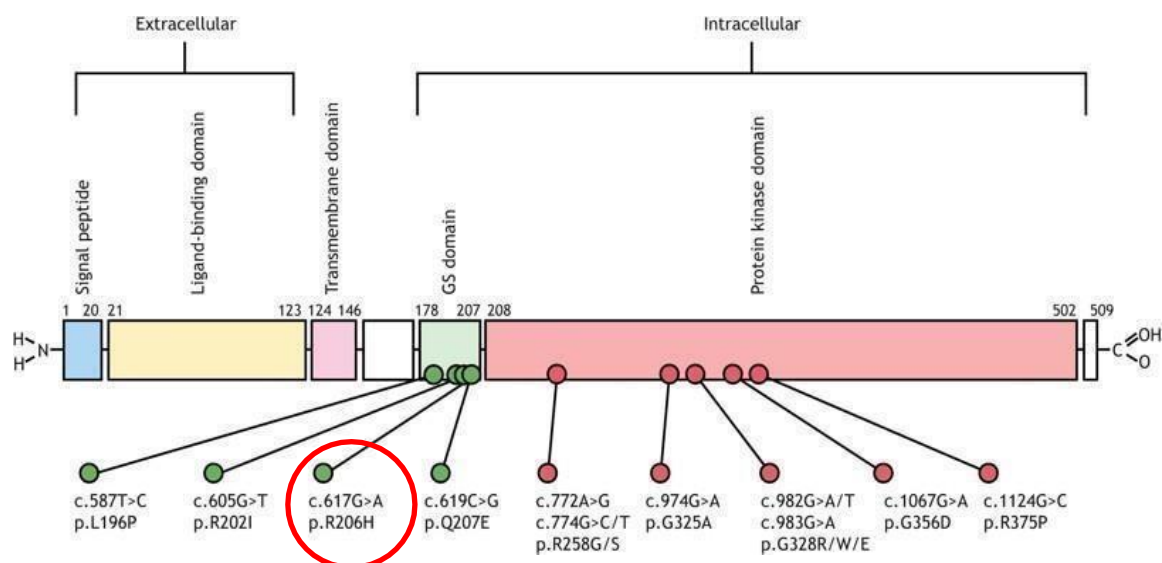
No gene mutado, tanto nos casos hereditários como nos esporádicos, observa-se, na maioria dos casos, a idêntica substituição de nucleotídeo único heterozigótico (c.617G>A – guanina por adenina na posição 617) que altera o aminoácido arginina para histidina no códon 206 (R206H), no domínio intracelular de glicina-serina (GS) (Shore et al., 2006), podendo ocorrer variações adicionais dentre dessas sequências.

O gene *ACVR1* mutado (R206H) provoca alterações na configuração estrutural da proteína *ACVR1*, que permite a ativação desregulada da via de sinalização BMP/SMAD, desencadeando processos de diferenciação osteogênica em tempo e local inadequados (Hino et al., 2015; Valer et al., 2019).

Modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram a ativação do receptor *ACVRI* mutado pela alteração do pH decorrente de hipoxia tecidual (Olmsted-Davis et al., 2007; Wang et al., 2016).

Até o momento, os pacientes relatados apresentaram mutações heterozigóticas no gene que codifica a ativina A tipo I (*ACVRI*), sendo ele responsável por codificar o receptor de proteína BMP (proteína morfogenética óssea) tipo 1, tornando-o hiperativo e desregulando a sinalização de sua via (Kaliya-Perumal, Carney e Ingham, 2020).

Figura 2 – Representação esquemática atualizada do ACVR humano, indicando domínios e localizações de mutações do gene *ACVRI/ALK2*. GS, glicina-serina.



Fonte: Adaptado de Kaliya-Perumal, Carney e Ingham(2020).

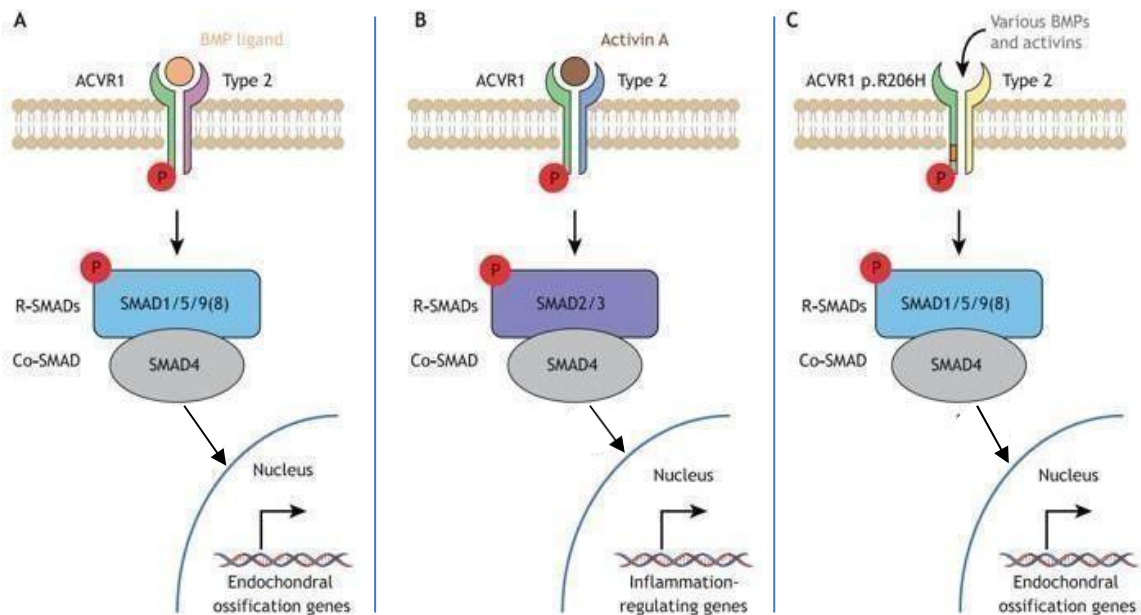
O receptor BMP tipo I faz parte da via de sinalização BMP/SMAD, que é essencial para a regulação do desenvolvimento ósseo. As proteínas SMAD recebem sinais de fatores que regulam o crescimento e promovem a diferenciação celular, sendo ativadas quando os receptores de membrana (*BMP* ou *TGF-beta*) se conectam aos seus ligantes (Trumpp et al., 2023).

As proteínas SMAD são transportadas para o núcleo das células, onde regulam a expressão de genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento celular. A ativação anormal dessa via leva a uma cascata de eventos moleculares que resultam na diferenciação e proliferação excessiva de células precursoras de osteoblastos (células que produzem osso) (Elamin, Ibrahim e Omer, 2022).

A sinalização BMP. (A) BMPs se ligam a complexos de receptores BMP de serina/treonina quinase tipo I e tipo II, como *ACVRI*, na superfície celular para ativar a transdução de sinal intracelular via R-SMADs SMAD1/5/9. SMAD1/5/9 fosforilado forma um complexo com o mediador SMAD4 e se transloca para o núcleo, onde regula a transcrição que impulsiona a ossificação endocondral.

(B) Ao se ligar à activina A, complexos de receptores BMP tipo I e tipo II ativam a transdução de sinal intracelular via SMAD2/3, que ativa um programa de transcrição que regula a inflamação. (C) *ACVRI* carregando uma mutação FOP (mais frequentemente a substituição R206H) no domínio glicina-serina intracelular produz melhor resposta a vários ligantes BMP iniciando a sinalização via SMAD1/5/9, mas também responde a vários ligantes activina, favorecendo assim a ossificação endocondral ao desencadear um programa de expressão gênica osteogênica. BMP, proteína morfogenética óssea; Co-SMAD, SMAD parceiro comum; P, fosforilação; R-SMAD, SMAD regulado por receptor (Figura 3) (Kaliya-Perumal, Carney e Ingham, 2020).

Figura 3 – Modelo esquemático de sinalização BMP na Fibrodissiplasia Ossificante Progressiva.



Fonte: Kaliya-Perumal, Carney e Ingham(2020), modificado.

### 2.3 Quadro clínico e diagnóstico da FOP

A apresentação clínica da FOP clássica é caracterizada pela combinação de anomalias congênitas nos pés e pelo desenvolvimento progressivo de ossificações, devendo ser considerada em indivíduos que apresentem os seguintes achados clínicos e radiográficos: deformidade congênita do hálux valgo ou outras malformações do hálux, frequentemente bilaterais; ossificação heterotópica progressiva, manifestando-se como uma massa palpável, que pode surgir espontaneamente ou em resposta ao trauma de tecido mole; além de inchaço doloroso e recorrente do tecido mole (surto), ocorrendo na forma de nódulos no couro cabeludo durante a infância (Doğan et al., 2023; Kaplan et al., 2012; Pignolo et al., 2013).

Os pacientes com o fenótipo clássico da FOP, que abrangem cerca de 92% dos casos, possuem a mutação canônica do gene *ACVR1/ALK2* c.617G>A (p.R206H), apresentam tanto malformações congênitas típicas do hálux quanto à OH progressiva (De Brasil et al., 2021). Relatórios recentes documentaram OH de início tardio e ausência de malformações



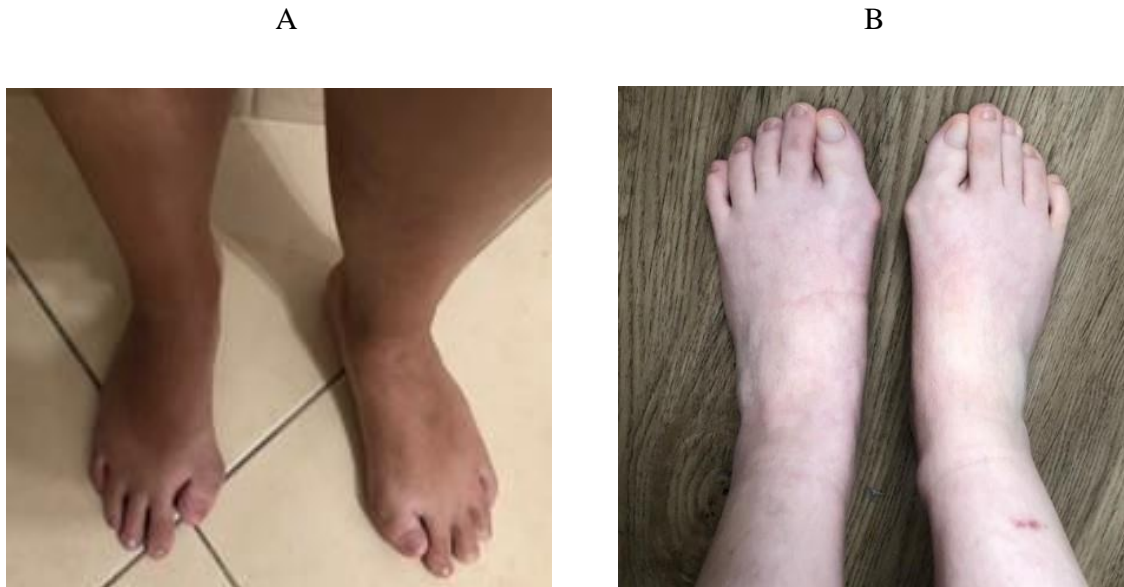
características do dedão do pé entre pacientes com mutações atípicas, que são, portanto, categorizados como variantes da FOP (Kaliya-Perumal, Carney e Ingham, 2020).

No grupo variante FOP, há variação de uma ou ambas as características principais da FOP (hálux valgo e OH), e alguns pacientes com FOP, podem apresentar uma ou mais características atípicas, além das clássicas, e são categorizados como FOP-Plus. Esses sinais atípicos incluem osteocondromas tibiais, malformações espinhais e colo femoral largo, malformações do polegar, comprometimento cognitivo, perda auditiva condutiva, risco aumentado de nefrolitíase relacionada à hipercalciúria conforme a idade, afinamento difuso do couro cabeludo, glaucoma entre outras (Pignolo, Shore e Kaplan, 2011).

A FOP é uma doença órfã, muitas vezes confundida com outras patologias. Quando acompanhada de diagnóstico tardio ou manejo terapêutico inadequado, favorece a evolução precoce do quadro clínico para a cadeira de rodas no final da segunda década de vida ou restrito ao leito devido a osteogênese. A identificação dos sinais congênitos episódicos e correlação com a FOP é de extrema importância, sendo suficiente para um diagnóstico funcional (Pignolo, Shore e Kaplan, 2011; Kaplan et al., 2008).

É necessário um alto grau de suspeita para estabelecer o diagnóstico com base apenas na apresentação clínica. O diagnóstico tardio ou incorreto, pode permitir a realização desnecessária de exames inapropriados, como cirurgias, biópsias e injeções intramusculares que podem causar edemas e massas dolorosas que aparecem espontaneamente após o trauma local (Kitterman et al., 2005; Paim et al., 2003; Delai et al., 2005). Embora as investigações bioquímicas e radiológicas possam fornecer informações úteis sobre o processo da doença, qualquer tipo de procedimento invasivo é contraindicado, pois induz inflamação local e, eventualmente, OH (Kaplan, Chakkalakal e Shore, 2012).

Figura 4 - Hallux Valgus. Sinal patognomônico da FOP: (A) criança e (B) adulto.



Fonte: arquivo pessoal (2021; 2022).

Em um estudo de Harrison et al. (2005), dos 15 pacientes participantes, todos apresentavam hálux valgo (grande dedo do pé), como malformação determinante da FOP. Infelizmente, uma errônea interpretação do hálux valgo pode levar profissionais incautos a tentarem corrigir uma suposta deformidade juvenil desse dedo valgo, exacerbando a ossificação heterotópica, em decorrência do trauma (Cremin, Connor e Beighton, 1982; Cohen et al., 1993).

Figura 5 – Ossificação heterotópica na região dorsal, proximal.

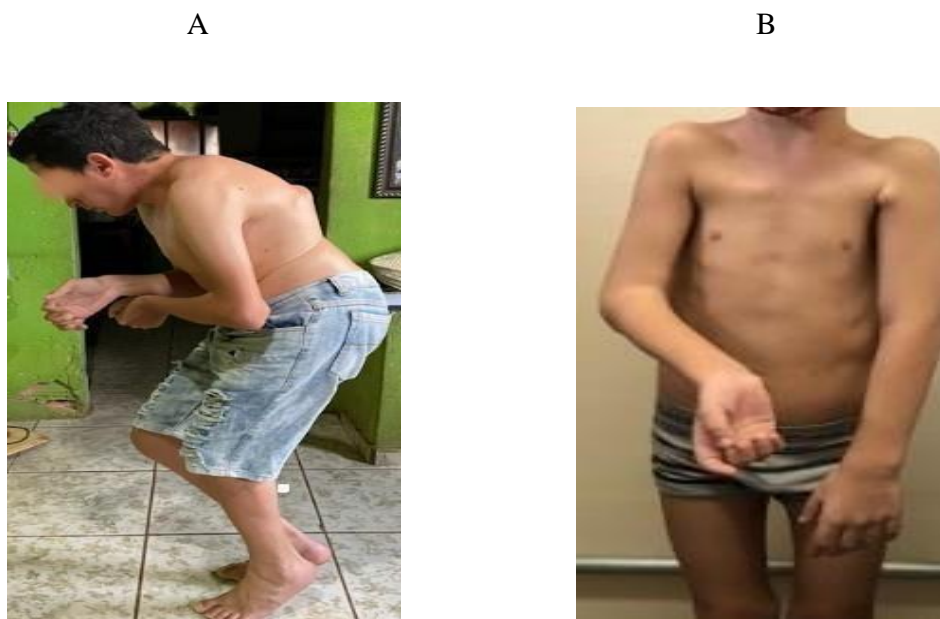


Fonte: arquivo pessoal (2022).

As primeiras formações de osso ectópico geralmente acontecem durante a primeira década de vida, marcadas por episódios agudos ou crises chamadas de "surtos". A ocorrência e a frequência dos surtos são imprevisíveis, variando de crises repetidas até períodos longos de latência (Bauer et al., 2018). A gravidade e o tamanho das agudizações podem variar em alguns casos, sendo possível que ocorra uma diminuição espontânea dessas manifestações (Delai et al., 2004; Kaplan et al., 2010).

Os episódios de ossificação heterotópica, seguem com um padrão anatômico específico, sendo vistos pela primeira vez na região dorsal, axial, regiões cranianas e proximais do corpo, incluindo cifoescoliose ou lordose torácica (Pignolo, Shore e Kaplan, 2011).

Figura 6 – Padrão limitante anatômico de progressão das ossificações heterotópicas.



Fonte: arquivo pessoal (2021; 2022).

Para indivíduos acometidos pela FOP, trata-se de uma metamorfose dolorosa, com imobilidade progressiva, representando um obstáculo à sua liberdade de movimentos ao longo da vida. Como resultado, a FOP acarreta consequências físicas, psicológicas e sociais profundamente negativas para o paciente (Kaplan et al., 2008).

Ainda não esclarecido na literatura, a experiência clínica de Palhares e colaboradores permite afirmar que frequentemente os surtos podem, também, ser desencadeados por estágios agudos de causa emocional (Palhares et al., 2019). Para a confirmação do diagnóstico, a identificação de uma variante patogênica heterozigótica no gene *ACVRI* é realizada por meio

de testes genéticos moleculares. Essa abordagem molecular é essencial para estabelecer o diagnóstico definitivo da FOP, permitindo uma compreensão mais precisa e direta da base genética da doença (Akeson e Savarirayan, 2020).

#### **2.4 Abordagem terapêutica da FOP**

Até o momento, não existe cura para a FOP. Os tratamentos disponíveis são principalmente direcionados ao controle dos sintomas, e dor, visando minimizar a formação de osso heterotópico, porém sem reverter a condição ou impedir sua progressão (Kaplan, Kaplan e Shore, 2012).

Para o manejo dos surtos da FOP, são utilizados tratamentos para controle dos sintomas da doença. Esses tratamentos foram agrupados no guia: “The medical management of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: current treatment considerations”. Nesse guia estão todos os tratamentos e estudos que mostram como deve ser realizado o manejo dos pacientes com FOP utilizando: corticoides, inibidores de mastócitos, anti-inflamatórios não esteroides, inibidores de ciclooxigenase 2, bifosfonatos, relaxantes musculares, transplantes de medula óssea, Rosiglitazone, agonistas de receptores de ácido retinóico e tratamentos comumente utilizados para dor, incluindo analgésicos narcóticos (Kaplan et al., 2011).

O tratamento da FOP envolve uma abordagem multidisciplinar que se concentra em controlar a inflamação aguda, preservar a mobilidade e a qualidade de vida dos pacientes. Intervenções essenciais incluem evitar procedimentos cirúrgicos desnecessários, com a prescrição de corticosteroides profiláticos em altas doses (Smilde et al., 2022).

Nas primeiras 24 horas é indicado o uso da prednisona, com dose recomendada de 2 mg/kg/dia, para crises agudas, com dose máxima de 100 mg, administrada em dose única diária por 4 dias, seguida por mais 10 dias de tratamento contínuo, enquanto persistirem os sintomas. Além disso, a prednisona, na dose de 1 a 2 mg/kg por via oral, uma vez ao dia durante 3 a 4 dias, é frequentemente empregada na prevenção de crises após lesões graves de tecidos moles ou procedimentos odontológicos e cirúrgicos (Pignolo et al., 2011; De Brasi et al., 2021). Outros medicamentos têm sido investigados como opções terapêuticas, incluindo anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), inibidores de *COX-2*, inibidores de leucotrienos, como montelucaste de sódio e estabilizadores de mastócitos.

Esses medicamentos podem desempenhar um papel importante no controle da inflamação e no alívio dos sintomas em pacientes com FOP, com o objetivo de melhorar sua qualidade de vida (Gencer-Atalay et al., 2019). Em situações em que os corticosteroides não são

indicados, ou quando seu uso é descontinuado, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ou inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (*COX-2*) podem ser empregados no tratamento das crises de FOP. No entanto, é importante observar que não há evidências de que o tratamento crônico com esses medicamentos previna surtos de FOP (Gencer-Atalay et al., 2019; De Brasi et al., 2021).

No entanto, eles são frequentemente utilizados para aliviar a dor e a inflamação durante os episódios agudos da doença. Vale ressaltar que, embora existam tratamentos adicionais que têm sido explorados de forma experimental e anedótica no manejo sintomático das crises de FOP, ainda há escassez de publicações e dados clínicos concretos sobre a eficácia dessas abordagens (De Brasi et al., 2021).

Além dos tratamentos descritos no guia, há, ainda, o manejo da FOP descrito por Palhares colaboradores, utilizando ácido ascórbico que demonstrou melhora dos sintomas, redução dos surtos, e estabilização transitória da crise, quando o ácido ascórbico foi utilizado com etidronato dissódico (Palhares, 1997; Palhares e Leme, 2001; Palhares et al., 2010; Nascimento et al., 2018).

Um estudo conduzido em pacientes com FOP apresentou resultados notáveis na prevenção de surtos da doença, a partir da combinação de 14 mg de propranolol e 250 mg de ácido ascórbico (vitamina C) (FOPCON), administrados por via oral, três vezes ao dia. Durante o tratamento, mesmo após sofrerem quedas acidentais com lesões documentadas, nenhum deles desenvolveu surtos agudos ou sequelas como resultado desses incidentes, indicando que a combinação de ácido ascórbico e propranolol pode ser eficaz na profilaxia de surtos de FOP (Palhares, 1997; Palhares et al., 2019).

O tratamento com FOPCON tem sido proposto por suas capacidades anti oxidativa e anti-inflamatória do ácido ascórbico (AA), bem como sua atividade na síntese de colágenos, associados ao potencial efeito antiangiogênico do propranolol (PP) (Palhares et al., 2019). Embora muitos estudos sobre FOP tenham sido realizados, o conhecimento sobre a história longitudinal da FOP ainda é desconhecida e estudos clínicos precisam ser realizados para que se entenda os mecanismos envolvidos nos surtos da doença, e em que momento cada tratamento é mais eficaz (Kaplan et al., 2017).

Estudos de biologia molecular, realizados pelo mesmo grupo, têm aprofundado o entendimento sobre a expressão de genes envolvidos, de forma direta e indireta, nos processos de inflamação, fibrose e ossificação heterotópica, bem como o comportamento dos mesmos mediante o uso de FOPCON (Balaniuc et al., 2019; Nascimento, 2014; Nascimento et al., 2017; 2021; Nascimento, 2018). Até o presente, nenhum outro grupo de pesquisa explorou o efeito

desses compostos em portadores de FOP, antes e depois de tratamento *in vivo*, controlado e contínuo.

## **2.5 Flavonóides e potencial efeito antioxidante, antiinflamatório e angiogênico**

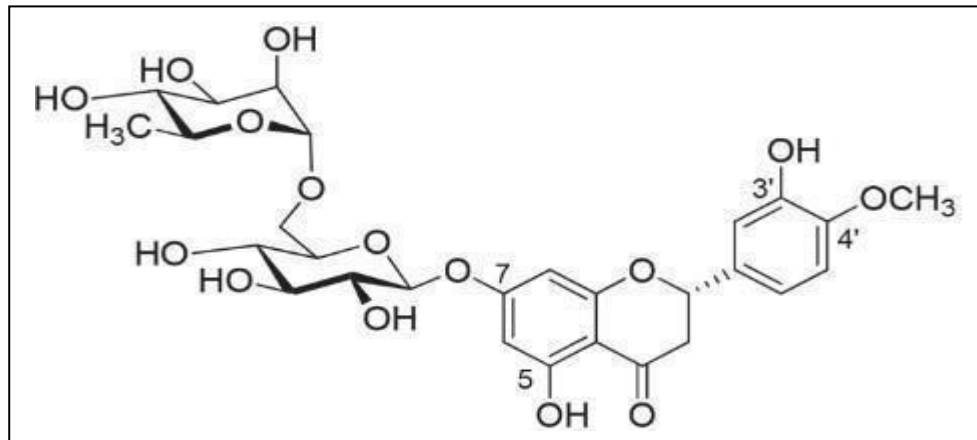
Os flavonoides são fitoquímicos naturais com efeitos terapêuticos, atuando na prevenção de diversas doenças, exercendo poucos efeitos adversos e têm baixa ou nenhuma citotoxicidade para células saudáveis e normais do ser humano (Harborne e Williams, 2000; Pietta, 2000).

Embora não sejam completamente compreendidos pela farmacologia moderna, os flavonoides possuem diversas e significativas propriedades terapêuticas relatadas na literatura, e pertencem a um grupo de compostos fenólicos encontrados em diversas plantas, estudados tanto por sua forma livre quanto aos glicosídeos, e suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, hipolipidêmica, antiviral, anti tumoral, entre outras (Garg et al., 2001, Benavante-Garcia e Castillo, 2008).

Dentre os flavonóides, destacamos a Hesperidina (HSD) reconhecida por suas atividades biológicas e benefícios associados, sendo um glicosídeo, da subclasse das flavanonas (encontrada em frutas cítricas como laranjas, limões ou toranjas), e possui potencial anti-inflamatório, antiviral, hipolipidêmica e antioxidante, considerados essenciais para a saúde humana) (Maldonato et al., 2020, Dourado, 2009).

A HSD foi isolada pela primeira vez em 1828, pelo químico francês Lebreton, através da camada interna branca de cascas de frutas cítricas. Sua forma aglicona é chamada Hesperitina (HST), e devido às suas atividades biológicas foi chamada de bioflavanóide (Garg et al., 2001).

Figura 7. Estrutura molecular da Hesperidina



Fonte: Adaptado de Victor et. al., 2020.

Estudos anteriores demonstram que a HSD na sua forma aglicona Hesperitina (HST) é capaz de atravessar as barreiras físicas do nosso organismo e atuar no cérebro principalmente contra o estresse oxidativo (Hwang, Shih e Chin, 2012). Esses dois flavonoides de espécies cítricas possuem várias propriedades biológicas semelhantes. Seus efeitos benéficos têm sido referidos na função cutânea, como cicatrização de feridas, proteção UV, antimicrobiano e clareamento da pele (Roohbakhsh et al., 2014).

Pesquisas têm relacionado flavonóides a promissores fármacos naturais, com a redução dos lipídeos sanguíneos, capacidade de modificar a biossíntese de eicosanóides (resposta anti-prostanóide e anti-inflamatória), proteger colesterol-LDL da oxidação (inibindo a formação de placa aterosclerótica) e proteger colesterol-LDL da oxidação, inibindo formação de placas de ateroma (Oliveira et al., 2010).

A maioria dos polifenóis apresenta baixa biodisponibilidade *in vivo*, o que limita sua aplicação na administração oral de medicamentos, sendo que esta, pode estar relacionada à baixa solubilidade em água (Kaur e Kaur, 2014). A excreção pode se dar através da bile ou transporte pela corrente sanguínea até os tecidos periféricos, onde atuam na prevenção do estresse oxidativo e de doenças crônicas (Hollman e Catan, 1997; Tapiero et al., 2002; Liu, 2004; Corocho e Ferreira, 2012).

O tratamento com HSD atenuou as alterações neuro químicas induzidas por estreptozotocina (STZ) em ratos diabéticos, evidenciado pelo aumento dos níveis de monoaminas no cérebro, nomeadamente, noradrenalina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT). Todos estes efeitos do HSD foram semelhantes aos observados como antidepressivo estabelecido por suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, pelo aumento da neurogênese e pelas mudanças nos níveis de monoaminas no cérebro (El- Marasy

et al., 2014), gerando benefício direto e indireto ao portador de FOP.

A angiogênese é uma condição de formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura pré-existente (Ferrara, 2001; Ferrara, Gerber e Lecouter, 2003). A angiogênese depende da proliferação de células endoteliais, que têm a característica de fazer o revestimento dos vasos sanguíneos. Existe a angiogênese normal ou fisiológica, por exemplo, quando há necessidade de reparar um tecido lesado por trauma, como na embriogênese, entre outros.

Porém, certas condições oriundas de doenças, como acontece, nas neoplasias, artrite reumatoide, doenças vasculares, etc., trata-se de angiogênese patológica (Folkman, 2004; Folkman e Klagsbrun, 1987; Ribatti, 2005; Rao; Lee; Ge, 2015). A angiogênese tem como fator pró-angiogênico, o Fator de Crescimento endotelial vascular (VEGF) (Senger et al., 1983). A VEGF está entre as moléculas que regulam a angiogênese tumoral (Ferrara, 2001).

Evidências recentes sugerem o fator de crescimento endotelial vascular VEGF como o principal fator de angiogênese tumoral, promovendo o crescimento tumoral, invasão e metástase (Detmar, 2000; Rao, Lee e Ge, 2015).

O VEGF é um forte mitógeno angiogênico e desempenha papel fundamental na angiogênese sob uma variedade de condições fisiopatológicas. A atividade angiogênica *in vivo* do VEGF secretado pode ser regulada por inibidores extracelulares (Inoki et al., 2002). Esta atividade estaria sendo regulada principalmente pela expressão gênica das isoformas do VEGF e seus receptores nos tecidos locais. No entanto, pesquisas revelaram que o VEGF é expresso em vários tecidos, incluindo tecidos hipovasculares e avasculares, como cartilagem na placa de crescimento (Gerber et al., 1999; Carlevaro et al., 2000; Nicolas et al., 2019).

Fisiologicamente, a cartilagem articular é um tecido avascular típico e resistente à angiogênese. Portanto, essas observações sugerem que em alguns tecidos, como a cartilagem, o VEGF pode existir como uma forma inativa na matriz extracelular (MEC) por meio da interação dinâmica com algumas moléculas, como componentes da própria MEC.

Corroborando, pesquisas demonstraram que o Fator Plaquetário 4 (PF-4), que atua como mediador e regulador do processo inflamatório, e as formas solúveis dos receptores de VEGF, demonstraram se ligar ao VEGF 121 e 165 atenuando a proliferação de células endoteliais e a angiogênese pelo VEGF (Maione et al., 1990; Gengrinovitch et al., 1995; Goldman et al., 1998).

Há evidências relevantes que sugerem que a angiogênese e a inflamação crônica são dependentes. Estudos recentes começaram a revelar a natureza dessa ligação, que envolve tanto o aumento da infiltração e proliferação celular quanto os papéis sobrepostos de fatores reguladores de crescimento e citocinas (Jackson et al., 1997).

A L-arginina, um precursor do óxido nítrico (ON), tem demonstrado forte estimulante



da angiogênese. O ON, por sua vez, é produzido no tecido granulomatoso pelo endotélio e macrófagos pela ON-sintaxe induzível (Appleton; Tomlinson; Willoughy, 1996), sendo um importante mediador de destruição tecidual e edema na inflamação.

Já o VEGF estimula a proliferação de células endoteliais de forma ON-dependente, bem como a permeabilidade vascular *in vivo* (Morbidelli et al., 1996).

Além destes, outros mediadores inflamatórios também podem induzir a expressão de VEGF como prostaglandina-2 (PGE2), Interleucina do tipo 6 (IL-6) e Interleucina do tipo 1 (IL-1) mostraram aumentar os níveis de VEGF mRNA (Ben-Av et al., 1995; Cohen et al., 1996; Mendonça, 2019). O VEGF também parece ser regulado pela concentração de oxigênio, com hipóxia induzindo sua expressão (Shweiki et al., 1995; Nicolas et al., 2019). Assim, durante o crescimento do tecido inflamatório, as condições hipóxicas, aliadas a altas concentrações de mediadores inflamatórios podem resultar no aumento da produção de VEGF (Jackson et al., 1997; Nicolas et al., 2019).

Portanto, os antagonistas do VEGF podem ser tão promissores contra a inflamação quanto contra a angiogênese, visto que muitas pesquisas vêm estudando essa vertente como estratégia anti tumoral e contra doenças como granuloma piogênico (inflamação granulomatosa esponjosa) (Hu, Fan, 1995). Vários estudos já demonstraram que anticorpos contra TNF- $\alpha$  e IL, como também, inibição de produção de citocinas demonstram uma resposta específica na redução da angiogênese (Spisni et al., 1992; Auerbach; Auerbach, 1994; Folkman et al., 2004; Liu et al., 2020; Ribatti, 2005).

De modo geral, essas flavanonas têm sido estudadas como uma estratégia para o tratamento de doenças ósseas, por ter potencial terapêutico para controle da progressão de doenças metabólicas, autoimunes ou inflamatória.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos moleculares em pacientes portadores de FOP mediante tratamento com ácido ascórbico, propranolol e Hesperidina.

#### 3.2 Objetivos específicos

Para o alcance do objetivo geral, são elencados os seguintes objetivos específicos:

- a. Utilizar primers de oligonucleotídeos específicos para o estudo da expressão de mRNA de genes alvo codificadores para marcadores de inflamação;
- b. Obter RNA total de CEB de portadores de FOP e voluntário controle, antes e depois do tratamento com FOPCON + Hesperidina;
- c. Analisar comparativamente a expressão relativa dos genes alvo em CEB de indivíduos portadores de FOP e indivíduos saudáveis;
- d. Analisar comparativamente a expressão basal dos genes alvo de portadores de FOP tratados e não tratados com FOPCON e FOPCON + Hesperidina, com indivíduos saudáveis/controle;
- e. Analisar comparativamente a expressão dos genes alvo de portadores de FOP em PBMC e CEB.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de uma pesquisa clínica e experimental desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Pediátricas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), situado no prédio da Faculdade de Medicina (FAMED). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no ano de 2021 sob o nº 4.763.072 do Parecer de Aprovação da UFMS mediante à submissão na Plataforma Brasil; os participantes foram arrolados após esclarecimentos e assinatura do termo de consentimento (TCLE/TALE). (Anexo A e B).

### **4.2 Participantes da pesquisa**

O grupo de pesquisa, reconhecido como referência na pesquisa sobre FOP no Brasil, é frequentemente contactado por profissionais de saúde de Campo Grande Mato Grosso do Sul, ou de outras cidades/Estados, com o intuito de encaminhar pacientes com sinais clínicos da doença. A procura também parte do próprio paciente portador de FOP ou seus familiares, também a partir da indicação do grupo por outros pacientes, e, ainda pelas entrevistas e publicações disponíveis nas Mídias tradicionais e sociais. Sendo assim, os indivíduos portadores de FOP arrolados na pesquisa são residentes nas diferentes regiões do Brasil.

A proposta do grupo de pesquisadores foi apresentada a todos os participantes voluntários saudáveis (n=5), portadores tratados com FOPCON (n=8), portadores tratados com FOPCON+H (n=7), total de 20 participantes. Constatada a viabilidade de participação no estudo, a partir dos critérios de inclusão e nível de interesse do paciente e seu familiar, foi feito o convite para participação na pesquisa.

Todas as coletas foram realizadas após apresentação, assinatura e aceite do Termo de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE ou TALE).

O Grupo 1-Grupo controle, foi formado por indivíduos voluntários saudáveis.

Grupo 2-Indivíduos portadores de FOP não tratados.

Grupo 3-Indivíduos portadores de FOP, tratados por seis meses com três doses diárias da composição ácido ascórbico (AA) combinado com propranolol (PP), designado FOPCON.

Grupo 4-Indivíduos portadores de FOP, tratados por seis meses com duas doses diárias da composição ácido ascórbico (AA) combinado com propranolol (PP) (FOPCON), e uma dose diária de ácido ascórbico (AA) + Hesperidina (H), administrada entre as doses de FOPCON, conforme descrito no item 4.5.2

### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos na pesquisa os indivíduos com sinais clínicos de FOP clássica, independentemente do sexo e idade, desde que apresentassem termo de consentimento assinado. Para o grupo controle foram selecionados por amostragem não probabilística, indivíduos sem comorbidades e com idade semelhante aos indivíduos com FOP selecionados no estudo.

Foram excluídos os indivíduos com sinais clínicos sugestivos de formas atípicas da FOP, e os que apresentaram quaisquer vínculos a outras propostas de pesquisa experimental.

### **4.4 Procedimentos de coleta**

Foram realizadas duas coletas de raspado de Células Escamosas da Boca (CEB), dos participantes (a primeira antes do tratamento e a segunda após os tratamentos). Em cada coleta, foram obtidas duas amostras de CEB, sendo realizadas uma do lado direito e uma do lado esquerdo da parte interna da boca.

No grupo 1 (controles), e grupo 2 (portadores de FOP não tratados), a coleta foi realizada uma única vez. Em seguida iniciou-se o tratamento dos grupos com FOPCON (grupo 3); e FOPCON + ácido ascórbico combinado com Hesperidina (grupo 4). Os grupos tratados foram avaliados clinicamente e as amostras de tecido da mucosa bucal foram coletadas, com conseqüente o encerramento do estudo em questão, seguindo com o tratamento permanente do FOPCON.

Os participantes da pesquisa, com residência localizada na cidade de Campo Grande, MS, foram recebidos nas dependências da FAMED, onde foram submetidos à avaliação clínica e, em seguida, à coleta de raspado de mucosa oral. Diante de inviabilidade física ou geográfica de deslocamento do paciente e/ou familiares, os pesquisadores foram até o paciente para realizar o exame físico e coleta de amostras. As amostras subsequentes com seis meses do início do tratamento, foram coletadas no domicílio do participante, caso necessário, ou foram coletadas na cidade de origem do paciente, por equipe local especializada, mediante contato e orientações prévias do pesquisador principal.

#### 4.4.1 Coleta de raspado de mucosa oral

Para obtenção de RNA total, as amostras de CEB foram coletadas por meio de raspagem, na face interna da boca, com auxílio de espátulas abaixador de língua (THEOTO® – 14 cm/1,4, cm/0,5 mm; 11 cm/0,8, cm/1,0 mm) ambas com formato convencional liso, esterilizado, para uso pediátrico. Resumidamente, o muco epitelial foi obtido por raspagem com leve pressão manual, de aproximadamente cinco centímetros de comprimento, no sentido longitudinal, horizontal pósterio-interior da parte interna da boca, tanto à direita como lado esquerdo, em duas coletas separadas.

O muco das células epiteliais foi dispensado em microcubos de centrífuga tipo eppendorf e dissolvido em 500 µl de solução estabilizadora de ácidos nucleicos RNA later® (Ambion™). O microtubo com a amostra foi suavemente agitado antes do armazenamento a -20°C e mantido congelado até o processamento da extração do RNA.

Os critérios de armazenamento, foram seguidos conforme protocolo estabelecido de bio repositório da UFMS (Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017), disponível no link: <(https://cep.ufms.br/files/2021/01/2017-Resolu%C3%A7%C3%A3o-UFMS-240-Biobancose-Biorreposit%C3%B3rios-UFMS-12.pdf)>.

### 4.5 Tratamentos dos grupos (modelo *in vivo*)

#### 4.5.1 Tratamento com FOPCON (Grupo3)

Após a avaliação médica do Grupo 3, foram fornecidas gratuitamente a cada paciente, doses individualizadas de FOPCON (ácido ascórbico combinado com propranolol). A princípio, foi indicado o consumo de uma cápsula a cada 08 horas. Quando necessário, nos casos de pacientes com limitação de abertura da boca, foi feito o fracionamento do conteúdo de uma cápsula, em maior número de cápsulas.

#### 4.5.2 Tratamento com FOPCON +H (Grupo 4)

Da mesma forma que no grupo anterior, após a avaliação médica do grupo 4, as cápsulas foram fornecidas gratuitamente a cada paciente, doses individualizadas de FOPCON (ácido ascórbico combinado com propranolol), sendo ingeridas no período da manhã e noite, e doses individualizadas de ácido ascórbico combinado com Hesperidina (AA+H), ingeridas no horário do almoço, ou seja, uma cápsula de AA+H foi ingerida entre as doses de FOPCON, seguindo

a sequência: FOPCON/AA+H/FOPCON. Eventualmente, quando necessário foi feito o fracionamento do conteúdo de uma cápsula, em um maior número de cápsulas.

#### **4.6 Preparo dos medicamentos**

O preparo dos medicamentos ocorreu no Laboratório de Nutrição da Pediatria da UFMS, por um profissional farmacêutico participante do grupo de pesquisa. Os compostos foram pesados e triturados juntos, com as proporções indicadas para a medicação, considerando peso e idade, isto é, em dose individualizada, prescrita pelo médico coordenador da pesquisa. Em seguida, os compostos foram encapsulados por meio de encapsuladora semiautomática e armazenados em frascos com sílica, devidamente identificados e lacrados, e fornecido a cada paciente.

As informações técnicas da Hesperidina podem ser obtidas por meio da empresa Relvafarma Manipulação e Homeopatia LTDA, de Campo Grande-MS, sob registro de licença sanitária nº 68056. (ANEXO F e G).

#### **4.7 Modelo de experimento *in vivo***

##### **4.7.1 Extração do RNA total e tratamento com DNase**

Para obter RNA total, amostras de CEB armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em estoques de 500  $\mu\text{l}$  de RNA later, foram posteriormente descongeladas a  $4^{\circ}\text{C}$  e depois centrifugada a 700xg por 15 min/ $4^{\circ}\text{C}$  em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5427 R), para concentração do pellet celular. Posteriormente, o RNA total foi extraído pelo método Trizol®, de acordo com a metodologia empregada por Nascimento et al. (2021). O RNA total foi ressuspense em 100 $\mu\text{l}$  de água tratada com RNase (pirocarbonato de dietila-DEPC H<sub>2</sub>O). Aliquotas de 2  $\mu\text{l}$  foram usadas para quantificação a 260 nm em um espectrofotômetro Nano Drop™ One (Thermo Scientific™). Aliquotas de RNA total foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para armazenamento longo prazo, enquanto ~2  $\mu\text{g}$  de aliquotas de RNA total foram posteriormente tratadas com DNase (DNase I (kit TURBO DNA-free, Ambion Inc., Foster, Califórnia, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O pellet tratado com DNase de RNA total foi ressuspense em 25  $\mu\text{l}$  de DEPC H<sub>2</sub>O e as concentrações reajustadas posteriormente para transcrição reversa e uso quantitativo de PCR.

#### 4.7.2 Primers Oligonucleotídeos e genes alvo selecionados

Os Primers de oligonucleotídicos específicos, direcionados aos oito genes putativos da FOP (Tabela 1) foram previamente padronizados por Nascimento (2014) e Nascimento et al. 2021, para transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (qPCR). Os primers foram sintetizados pela empresa (Integrated DNA Technologies), recebidos liofilizados, foram posteriormente ressuspensos em SF H<sub>2</sub>O e aliqotado para armazenamento a -20°C em estoques de 100 pmol/μl. Como controle endógeno, o gene S 26 (Vincent, Marty e Fort, 1993), foi usado como alvo para normalização de qPCR.

Tabela 1. Genes alvo e primers oligonucleotídeos selecionados.

Gene	mRNA Description	Oligonucleotide primer sequences	Target (bp)
<i>ACVRI</i>	activin A receptor type 1	F<CTGCCTTCGAATAGTGCTGCCAT>R<TAAATCTCGATGGGCAATGGCTGG	100
<i>BMP4</i>	bone morphogenetic protein 4	F<CAGGAGATGGTAGTAGAGGGATGT>R<AGTCTGTGTAGTGTGTGGGTGA	140
<i>COL1</i>	collagen type I α-1 chain	F<CAAAGGAGACACTGGTGCTAAG>R<CTCCTCGCTTTCCTTCCTCTC	89
<i>COL3</i>	collagen type III α-1 chain	F<AGCTGTTGAAGGAGGATGTTCCCA>R<TTGGCATGGTTCTGGCTTCCA;	77
<i>ADRB1</i>	Adrenoceptor β-1	F<TTCTACGTGCCCTGTGCATC>R<GATCTTCTTCACCTGCTTCTGG	78
<i>ADRB2</i>	adrenoceptor β-2	F<CTGTGCGTGATCGCAGTGGAT>R<CTTATTCTTGGTCAGGCTC	78
<i>RUNX2</i>	RUNX family trans. factor 2	F<CTTGACCATAACCGTCTTCAC>R<CGAGGTCCATCTACTGTAACT	81
<i>TNF-α</i>	tumor necrosis factor α	F<CCAGGGACCTCTCTAATCA>R<GTTTGCTACAACATGGGCTAC	95
<i>S26</i>	S26 ribosomal protein RNA	F<TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAA>R<CGATTCTGACTACTTTGCTGTG	75

Legenda: **(Bp)** base pair; **(F)** forward sense (5'-3'); **(R)** reverse anti-sense (5'-3').

#### 4.7.3 Transcrição reversa (RT)

Para RNA total (tratado com DNase) foi usado para a síntese da primeira fita de DNA complementar (sscDNA) por reação de transcrição reversa (RT). Resumidamente, o RT consistiu em 6 μl (350 ng) de RNA e 10 pmol de cada primer reverso específico e oligo dT18, em volume final de 10 μl, pré-incubado a 70°C por 10 minutos e armazenado imediatamente em gelo. Em seguida, 11 μL de mistura de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) contendo 2 μL de mistura dNTP (10 mM de cada) foram adicionados, incubados a 45°C por 1 hora, em um volume final de 21 μl de reação RT. A reação foi finalizada a 4°C e utilizada imediatamente em qPCR (PCR quantitativo em tempo

real). Todos os reagentes foram da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-qPCR).

#### 4.7.4 Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

As amostras de sscDNA resultantes da RT foram utilizadas em qPCR, realizado em um QuantStudio™ 6 Flex Real- Equipamento Time PCR System, utilizando o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (Thermo Fisher Scientific, 2011). Amostras em duplicatas foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), em um volume de reação final de 25 µl.

Alíquotas de 2 µl de sscDNA RT foram pipetados em cada canaleta da placa seguido pela mistura de reação (5 µl de SYBR Green PCR Master Mix Kit; 0,15 µl {10 pmol/µl} de cada primer sense e antisense) que foram adicionados em um volume final de 8 µl ajustado com água filtrada estéril.

A placa de PCR foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As reações de qPCR ocorreram no seguinte ciclo térmico: [etapa 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [etapa 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15s, seguidos de uma curva de dissociação começando em 60°C para análise da especificidade dos fragmentos alvos amplificados (amplicons).

## 4.8 Análise estatística

A quantificação da expressão relativa dos transcritos alvo foi determinada por análise comparativa com o normalizador S26 endógeno, usando o método CT comparativo, no qual o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos ([média do CT gene alvo– média do CT controle endógeno]) gerando o  $\Delta$ CT. Posteriormente,  $\Delta$ CT foi utilizado para calcular  $\Delta\Delta$ CT ([ $\Delta$ CT amostra –  $\Delta$ CT do calibrador (amostra de referência)]). Por fim, foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ CT para chegar aos níveis relativos de expressão (fold change) de cada gene alvo (Livak e Schmittgen, 2001).

A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism 5*, e foram aplicados aos resultados o *Test t de student* não pareado e ANOVA. Os resultados foram estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ .



#### **4.9 Aspectos éticos**

Em cumprimento à resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O trabalho de campo foi iniciado somente após a aprovação do projeto, nº 4.763.072 com Parecer de Aprovação do CEP da UFMS.

Todos os participantes foram devidamente esclarecidos por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), com o qual concordaram voluntariamente em participar. Os participantes com idade entre seis anos e 18 anos incompletos, assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Anexo B), acompanhado do TCLE assinado por seu responsável.

Aos participantes, não foi oferecido nenhum benefício financeiro, entretanto, foi garantida a participação na pesquisa sem qualquer ônus, seja para aquisição da medicação, realização de exames ou deslocamento até o local da pesquisa quando solicitado pelos pesquisadores. Nos casos que houve a necessidade de enviar a medicação, a mesma foi disponibilizada via correios, sem custo para o participante.

A equipe de pesquisadores tem o compromisso de zelar pelo bem-estar e segurança dos participantes, aos quais foram assegurados o sigilo e o anonimato, bem como o acesso aos resultados da pesquisa.

## 5 RESULTADOS

Os dados biomoleculares resultantes das coletas de raspado da mucosa oral antes do tratamento com FOPCON e FOPCON + Hesperidina, foram dispostos na Tabela 2 e Figura 9, sendo correspondente aos grupos portadores FOP versus controles saudáveis.

Conforme a análise da expressão dos genes selecionados para o presente estudo, foi possível observar uma superexpressão dos genes ACVR1 ( $p < 0,0227$ ;  $1,34 \pm 0,09$ ), COL1 ( $p < 0,0191$ ;  $2,32 \pm 0,42$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,0306$ ;  $4,08 \pm 1,27$ ) no grupo de pacientes com FOP quando comparado ao grupo controle de indivíduos sem FOP (controle) (Tabela 2).

A expressão gênica do TNF $\alpha$  foi mais expressa aos genes avaliados, dada a importância da inflamação nos portadores de FOP. Além disso, nota-se a variância significativa entre o grupo controle e pessoas com FOP para os genes ACVR1 e COL1 (figura 9).

Diferente dos resultados obtidos no estudo da expressão gênica em cultivo celular de PBMC, RUNX2, ADRB1 e ADRB2 não apresentaram regulações significativamente estatísticas. De outro modo, a expressão de BMP4 sugere comportamento semelhante, sem regulações significativas em ambos os tipos de amostra (PBMC e CEB) (Nascimento et al., 2021) (tabela 3).

Assim, ao comparar os resultados da expressão gênica de CEB com as células PBMC, verificou-se que, os genes Col3, ADRB1, ADRB2 e RUNX2 tiveram diferenças não identificadas na mucosa oral. Este resultado pode ser justificado por amostras com células mononucleadas (sanguíneas), apresentarem vias de sinalização distintas, além da estabilização das células em laboratório, garantidas por condição diferente da mucosa oral.

Os resultados obtidos da extração de RNA total mostraram um rendimento dez vezes maior na extração de RNA quando comparado ao raspado com espátulas maiores (14 cm/1,4, cm/0,5 mm), em comparação ao rendimento de coleções com espátulas menores (11 cm/0,8, cm/1,0 mm), isto é,  $26,5 + 11,9 \mu\text{g}$  ( $n=9$ ) versus  $1,9 + 2,2 \mu\text{g}$  ( $n=14$ ) de rendimentos de RNA total, respectivamente. No entanto, a presente metodologia, utilizando o método Trizol, mostrou quantidades de RNA total suficientes para todos os RT Estudos -qPCR. Os dados de expressão relativa de todos os genes investigados de FOP CEB *versus* controles saudáveis de CEB são mostrados como gráficos de dispersão e em barras nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Os resultados da expressão basal de mRNA mostraram diferenças significativas nos genes ACVR1, TNF- $\alpha$  e COL1 ( $p < 0,05$ ) em CEB em FOP, quando comparados aos controles CEB. Representações adicionais de expressão gênica são mostrados na tabela 1.

As expressões dos genes Col3, ADRB1, ADRB2 e RUNX2 não apresentaram diferenças significativas, embora existam tendências de aumento de expressão dos transcritos ADRB1, ADRB2 e RUNX2 (Ex.: ADRB2, representado pela seta vermelha; tabela 2).

Na segunda etapa dos experimentos, os resultados apresentados nas Figuras 9, 10, 11, 12 e 13, das expressões basais de mRNA, confirmaram as diferenças significativas nos perfis de expressão dos genes TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e COL1 ( $p < 0,05$ ) e surpreendentemente, também para os genes ADRB2 ( $p < 0,05$ ) e RUNX2 ( $p < 0,05$ ), que antes apresentou apenas tendências de aumento, (ver figura 8; CEB FOP x Controle).

Os tratamentos dos pacientes FOP com o composto FOPCON (AA+PP) e FOPCON Hesperidina (AA+PP+H), ocorreu durante 6 meses consecutivos, e apresentaram efeitos sobre a expressão gênica de COL1, TNF- $\alpha$ , ADRB2 e Runx2.

Nas análises comparativas da expressão dos genes alvo da FOP avaliados a partir de células escamosas da boca, de indivíduos portadores de FOP, tratados com ácido ascórbico e propranolol (AA+PP), e tratados com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H) (figura 10), observa-se que, não houve diferença estatisticamente significativa no tratamento tradicional com ácido ascórbico combinado com propranolol (AA+PP), comparado ao controle. Nota-se diferença significativa na expressão do gene COL1 em amostras de pacientes portadores de FOP, após tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina ( $p$ -valor  $< 0,01$ ), indicando uma diminuição da expressão de COL1. Sendo assim, quando comparado ao controle, o tratamento ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), sugere também a diminuição da expressão desse gene alvo (importante por estar envolvido na ativação da proteína G e da PK).

O gene TNF $\alpha$  não apresentou diferença estatisticamente significativa no tratamento ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), comparado ao controle, mas apresentou diferença estatisticamente significativa tanto no tratamento com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), quanto no tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), comparado com indivíduos FOP antes do tratamento.

As análises das expressões relativas dos mRNAs dos genes COL1 e TNF- $\alpha$ , analisados mostraram diferenças estatisticamente significativas nas comparações C x FOP ( $p < 0,05$ ); FOP x AA+PP ( $p < 0,001$ ) e FOP x AA+PP+H ( $p < 0,01$ ), respectivamente (Figuras 10 e 11).

Em relação ao gene ADRB2, não houve diferença estatisticamente significativa no tratamento com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), comparado ao controle, nem mesmo com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), comparado ao controle.

Nesse sentido, os resultados sugerem que o tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), reduziu a expressão do gene ADBR2, trazendo para valores próximos ao controle.

A análise comparativa do gene RUNX2 revelou diferenças estatisticamente significativa do tratamento com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), em relação ao controle. Sendo assim, o tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), reduziu significativamente a expressão do gene RUNX2, importante para diferenciação de osteoblastos, comumente superexpresso em pacientes com FOP.

As análises das expressões relativas dos mRNAs dos genes ADBR2 e RUNX2, analisados mostraram diferenças estatisticamente significativas nas comparações C x FOP ( $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ ); FOP x AA+PP ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e FOP x AA+PP+H ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), respectivamente (Figuras 12 e 13).

Vale mencionar que os genes COL1 e TNF $\alpha$  foram superexpressos nos pacientes com FOP, nas análises descritas no presente estudo, além disso o gene RUNX2 quase apresentou significância, corroborando ao fato de que esses genes costumam ser superexpressos em portadores de FOP sem tratamento, sugerindo a redução da expressão desses genes, após tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H).

Esse resultado sugere que a redução na expressão dos genes após o tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), pode vir a reduzir sintomas clínicos, considerados como surtos, que costumam surgir em alguma parte do corpo, com inflamação local e por consequência a ossificação heterotópica no local. Entretanto, verificou-se que o tratamento com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), ainda apresenta-se ser uma opção confiável para a estabilização dos sintomas clínicos do paciente com FOP.

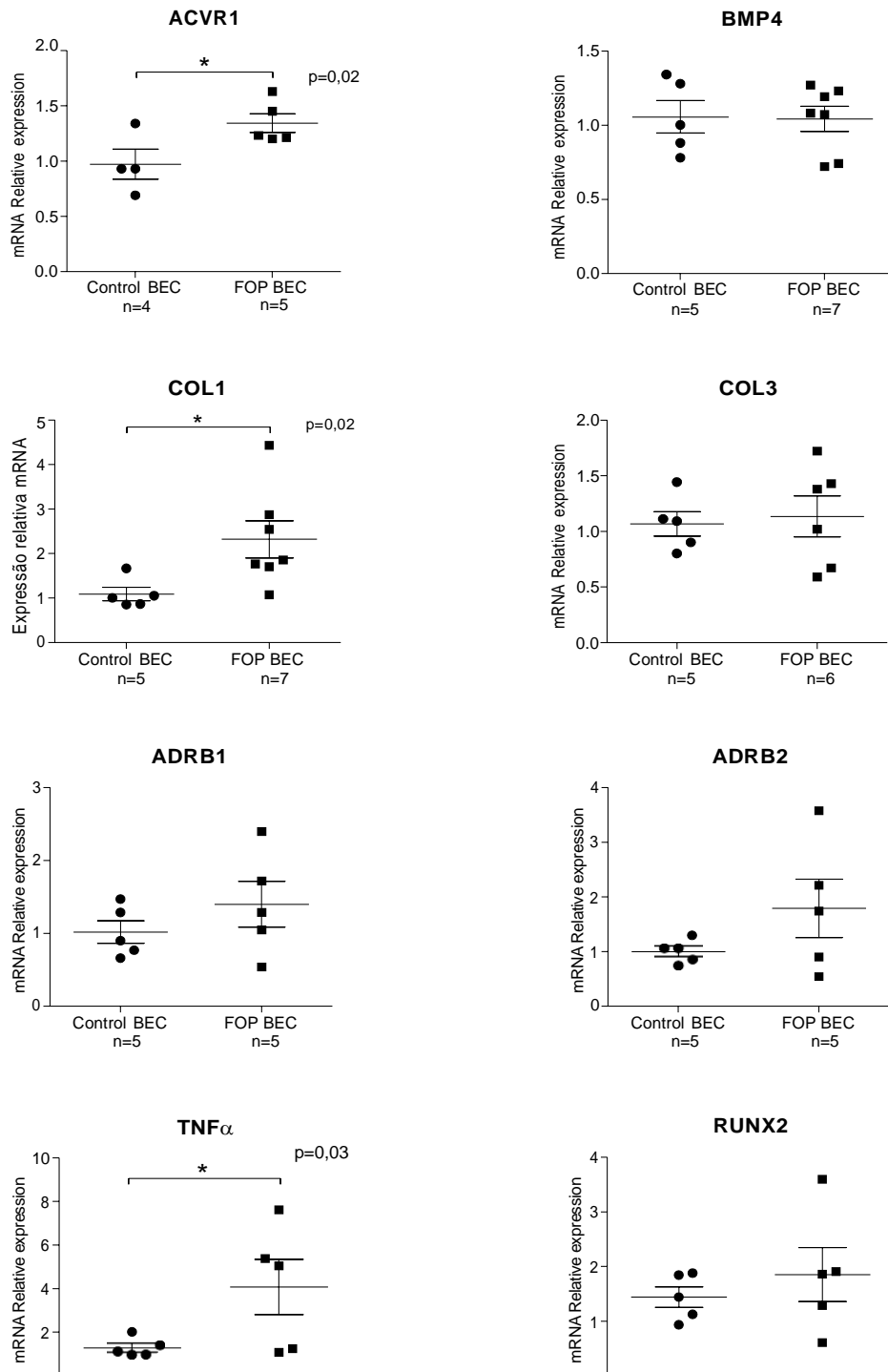


Figura 8 - Gráficos de dispersão *Scatter plot* apresentando a comparação da expressão dos genes alvo em células epiteliais da mucosa oral de portadores da Fibrodissiplasia Ossificante Progressiva (FOP) *versus* controles saudáveis. São diferenças significativas nas expressões basais de mRNA para os genes *ACVR1*; *TNF $\alpha$*  e *COL1* ( $p < 0,05$ ) em CEB da FOP.

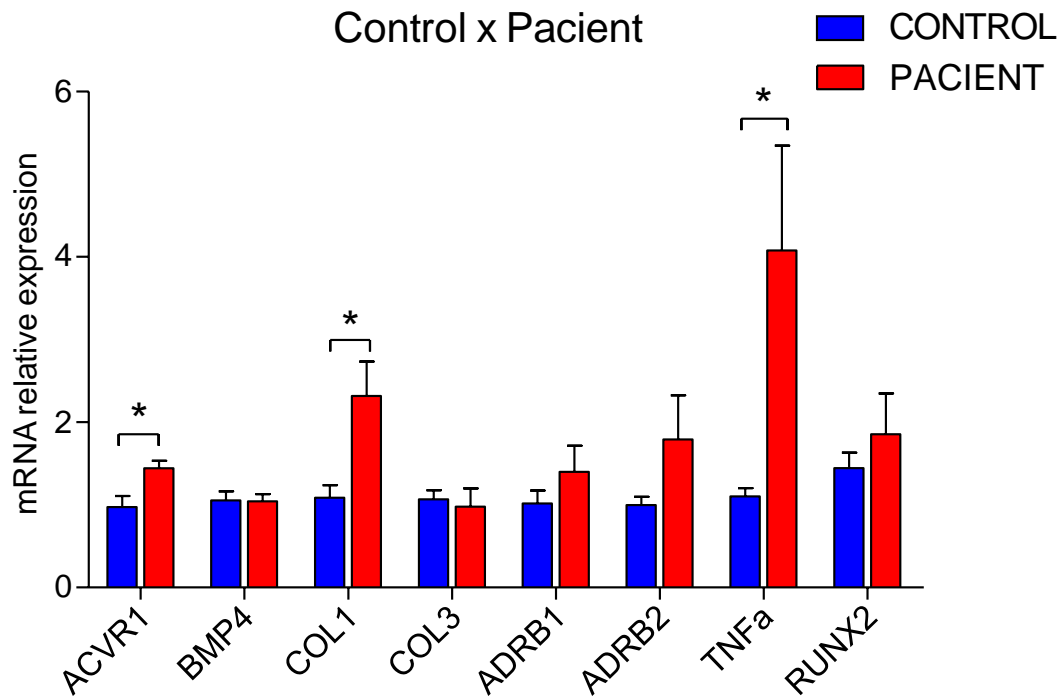


Figura 9 - Perfil de expressão relativa de mRNA de FOP CEB vs. controles saudáveis. Diferenças significativas nas expressões basais de mRNA para os genes ACVR1, TNF- $\alpha$  e COL1 ( $p < 0,05$ ) de FOP CEB são destacadas.

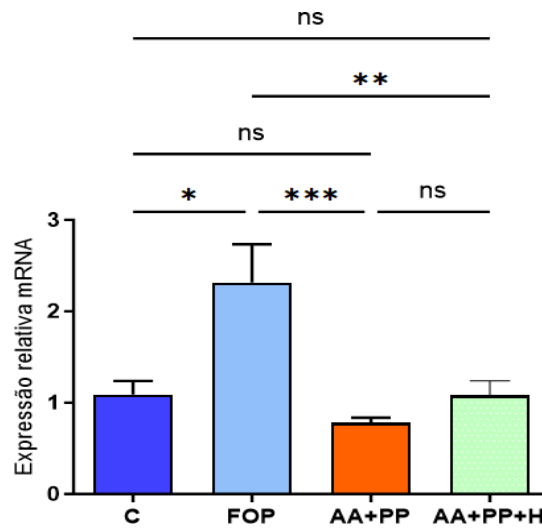
**Tabela 2 – Perfil de expressão relativa de genes alvo em células de mucosa bucal FOP vs. Controle.**

Gene	Expressão	Valor p	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (média± MSE)	Controle	(n) FOP/Controle)
ACVR1	↑	<b>0,0227</b>	<b>1,34±0,09*</b>	<b>0,97±0,08</b>	5/4
BMP4	-	0,4627	1,04±0,09	1,06±0,11	7/5
COL1	↑	<b>0,0191</b>	<b>2,32±0,42**</b>	<b>1,09±0,15</b>	7/5
COL3	-	0,3869	1,13±0,18	1,07±0,11	6/5
ADRB1	-	0,1538	1,40±0,31*	1,02±0,15	5/5
ADRB2	↑	0,0919	1,79±0,54	1,00±0,10	5/5
RUNX2	-	0,2317	1,85±0,50	1,45±0,19	5/5
TNF- $\alpha$	↑	<b>0,0306</b>	<b>4,08±1,27*</b>	<b>1,30±0,20</b>	5/5

Legenda: (-) mesma expressão; (↑) expressão aumentada; (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ) as significâncias dos testes estatísticos são destacadas; (n) número de amostras e (↑) tendência para aumento de expressão gênica.

**Fonte:** Dados da pesquisa, (2024).

A]



B]

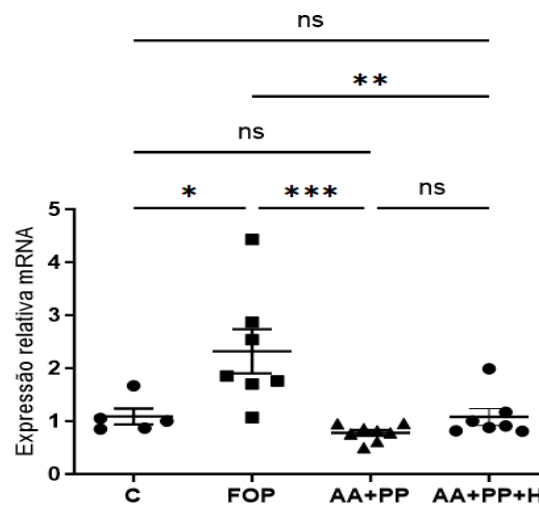
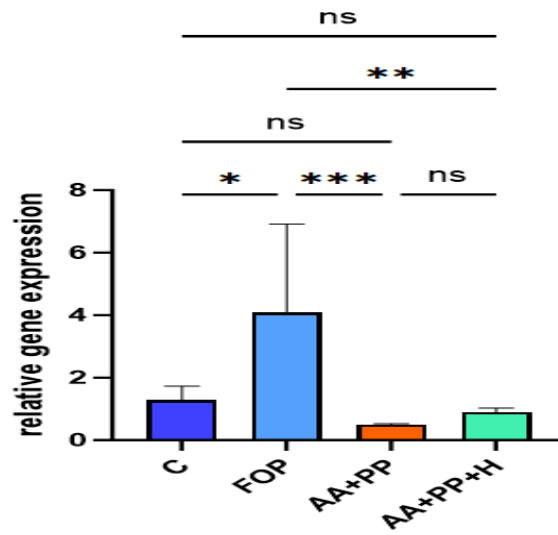


Figura 10 - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de *Coll*. As comparações de expressão gênica foram analisadas entre CEB de indivíduos controles (**C**) não portadores de FOP e pacientes antes do tratamento (**FOP**), CEB versus tratamentos com FOPCON (AA+PP) e FOPCON + Hesperidina (AA+PP+H) durante 6 meses consecutivos em dois grupos distintos nos tratamentos. Os resultados mostram diferenças de **C x FOP** ( $p < 0,05$ ); **FOP x AA+PP** ( $p < 0,001$ ) e **FOP x AA+PP+H** ( $p < 0,01$ ). A] e B] representam gráficos do mesmo experimento em formatos diferentes, barras e dispersão *Scatter plot*, respetivamente.



A]



B]

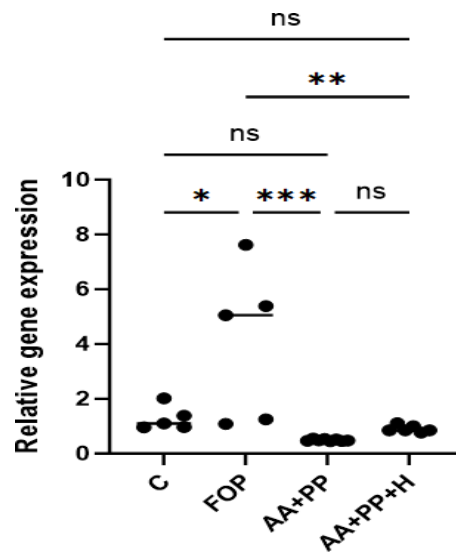
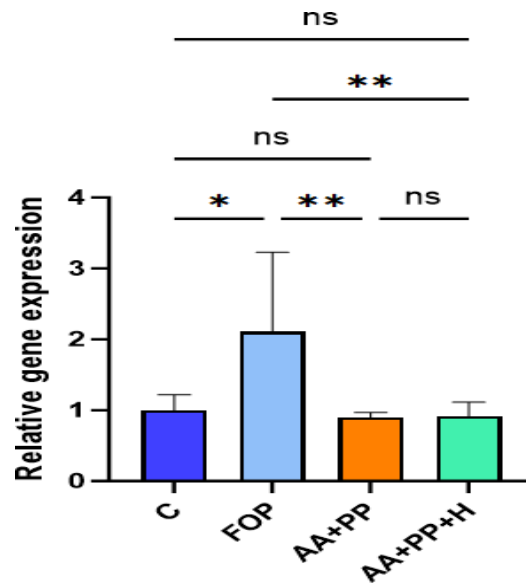


Figura 11 - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de TNF- $\alpha$ . As comparações de expressão gênica foram analisadas entre CEB de indivíduos controles (C) não portadores de FOP e pacientes antes do tratamento (FOP), versus tratamentos com FOPCON (AA+PP) e FOPCON + Hesperidina (AA+PP+H) durante 6 meses consecutivos. Os resultados mostram diferenças significativas de C x FOP ( $p < 0,05$ ); FOP x AA+PP ( $p < 0,001$ ) e FOP x AA+PP+H ( $p < 0,01$ ). A] e B] representam formatos gráficos do mesmo experimento em barras e dispersão *Scatter plot*, respectivamente.

A]



B]

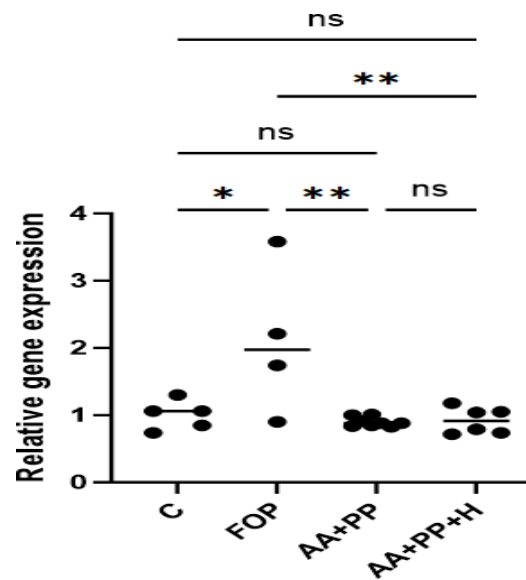
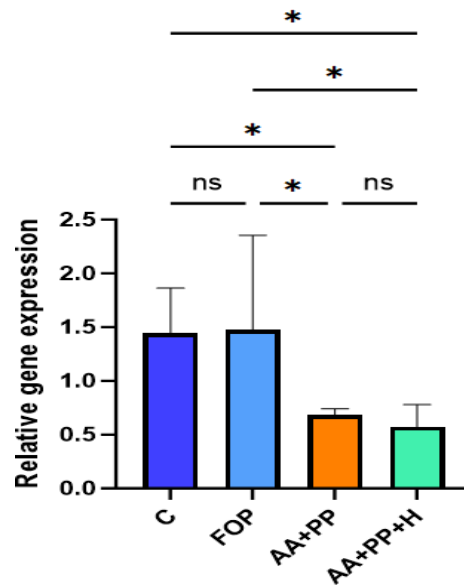


Figura 12 - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de ADBR2. As comparações de expressão gênica foram analisadas entre CEB de indivíduos controles (C) não portadores de FOP e pacientes antes do tratamento (FOP), versus tratamentos com FOPCON (AA+PP) e FOPCON + Hesperidina (AA+PP+H) durante 6 meses consecutivos em dois grupos distintos nos tratamentos. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas nas comparações C x FOP ( $p < 0,05$ ); FOP x AA+PP ( $p < 0,01$ ) e FOP x AA+PP+H ( $p < 0,01$ ).

A] e B] representam gráficos do mesmo experimento em formatos diferentes, barras e dispersão *Scatter plot*, respectivamente.

A]



B]

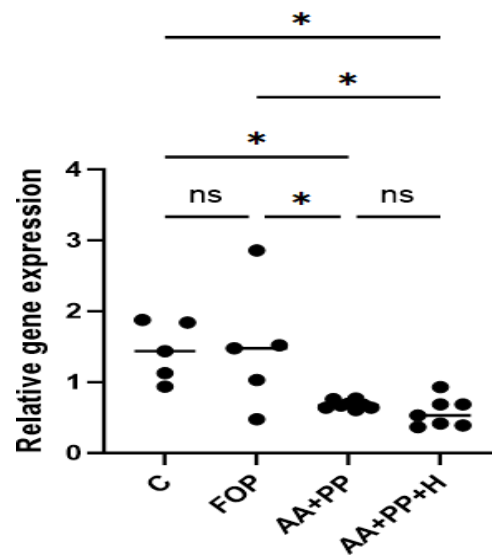


Figura 13 - Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica de RUNX2. As comparações de expressão gênica foram analisadas entre CEB de indivíduos controles (C) não portadores de FOP e pacientes antes do tratamento (FOP), versus tratamentos com FOPCON (AA+PP) e FOPCON + Hesperidina (AA+PP+H) durante 6 meses consecutivos em dois grupos distintos nos tratamentos. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas nas comparações C x FOP ( $p < 0,05$ ); FOP x AA+PP ( $p < 0,05$ ) e FOP x AA+PP+H ( $p < 0,05$ ). A] e B] representam gráficos do mesmo experimento em formatos diferentes, barras e dispersão *Scatter plot*, respectivamente.

## 6 DISCUSSÃO

A avaliação da expressão gênica em pacientes com FOP é crucial para entender os mecanismos moleculares subjacentes à doença e identificar possíveis alvos terapêuticos. Este estudo revelou um aumento estatisticamente significativo na expressão dos genes *ACVRI*, *COL1* e *TNF $\alpha$*  ao se comparar o grupo controle com grupo de indivíduos portadores de FOP, confirmando o mesmo genótipo apresentado em diversos estudos, fornecendo a informação genética para as manifestações fenotípicas da doença (Kaplan et al., 2020; Nascimento et al., 2021; Hildebrand et al., 2017).

Um estudo realizado por Nascimento et al., (2021) avaliaram a expressão potenciais genes alvo, pela técnica de RT-PCR, em amostras de cultivo de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) obtidas de pacientes com FOP e de grupos controle não portador, evidenciando uma redução significativa da expressão do gene *ACVRI*. Entretanto, no presente estudo, o gene *ACVRI* apresentou um aumento significativo quando comparado com os grupos de pacientes portadores de FOP e controles saudáveis.

Esse gene por ter papel crucial na patogênese da doença, presume-se que a expressão do gene *ACVRI* seja significativamente mais elevada durante os episódios agudos da doença, sendo um fator crucial para o desenvolvimento e progressão da FOP (VALER et al., 2019). A diferença entre o presente estudo e o de Nascimento et al. (2021) pode estar relacionada ao tipo de amostra utilizada, uma vez que as células de cultivo são estabilizadas por um período e, fora do organismo, não estão mais sob efeito de estímulos orgânicos.

No presente estudo, o gene *COL1* apresentou o maior aumento significativo, podendo estar relacionado ao fato do colágeno tipo I ser o principal componente da matriz extracelular do tecido ósseo, fazendo com que a formação ectópica de ossos na FOP aumente a produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos que formam esse tecido (Cruz et al., 2022).

Ao retomar o estudo de Nascimento et al. (2021), também foi possível observar um aumento significativo do gene *COL1* nas amostras de PBMC. No entanto, a expressão desse gene teve resultados semelhantes, corroborando com os resultados *in vitro* que se demonstraram satisfatórios no tratamento com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP), na redução da expressão de genes inflamatório e ossificação heterotópica.

Já *TNF $\alpha$*  que apresentou um aumento significativo no presente estudo, sendo o que codifica a citocina pro-inflamatória que é produzida por células do sistema imunológico e está envolvida na regulação da resposta imune. Hsieh et al. (2017) em sua pesquisa experimental, identificaram que os níveis de *TNF $\alpha$*  atingiram um pico em 48 horas no grupo que sofreu lesão

musculoesquelética, considerando que essa citocina salivar pode servir como biomarcador para o diagnóstico em estágio inicial de Ossificação Heterotópica Genética.

Quando comparamos os resultados do presente estudo com os achados de Nascimento et al. (2021) é possível observar que ambos apresentaram um aumento significativo da expressão do gene *TNF $\alpha$*  na mesma proporção. Este fato pode estar relacionado ao tipo de gene expresso, que pode ser menos afetado por sofrer menos interferência em relação ao material analisado.

Com base na superexpressão de *TNF $\alpha$*  pacientes com FOP, após tratamento com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP) e tratamento ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), verificou-se redução na expressão desse gene, que está associado ao processo inflamatório fisiopatológico da FOP, sugerindo que o tratamento com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), foi eficiente.

As amostras de células escamosas da boca, apresentaram resultados promissores nos tratamentos com ácido ascórbico + propranolol (AA+PP) e o tratamento inovador com ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), possibilitando validar a avaliação da expressão dos genes a partir de amostras de células escamosas da boca, em modelo *in vivo*.

A significância do resultado ácido ascórbico + propranolol + Hesperidina (AA+PP+H), evidenciou o potencial de redução da expressão desse gene alvo estudado na FOP após o tratamento, com resultado encorajador quanto ao controle de sintomas clínicos.

No presente trabalho verificou-se a viabilidade de CEB como espécime não invasivo, do qual podem ser obtidos rendimentos acima de 2  $\mu$ g de RNA total, utilizando raspados de mucosa oral com espátulas abaixadoras de língua para uso pediátrico. Vale destacar, que no presente estudo, a extração do RNA a partir do material proveniente do raspado de mucosa oral dos pacientes foi realizada utilizando o TRizol como reagente principal.

Esse método foi escolhido devido à sua eficiência na recuperação do RNA, uma vez que esse tipo de material genético é facilmente degradado. A extração bem-sucedida do RNA é essencial para a subsequente síntese de cDNA por meio da transcriptase reversa e a análise dos genes-alvo.

O RNA total obtido pelo método comum Trizol foi suficiente para todos os estudos quantitativos de PCR em tempo real após transcrição reversa. O armazenamento imediato de células escamosas raspadas em estabilizador de RNA foi obrigatório para preservar o RNA celular total antes da extração. Uma extensa discussão sobre as prováveis funções dos genes selecionados aqui, bem como seu papel na fisiopatologia da FOP, já apresentado em trabalho anterior de Nascimento et al., 2021.

O Trizol demonstrou ser uma escolha satisfatória, que permitiu a detecção de todos os genes de importância para o estudo. A utilização desse reagente proporcionou a obtenção de um RNA de alta qualidade, fundamental para a realização de análises precisas e confiáveis dos genes alvo. O estudo de Gandhi et al. (2020) utilizou Trizol para a extração de RNA total da saliva humana e os resultados obtidos foram de alto rendimento do material genético, corroborando com os achados do presente estudo.

No entanto, o uso de CEB para futuros estudos genômicos de espectro mais amplo, deve ser importante na compreensão contínua dos mecanismos moleculares que envolvem a fisiopatologia da FOP. Neste estudo, os dados de expressão relativa obtido dos oito genes investigados, nas células epiteliais da mucosa oral, mostram diferenças distintas na expressão basal de *ACVR1*, *TNF- $\alpha$*  e *COL1* na FOP em CEB, em comparação com o controle saudável *in vivo*.

Isso é consistente com dados anteriores observados por Nascimento et al., (2021), *in vitro* em células PBMC e leucócitos totais do sangue periférico, apesar da expressão dos genes *Col3*, *ADRB1*, *ADRB2* e *RUNX2* não apresentarem diferenças significativas, embora houvesse tendências de aumento da expressão para os transcritos *ADRB1*, *ADRB2* e *RUNX2*, sugerindo que esses resultados de CEB em portadores da FOP, também corroboram observações anteriores em trabalhos do nosso laboratório de algum perfil distinto de expressão fenotípica de mRNA de genes alvo da FOP (Tabela 3) (Nascimento et al., 2017; 2021).

**Tabela 3 – Perfil comparativo de expressão dos genes alvo da FOP em diferentes fontes celulares.**

Células/Gene	PBMC	CEB	CEB AA+PP	CEB AA+PP+H
ACVR1	↓	↑	NA	NA
BMP4	-	-	NA	NA
COL1	↑	↑	↓	↓
COL3	↓	-	NA	NA
ADRB1	↑	-	NA	NA
ADRB2	↑	↑	↓	↓
RUNX2	↑	↑	↓	↓
TNF - $\alpha$	↑	↑	↓	↓

**Legenda:** PBMC: células mononucleares do sangue periférico; CEB: células epiteliais escamosas bucais; e PBL: leucócitos totais do sangue periférico.

**Fonte:** Nascimento, (2021); Present work.

O acesso invasivo a material biológico em pacientes com FOP é um grande obstáculo para estudos *in vivo* que visam compreender melhor a biologia molecular envolvida na fisiopatologia da doença. Isso se deve a possíveis traumas durante a coleta que podem causar

surtos e consequências indesejáveis, como a formação de ossificação heterotópica (Palhares, Leme, 2001; Kaplan et al., 2005; Groppe, Shore, Kaplan, 2007).

Espécimes citológicas da cavidade oral têm sido sugeridos como uma excelente fonte de material biológico facilmente acessível para estudos alvo de genética, genotoxicidade, epigenética, proteômica, metabolômica e microbiomas. Isso se deve à coleta rápida, não invasiva e de baixo custo em comparação com tecidos como o sangue (Theda et al., 2018). Fontes alternativas, como escovas citológicas, enxaguatórios bucais e cartões de coleta para extração de DNA genômico de células orais já foram testados para estudos genéticos e investigações epidemiológicas, comparando seus rendimentos, viabilidades, qualidades e custos, abordagem, segura e indolor (Araújo et al., 2021).

Os protocolos foram validados e aplicados em diferentes estudos (Dongen et al., 2018). Embora este método seja interessante para estudos genéticos ou para diagnóstico por PCR, geralmente tais materiais são um tanto heterogêneos em termos de tipos de células no material biológico, o que seria mais complexo para análises comparativas e quantitativas de expressão específica de mRNA, como genes alvo do FOP.

Este, entre outros, foi o principal motivo pelo qual optou-se por trabalhar com células escamosas da parede oral interna. Apesar disso, o RNA total de qualidade é atualmente um dos materiais mais importantes para análises genômicas funcionais, incluindo transcritos de diferentes espécies de RNA, em seus diferentes aspectos funcionais, e estudos que avaliem a viabilidade do método de extração de RNA total de espécies celulares da boca são raros.

Além disso, enzimas digestivas, como amilases e até mesmo RNAses da saliva, podem ser um obstáculo para coletas com baixo número de células em diferentes *swabs* (Zubakov et al., 2008; Thompson et al., 2001; Park et al., 2006; Hasan, Al-issa, 2011; Schenkels, Veerman e Amerongen, 1995).

Embora não existam referências, até onde sabemos, nos estudos sobre a fisiopatologia da FOP em relação à coleta de CEB, para análise contínua da expressão gênica, mostrando que esta abordagem ainda falha nos estudos da FOP. Pacientes com FOP não podem ser submetidos a procedimentos invasivos. Porém, devido a essa indisponibilidade devido às consequências indesejáveis ao paciente, os estudos *in vitro* ou *in vivo* da FOP são dificultados pela inviabilidade de obtenção de células, ou tecidos alvo para estudos contínuos de modulação gênica, ou de ensaios clínicos monitorados com marcadores genéticos, que requerem amostras para análise constante.

O modelo mais comum utilizado são as linhas celulares linfo blastoides (LCL) de PBMC por transformação com o vírus Epstein-Barr, pois o trauma nos tecidos conjuntivos

profundos pode ser evitado ao coletar amostras de sangue periférico de pacientes com FOP. O LCL tem sido uma ferramenta importante e valiosa para estudos *in vitro* da expressão gênica na FOP (De La Peña et al., 2005; Feldman et al., 2000; Fiori et al., 2006; Shafritz et al., 1996; Shore e Kaplan, 2008), embora ainda seja uma abordagem invasiva sujeita a dificuldades em certas situações com riscos de erro humano na coleta.

Neste mesmo esforço, métodos menos arriscados têm sido abordados, como o isolamento de células progenitoras multipotentes da polpa dentária de dentes decíduos, porém descartados em crianças com FOP (Billings et al., 2008; Shore e Kaplan, 2008), ainda uma abordagem com limitações, quando se deseja monitorar pacientes em pesquisas contínuas. Além disso, foram consideradas células-tronco pluripotentes induzidas (IPTC) derivadas de fibroblastos dérmicos normais e de pacientes com FOP (Hino et al., 2015; Kim et al., 2016; Matsumoto et al., 2013).

Porém, para essas células há necessidade de biópsias dos pacientes, além da manutenção dessas culturas, parece que as respostas celulares podem mudar com o tempo. Existem alguns dados que mostram a otimização dos métodos de biópsia e a melhora das células CTPI (Matsumoto et al., 2015; Micha et al., 2016), mas sempre há um risco para os pacientes quando submetidos a biópsias.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou a expressão dos principais genes relacionados à Fibrodysplasia Ossificante Progressiva em pacientes sem tratamento e identificou diferenças na expressão basal de mRNA dos genes *ACVRI*, *TNF- $\alpha$*  e *COL1*, sendo um deles o principal gene envolvido na evolução da doença. A viabilidade de amostras obtidas da mucosa oral provou ser um procedimento eficiente, fácil, indolor e minimamente invasivo no monitoramento de pacientes com FOP. O método tem potencial para contribuir significativamente em diversos estudos que identifiquem os principais genes expressos e os alvos terapêuticos mais eficazes no tratamento da doença.

Além disso, essa técnica de coleta exige poucos critérios em relação à estrutura do local da coleta, podendo ser realizada em locais com menor acesso às condições laboratoriais como o domicílio, sem comprometer a qualidade das amostras. Este estudo introduziu uma abordagem inovadora ao coletar amostras através do raspado da mucosa oral, evidenciando seu potencial como uma alternativa promissora para minimizar o desconforto e os riscos associados à coleta de sangue periférico ou a outros métodos invasivos utilizados nos participantes.

A análise dos resultados revelou uma concordância notável com estudos anteriores que utilizaram células de PBMC do mesmo grupo de pesquisa, confirmando as alterações observadas e reforçando a validade desta nova metodologia. O uso CEB como amostras para pesquisa de FOP, é um material biológico inovador, não invasivo, para futuros projetos clínicos e moleculares, com finalidade de monitoramento, sem risco, da expressão gênica e possivelmente a análise do transcrito de pacientes *in vivo*.

Além do mais, o presente trabalho demonstrou que os genes que estavam alterados nos pacientes antes do tratamento, foram revertidos pelo tratamento, tanto com FOPCON, quanto com FOPCON mais adição de Hesperidina. Nesse procedimento, duas questões são observadas nos resultados 1) O tratamento teve efeito na modulação gênica.

2) O FOPCON, ou seja, o ácido ascórbico + propranolol, permitiu a modulação dos genes e mesmo com adição de Hesperidina, os resultados se repetiram. Embora não exista sensibilidade no método capaz de diferenciar o efeito potenciador ou não da Hesperidina, mas definitivamente a Hesperidina não prejudicou o tratamento do FOPCON e manteve a condição em termos de expressão gênica.

Portanto a terceira observação, importante nos resultados obtidos neste trabalho, é que o uso de células do epitélio bucal se tornam um potencial material, tanto para avaliação do tratamento no seu aspecto clínico como também, na obtenção de dados moleculares

importantes, relacionados com a fisiopatologia da fibrodissplasia ossificante progressiva.

## REFERÊNCIAS

AKESSON, L. S.; SAVARIRAYAN, R. Fibrodysplasia ossificans progressiva. In: **GeneReviews®** [Internet]. Seattle (WA): Universidade de Washington, 1993. Publicação inicial: 11 jun. 2020; última revisão: 23 mai. 2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558090/>>.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLoughby, D. A. Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Advances in Pharmacology**, v. 35, p. 27-78, 1996. DOI: 10.1016/s1054-3589(08)60274-4.

ARAUJO, M. C.; VALENTE, A. D.; SOUZA, G. A. F.; AVELAR, A. C. S.; TORRESAN, C.; MORAES, A. M. S. M.; REIS, M. F. Adaptação de um método de extração de DNA a partir de células da mucosa bucal baseado em parâmetros de qualidade. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 34697-34708, abr. 2021.

AUERBACH, W.; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 63, n. 3, p. 265-311, set. 1994. DOI: 10.1016/0163-7258(94)90027-2.

BALANIUC, S. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: pro-inflammatory and pro-fibrotic genes as targets for research and treatment of clinical symptoms of this rare and devastating disease. **Revista NBC**, Belo Horizonte, v. 9, n. 17, 2019.

BAUER, A. H. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a current review of imaging findings. **Skeletal Radiology**, v. 47, n. 8, p. 1043-1050, ago. 2018. DOI: 10.1007/s00256-018-2889-5.

BEN-AV, P. et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. **FEBS Letters**, v. 372, n. 1, p. 83-87, 18 set. 1995. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00956-a.

BARRUET, E. et al. NF- $\kappa$ B/MAPk activation underlie ACVR1-mediated inflammation in human heterotopic ossification. **JCI Insight**, v. 3, n. 22, p. e122958, 2018. DOI: 10.1172/jci.insight.122958.

BARRUET, E. et al. Modeling the ACVR1R206H mutation in human skeletal muscle stem cells. **eLife**, v. 10, e66107, 2021. DOI: 10.7554/eLife.66107.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 13 ago. 2008. DOI: 10.1021/jf8006568.

BILLINGS, P. C.; FIORI, J. L.; BENTWOOD, J. L. et al. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 3, p. 305-313, mar. 2008. DOI: 10.1359/jbmr.071030.

BRIDGES, A. J. et al. Fibrodysplasia (myositis) ossificans progressive. **Seminars in Arthritis**

**and Rheumatism**, v. 24, n. 3, p. 155-164, 1994. DOI:10.1016/0049-0172(94)90071-x.

CARLEVARO, M. F. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 1, p. 59-69, jan. 2000. DOI: 10.1242/jcs.113.1.59.

COHEN, R. B. et al. The natural history of heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva: A study of forty-four patients. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American Volume, v. 75, n. 2, p. 215-219, fev. 1993. DOI: 10.2106/00004623-199302000-00008.

CONNOR, J. M.; EVANS, D. A. P. Fibrodysplasia ossificans progressiva: the clinical features and natural story of 34 patients. **The Journal of Bone and Joint Surgery [British]**, v. 64, p. 76-83, 1982. doi:10.1302/0301-620X.64B1.7068725

COROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.

CREMIN, B.; CONNOR, J. M.; BEIGHTON, P. The radiological spectrum of fibrodysplasia ossificans progressiva. **Clinical Radiology**, v. 33, p. 499-508, Sept. 1982.

CRUZ, M. A. E.; FERREIRA, C. R.; NOGUEIRA, L. F. B.; ANDRILLI, L. H. S.; SANTOS, A. L. N.; MACEDO, J. M. M.; VESCHI, E. A.; FAVARIN, B. Z.; SEBINELLI, H. G.; BOLEAN, M.; RAMOS, A. P.; CIANCAGLINI, P. Aspectos químicos da biomineralização óssea. **Química Nova**, v. 45, n. 5, 2022. DOI: 10.21577/0100-4042.20170851.

DE BRASI, D. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a challenging diagnosis. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1187, 2021. DOI: 10.3390/genes12081187.

DE LA PEÑA, L.S.; BILLINGS, P. C.; FIORI, J. L. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. **J Bone Miner Res**. v. 20, n. 7, p. 1168-1176, July., 2005. DOI: 10.1359/JBMR.050305.

DELAI, P. L. R.; KANTANIE, S.; SANTILI, C.; KAPLAN, F. S. Fibrodysplasia ossificans progressiva: uma doença hereditária de interesse multidisciplinar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 5, p. 1-6, maio 2004.

DETMAR, M. Tumor angiogenesis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 20-23, dez. 2000. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00003.x.

DIAS, S. C.; FREIRE, M. H. S.; SAGANSKI, G.F. Fibrodysplasia ossificans progressiva em pediatria: revisão integrativa com foco na enfermagem. **Rev Enferm Atenção Saúde**, v.11, n.1,p. e202247, 2022. DOI: /10.18554/reas.v11i1.5289.

DOĞAN, E. et al. The terminal period findings of late diagnosed fibrodysplasia ossificans

progressiva. **GMS German Medical Science**, v. 21, Doc12, 2023. DOI: 10.3205/000326.

DONGEN, J. V.; EHLLI, E. A.; JANSEN, R. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in buccal cells: a study of monozygotic twins and mQTLs. *Epigenetics & Chromatin*. v.11, p. 54, 2018. DOI: /10.1186/s13072-018-0225-x.

DOURADO, G. K. Z. S. **Efeito do suco de laranja e da glicosil Hesperidina sobre o sistema imune inato de camundongos**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2009. (Dissertação de Mestrado).

DZUKOU, T.; BARBIER, C.; SPYCKERELLE, C.; LABARRIÈRE, F.; VITTU, G.; KREMP, O. Fibrodysplasia ossificans progressiva in children: the interest of early diagnosis and treatment. **Presse Médicale**, v. 34, n. 5, p. 373-377, 12 mar. 2005.

ELAMIN, M.; IBRAHIM, A. A.; OMER, A. Fibrodysplasia ossificans progressiva: a report of four cases. **Cureus**, v. 14, n. 3, e23392, 22 mar. 2022. DOI: 10.7759/cureus.23392.

EL-MARASY, Salma A. et al. Anti-depressant effect of hesperidin in diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 92, n. 11, p. 945-952, 2014. DOI: 10.1139/cjpp-2014-0281.

FELDMAN, G.; LI, M.; MARTIN, S. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva, a heritable disorder of severe heterotopic ossification, maps to human chromosome 4q27-31. **Am. J. Hum. Genet.** v. 66, n. 1, p. 128-135, jan. 2000. DOI: /10.1086/302724.

FERRARA, Napoleone. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 280, n. 6, p. C1358-C1366, jun. 2001. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1358.

FERRARA, Napoleone; GERBER, Hans-Peter; LECOUTER, Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, jun. 2003. DOI: 10.1038/nm0603-669.

FIORI, J. L.; BILLINGS, P. C.; DE LA PEÑA, L. S. et al. Dysregulation of the BMP p38 MAPK Signaling Pathway in Cells From Patients With Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP). **J Bone Miner Res.** v. 21, n. 6, p. 902-909. DOI: 10.1359/jbmr.060215

FOLKMAN, Judah. Endogenous angiogenesis inhibitors. **APMIS**, v. 112, p. 496-507, 2004.

FOLKMAN, Judah; KLAGSBRUN, Mark. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442-447, 23 jan. 1987. DOI: 10.1126/science.2432664.

FREIRE, A. L.; CARDOSO, E. F. V.; SAMARA, A. M. Miosite ossificante progressiva de apresentação tardia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 35(4), p. 215-217, 1995.

GANDHI, V.; O'BRIEN, M. H.; YADAV, S. High-quality and high-yield RNA extraction method from whole human saliva. **Biomarker Insights**, v. 15, p. 1177271920929705, 2020. DOI: 10.1177/1177271920929705.

GARCIA-PINZAS, J. et al. Fibrodysplasia ossificante progressiva: diagnóstico em atenção primária. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 31, n. 1, p. 124-128, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0103-05822013000100020>.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J.; SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, dez. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1074>.

GENGRINOVITCH, S. et al. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 15059-15065, 23 jun. 1995. DOI: 10.1074/jbc.270.25.15059

GERBER, Hans P. et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 623-628, jun. 1999. DOI: 10.1038/9467

GOLDMAN, C. K. et al. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 8795-8800, jul. 1998.

GONÇALVES, A. L. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 4, p. 1090-1093, 2005.

GROPPE, J. C.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 462, p. 87-92, Sep. 2007. DOI: 10.1097/BLO.0b013e318126c049.

HADARI, F. et al. Hesperidin supplementation modulates inflammatory responses following myocardial infarction. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2015. DOI: 10.1080/07315724.2014.891269.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, nov. 2000.

HASAN, H. R.; AL-ISSA Y. A. H. A study of rnaase enzymes in saliva samples from women with breasttumors. **Med J Mundo Islâmico Acad Sci**. v. 19, n. 1, p. 21-26, 2011.

HAVIV, R. et al. Is fibrodysplasia ossificans progressiva an interleukin-1 driven auto-inflammatory syndrome? **Pediatric Rheumatology**, v. 17, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s12969-019-0386-6.

HILDEBRAND, L.; GABER, T.; KÜHNEN, P.; MORHART, R.; UNTERBÖRSCH, H.; SCHOMBURG, L.; SEEMANN, P. Trace element and cytokine concentrations in patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A case control study. **J Trace Elem Med Biol**, v. 39, p. 186-192, 2017. DOI: 10.1016/j.jtemb.2016.10.001.

HINO, K. et al. Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 112, n. 50, p. 15438-15443, Dec. 2015. DOI: 10.1073/pnas.1510540112

HINO, K. et al. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, p. 3339-3352, set. 2017.

HSIEH, H. H. S.; CHUNG, M. T.; ALLEN, R. M.; RANGANATHAN, K.; HABBOUCHE, J.; CHOLOK, D.; BUTTS, J.; KAURA, A.; TIRUVANNAMALAI-ANNAMALAI, R.; BREULER, C.; PRIEST, C.; LODER, S. J.; LI, J.; LI, S.; STEGEMANN, J.; KUNKEL, S. L.; LEVI, B. Evaluation of salivary cytokines for diagnosis of both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v. 8, p. 74, 2017. DOI: 10.3389/fendo.2017.00074.

HOLLMAN, P. C.; CATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man.. **Pharmaceutica Biomedical**, v. 51, n. 8, p. 305-310, 1997. DOI: 10.1016/s0753-3322(97)88045-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9436520/>.

HU, D. E.; FAN, T. P. Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 2, p. 262-268, jan. 1995. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb13221.x.

HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; GOW-CHIN, I. Efeitos neuroprotetores dos flavonóides cítricos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 877-885, fev. 2012. DOI: 10.1021/jf204452y.

INOKI, Isao et al. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. **FASEB Journal**, v. 16, n. 2, p. 219-221, fev. 2002. DOI: 10.1096/fj.01-0332fje.

JACKSON, J. R. et al. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. **FASEB Journal**, v. 11, n. 6, p. 457-465, mai. 1997.

KALIYA-PERUMAL, A.; CARNEY, T. J.; INGHAM, P. W. Fibrodysplasia ossificans progressiva: current concepts from bench to bedside. **Disease Models & Mechanisms**, v. 13, n. 9, p. dmm046441, 2020. doi: <https://doi.org/10.1242/dmm.046441>.

KAMAL, A. F.; APRILYA, D. Fibrodysplasia ossificans progressiva em estágio inicial: relato de caso. **Radiology Case Reports**, v. 15, n. 3, p. 167-173, 2020. DOI: 10.1016/j.radcr.2019.11.009.

KAPLAN, F. S.; AL MUKADDAM, M.; STANLEY, A.; TOWLER, O. W.; SHORE, E. M. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP): A disorder of osteochondrogenesis. **Bone**, v. 140, p. 115539, 2020. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115539.

KAPLAN, F. S.; CHAKKALAKAL, S. A.; SHORE, E. M. Fibrodysplasia ossificans progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. **Disease Models & Mechanisms**, v.5, n. 6, p. 756-762, 1 nov. 2012. DOI:10.1242/dmm.010280.

KAPLAN, F. S. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva. **Best practice & research. Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 1, p. 191- 205, Mar. 2008. DOI: 10.1016/j.berh.2008.11.007.

KAPLAN, F. S.; PIGNOLO, R. J.; AL MUKADDAM, M. M.; SHORE, E. M. Hard

targets for a second skeleton: therapeutic horizons for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Expert Opin Orphan Drugs**, v. 5, n. 4, p. 291-294, Mar. 2017.

KAPLAN, F.S., SHORE, E. M., GUPTA, R, et al. Immunological features of fibrodysplasia ossificans progressiva and the dysregulated BMP4 pathway. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**. v. 3, n. 3, p. 189-193, Sept. 2005. DOI: 10.1385/BMM:3:3-4:189.

KAPLAN F. S., SHORE E. M., PIGNOLO R. J. The International Clinical Consortium On Brodysplasia Ossifucans Progressiva. The medical management of fibrodysplasia ossificans progressiva: current treatment considerations. **Clin Proc Intl Consort FOP**. v. 4, n. 1, p. 100, May. 2011.

KAPLAN, F. S. et al. Acute and chronic rapamycin use in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva: a report of two cases. **Bone**, v. 109, p. 281-284, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.12.011>.

KITTERMAN, J. A. et al. Iatrogenic harm caused by diagnostic errors in fibrodysplasia ossificans progressiva. **Pediatrics**, v. 116, n. 5, 2005. DOI: 10.1542/peds.2005-0469.

KIM, B. Y. et al. Concurrent progress of reprogramming and gene correction to overcome therapeutic limitation of mutant ALK2-iPSC. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 6, p. e237, jun. 2016.

KIM, J. Y.; JUNG, K. J.; CHOI, J. S.; CHUNG, H. Y. et al. Modulation of the age-related nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway by hesperetin. **Ageing Cell**, v. 5, n. 5, p. 401-411, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262

LIU, M., *et al.* REC8 suppresses tumor angiogenesis by inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer cells. **Biol Res**. v. 53, n. 41, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00307-1>

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S-3485S, dez. 2004. DOI: 10.1093/jn/134.12.3479S.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

MAIONE, T.E., *et al.* Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. **Science**. v. 247, p. 77-79. 1990. DOI: 10.1126/science.1688470.

MALDONADO, M. J. M.; et al. Hesperidin Flavonoids from Orange Peel Show Benefits for **Human Health**. *physiology*, v. 233, n. 9, p. 6544-6560, Sept. 2020.

MANTICK, N. et al. O registro de conexão FOP: projeto de um registro internacional patrocinado por pacientes para fibrodysplasia ossificante progressiva. **Bone**, v. 109, p. 285-



290, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.bone.2017.08.032. Epub 2017, 1 set.

MARTINS, A. S. et al. Composições farmacêuticas de propranolol e ácido ascórbico e usos. BR 1020150324928, **UFMG/UFMS**, 23 dez. 2015.

MATSUMOTO, Y.; HAYASHI, Y.; SCHLIEVE, C. R. et al. Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v. 8, n. 1, p.190, Dec. 2013.

MATSUMOTO, Y.; IKEYA, M.; HINO, K. et al. New protocol to optimize iPS cells for genome analysis of fibrodysplasia ossificans progressiva. **Stem Cells**. v. 33, n. 6, p.1730-1742, June. 2015. DOI: /10.1002/stem.1981.

MENDONÇA, Erika Menezes de. **Avaliação dos efeitos do clotrimazol em modelo experimental de endometriose**. 2019. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MIAO, J.; ZHANG, C.; WU, S.; PENG, Z.; TANIA, M. Genetic abnormalities in fibrodysplasia ossificans progressiva. **Genes Genet. Syst**, v. 87, n. 4, p. 213-219, 2012. doi: <https://doi.org/10.1266/ggs.87.213>.

MICHA, D.; VOERMANS, E.; EEKHOFF, M. E.W. et al. Inhibition of TGF $\beta$  signaling decreases osteogenic differentiation of fibrodysplasia ossificans progressiva fibroblasts in a novel in vitro model of the disease. **Bone**. v. 84, p. 169-180, Mar. 2016. DOI:/10.1016/j.bone.2016.01.004

MORBIDELLI, L., *et al.* Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 270, n. 1, H411-H415, 1996. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.270.1.H411.

MOSQUEDA-SOLÍS, A. et al. Hesperidin and capsaicin, but not the combination, prevent hepatic steatosis and other metabolic syndrome-related alterations in western diet-fed rats. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p. 15100, Oct. 2018. DOI:10.1038/s41598-018-32875-4.

NASCIMENTO, D. R. **Efeito do ácido ascórbico na expressão de ACVR1, BMP4, colágenos 1 e 3 em leucócitos de portadores de fibrodysplasia ossificante progressiva**. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, 2014.

NASCIMENTO, D. R. et al. Ascorbic acid modulates the expression of genes involved in heterotopic ossification. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 7, n. 14, p. 81-97, 2017.

NASCIMENTO, D. R. et al. **Estudo da genômica funcional da fibrodysplasia ossificante progressiva em células mononucleares de sangue periférico: modulação gênica pela vitamina C e pelo  $\beta$ -bloqueador propranolol sobre a expressão de transcritos envolvidos na ossificação heterotópica**. 2018. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde e Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, 2018.

- NASCIMENTO, D. R. et al. Rare and intractable fibrodysplasia ossificans progressiva shows different PBMC phenotype possibly modulated by ascorbic acid and propranolol treatment. **Intractable Rare Dis Res.**, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 179-189, 2021. DOI: 10.5582/irdr.2021.01012.
- NICOLAS S, *et al.* Hypoxia and EGF Stimulation Regulate VEGF Expression in Human Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells by Differential Regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK Pathways. **Cells**. v. 8, n. 11, p. 1397, 2019. DOI: 10.3390/cells8111397.
- OLIVEIRA, T. T.; SILVA, R. R.; DORNAS, W. C.; NAGEM, T. J. Flavonoids and Atherosclerosis. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, vol. 42, n. 1, 2010.
- OLMSTED-DAVIS, E. et al. Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. **Am J Pathol**, v. 170, n. 2, p. 620-32, fev. 2007. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060692.
- PAIM, L. B.; LIPHAUS, B. L.; CAMPOS, L. M. M. A.; KIM, C. A.; KISS, M. H. B.; SILVA, C. A. A. Fibrodysplasia ossificante progressiva (FOP) em crianças: relato de três casos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 43(2), p. 123-128, 2003.
- PALHARES D. B. et al. Propranolol and ascorbic acid in control of fibrodysplasia ossificans progressiva surtos due to accidental falls. **Intractable and Rare Diseases Research**, v. 8, n. 1, p. 24-28, 2019. DOI: 10.5582/irdr.2018.01095.
- PALHARES, D. B. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: oral ascorbate and intravenous bisphosphonate during surtos. **Journal of Musculoskeletal Pain**, v. 18, n. 3, p. 270-276, 2010. DOI:10.3109/10582452.2010.501300
- PALHARES, D. B. et al. Propranolol and ascorbic acid in control of fibrodysplasia ossificans progressiva surtos due to accidental falls. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 8, n. 1, p. 24–28, 2019.
- PALHARES, D. B. Myositis ossificans progressive. **Calcified Tissue International**, v. 60, n. 4, p. 394, 1997. DOI: 10.1007/s002239900250
- PALHARES, D. B.; LEME, L.M. Miosite ossificante progressiva: uma perspectiva no controle da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 5, p. 431-434, out. 2001. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572001000500016>.
- PARK, N. J.; LI, Y.; YU, T. et al. Characterization of RNA in Saliva. **Molecular Diagnostics and Genetics. Clinical Chemistry**. v. 52, n. 6, p. 988-94, 2006. DOI:10.1373/clinchem.2005.063206.
- PATIN, G. Lettre XII. In: PETIT, J. (Ed.). **Lettres choisies de feu Mr. Guy Patin**. v. 1. Paris: Jean Petit, 1692. p. 32.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.7, p. 1035-1042, 2000.
- PIGNOLO, R. J. et al. Prevalence of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) in the

United States: estimate from three treatment centers and a patient organization. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, n. 1, p. 350, 2021.

PIGNOLO, R.J., SHORE, E.M., KAPLAN, F.S. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. **Orphanet J Rare Dis**, 2011; v. 6, p. 80, 2011. DOI: 10.1186/1750-1172-6-80.

QI, Z. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva: basic understanding and experimental models. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 6, n. 4, p. 242-248, 2017.

RAO, N.; LEE, Y.F.; GE, R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. **Acta Pharmacol Sin.** v. 36, n. 10, p. 1177-1190, 2015 DOI: 10.1038/aps.2015.73.

RIBATTI, D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. **British Journal of Hematology**, v. 128, n. 3, p. 303-309, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05291.x.

ROOHBAKHSH, A. et al. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin - A mini-review. **Life Sciences**, v. 113, n. 1-2, p. 1-6, 2014.

ROSENSTIRN, J. A contribution to the study of myositis ossificans progressiva. **Annals of surgery**, v. 68, n. 6, p. 591-637, 1918.

SALISBURY, E. et al. Heterotopic ossification has some nerve. **Critical Review of Eukaryot Gene Expression**, v. 20, n. 4, p. 313-324, 2010. DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i4.30.

SALISBURY, E. et al. Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 10, p. 2748-2758, 2011. DOI: 10.1002/jcb.23225.

SCHENKELS, L. C.; VEERMAN, C. E.; AMERONGEN, A. V. N. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 6, n. 2, p. 161-175, 1995. DOI: 10.1177/10454411950060020501.

SENGER, D.R., *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**. 219, v. 458, p. 983-5, 1983. DOI: 10.1126/science.6823562.

SHAFRITZ, A. B. et al. Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 8, p. 555-561, ago. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM199608223350804>.

SHAH, Z. A.; et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva (stone man syndrome): a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 13, n. 1, p. 364, 2019. doi: 10.1186/s13256-019-2297-z.

SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Bone**. v. 43, n. 3, p. 427-433,

Sept.2008. DOI:10.1016/j.bone.2008.05.013.

SHORE, E. M. et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. **Nat Genet**, v. 38, n. 5, p. 525- 7, maio 2006. DOI: 10.1038/ng1783. Erratum in: *Nat Genet*. v. 39, n. 2, p. 276, 2007. DOI:10.1038/ng1783.

SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 6, p. 518-527, 2010.

SHWEIKI, D., et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. 768-772, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.3.768.

SILVA, C. S. E. dos S. et al. Plantas utilizadas como chás com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. 2012. Monografia. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Portugal.

SMILDE, B. et al. Monitoring and management of fibrodysplasia ossificans progressiva: Current perspectives. **Orthopedic Research and Reviews**, v. 14, p. 113–120, 2022.

SPISNI, E.; MANICA, F.; TOMASI, V. Involvement of prostanoids in the regulation of angiogenesis by polypeptide growth factors. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 47, n. 2, p. 111-115, 1992. DOI: 10.1016/0952-3278(92)90146-a.

TAPIERO, H. et al. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 4, p. 200-207, jun. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00178-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00178-6).

THEDA, C. et al. Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. **Scientific Reports**, v. 8, p. 6944, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25311-0>.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit**. Sept. 2011. Disponível em: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_041053.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041053.pdf). Acesso em: 5 jan. 2020.

THOMPSON, I. O. C. et al. A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. **Archives of Oral Biology**, v. 46, n. 12, p. 1091-1098, dez. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(01\)00082-6](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(01)00082-6).

TRUMPP, M. et al. Characterization of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva relevant Acvr1/Acvr2 Activin receptors in medaka (*Oryzias latipes*). **PloS One**, v. 18, n. 9, p. e0291379, 2023.

VALER, J. A. et al. ACVR1 function in health and disease. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1366, 2019. DOI: 10.3390/cells8111366.

VINCENT, S., MARTY, L., FORT, P. S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. **Nucleic Acids Res.** 1993 v.

21,n. 6, p. 1498. DOI: 10.1093/nar/21.6.1498.

WANG, H. et al. Cellular Hypoxia Promotes Heterotopic Ossification by Amplifying BMP Signaling. **J Bone Miner Res**, v. 31, n. 9, p. 1652-65, set. 2016. DOI: 10.1002/jbmr.2848.

WOLKEN, Alessi D. M. et al. The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Bone**, v. 109, p. 210-217, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.06.011>.

ZUBAKOV, D. et al. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. **International Journal of Legal Medicine**, v. 122, p. 135-142, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0182-6>.

## ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome do

voluntário: \_\_\_\_\_ Dat

a de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos R.G \_\_\_\_\_

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa “ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOISDO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, PROPRANOLOL E HESPERIDINA”.

A pesquisa é coordenada por Durval Batista Palhares, pesquisador da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que pode ser contatado pelo telefone (67) 99982- 1927, e-mail: [dbpalhares@hotmail.com](mailto:dbpalhares@hotmail.com), ou no endereço profissional: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Av. Senador Filinto Muller, 355, Vila Ipiranga, Campo Grande/MS.

Esta pesquisa foi previamente avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS que em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, pode ser contatada pelo telefone (67) 3345-7187, pelo e-mail: [cepconepp@ufms.br](mailto:cepconepp@ufms.br), ou diretamente no campus da UFMS, localizado na Av. Costa e Silva, s/n – Prédio das Pró-Reitorias, 1º andar. O objetivo desta pesquisa é investigar os efeitos do tratamento da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), com um medicamento composto por ácido ascórbico e propranolol (patenteado como FOPCON). Nossa hipótese é de que o uso contínuo de FOPCON pode reduzir a ocorrência dos surtos inflamatórios e a formação de osso heterotópico. Queremos, também, saber se esse efeito pode ser melhorado com o uso adicional de Hesperidina. Assim, estudaremos dois grupos de tratamento: (1) FOPCON e (2) FOPCON e ácido ascórbico junto com Hesperidina. Ao concordar em participar da pesquisa, após avaliação clínica pelo pesquisador e sua equipe, dependendo do grupo que você participar, será prescrita pelo médico a dose da medicação conforme sua idade e seu peso, que será disponibilizada gratuitamente e ajustada sempre que necessário. Caso você já receba FOPCON, o mesmo será mantido.

A sua participação nesta pesquisa conta com sua doação de pequenas amostras de sangue e de raspado da parte interna da bochecha (mucosa oral), antes e durante o tratamento. Essas amostras serão estocadas no Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS, conforme a Resolução nº

240, de 18 de setembro de 2017, que rege as Normas Reguladoras para o armazenamento e uso de material biológico humano da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os materiais coletados serão utilizados exclusivamente nos estudos desenvolvidos dentro deste projeto.

A coleta de sangue pode trazer desconforto momentâneo com dor leve e possível surgimento de hematoma no local da coleta. Para acompanhamento da evolução clínica, poderá ser necessário o registro de imagens fotográficas e/ou de vídeo. Normalmente, a associação do ácido ascórbico e do propranolol (FOPCON) não apresenta efeitos colaterais quando administrada em doses adequadas.

Entretanto, ao surgimento de sintomas como: bradicardia, hipotensão, irritação gástrica ou outro sintoma indesejado, relacionado ao uso de FOPCON, o pesquisador responsável deverá ser contatado imediatamente, para que sejam tomadas as devidas providências. A Hesperidina é um composto de origem natural e habitualmente não apresentam efeitos colaterais. Mas ao surgimento de qualquer desconforto, tais como falta de apetite, emagrecimento, diarreia, dor de cabeça, dor no estômago ou abdominal, o pesquisador responsável deve ser imediatamente comunicado. Ressaltamos que o uso da Hesperidina é contraindicado no período de gestação e lactação. Havendo necessidade de despesas financeiras por parte do participante em relação à medicação oferecida ou coleta das amostras, elas serão ressarcidas pelo pesquisador, mediante comprovação da despesa. Da mesma forma, eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa serão devidamente indenizados. Para sua segurança e fidelidade dos resultados, é importante que você não inicie outros medicamentos para tratamento da FOP sem o conhecimento do pesquisador responsável. A fim de beneficiar o tratamento de outros pacientes, pretendemos publicar em revistas científicas os resultados e novos conhecimentos obtidos ao longo da pesquisa, mas garantimos total sigilo de suas informações pessoais, bem como do seu rosto, caso a divulgação de imagens seja necessária. Você tem total liberdade para recusar participar deste projeto de pesquisa, agora ou em qualquer momento durante seu desenvolvimento. Este termo será preenchido e assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador principal e outra com você.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, declaro ter sido informado(a) e esclarecido(a), e concordo voluntariamente com a participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande, MS, \_\_\_ de \_\_\_ de \_\_\_\_.

---

Assinatura do participante

---

Assinatura do pesquisador responsável

---

Assinatura da testemunha

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante



**ANEXO B - Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (TALE)**

## Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (TALE)

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos R.G nº \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA, ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO,

PROPRANOLOL E HESPERIDINA”. Isso quer dizer que nós queremos saber se as dores e o osso formado por causa da FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA (FOP), podem diminuir se você tomar um remédio específico todos os dias.

Para estudarmos os efeitos do remédio, vamos precisar coletar um pouco do seu sangue algumas vezes durante a pesquisa. Essas amostras de sangue ficarão guardadas no nosso laboratório (Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS), obedecendo as regras de nossa universidade (Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017).

A coleta do sangue pode doer um pouco, por isso será feita com bastante cuidado. Nós também vamos precisar de fotos e filmagem, para podermos identificar se houve alguma melhora ou piora dos movimentos que você consegue fazer hoje, e depois do uso do remédio.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, mas se você quiser participar, seus pais ou responsáveis também precisam concordar com isso. Além disso, vocês podem desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem problema nenhum.

Se você e seus pais (ou responsáveis) aceitarem participar da pesquisa, você será avaliado por um médico e vai receber de graça um remédio para tomar todos os dias. Nós vamos estudar três grupos. Dependendo do grupo que você participar, você vai receber só o FOPCON (um remédio formado por ácido ascórbico junto com propranolol), ou FOPCON e ácido ascórbico junto com Hesperidina.

Normalmente, quando indicado por um médico, esses remédios não apresentam efeitos colaterais. Isso quer dizer que eles não vão fazer mal para você. Mas, se tomando FOPCON você sentir dores na barriga, enjoo, ou alguma sensação ruim e diferente depois de começar a usar o

remédio, você precisa avisar seus pais e eles poderão procurar o pesquisador Durval Batista Palhares, pelo telefone (67) 99982-1927, para que ele e sua equipe cuidem de você.

A Hesperidina é uma substância natural, tirada da casca de algumas frutas. Pode dar diarreia, dor de cabeça e dor de barriga. Se isso acontecer, você também precisa avisar os seus pais.

Se você ou seus pais (ou responsáveis) tiverem alguma dúvida sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo telefone (67) 3345-7187. Esse comitê já conhece o nosso projeto de pesquisa e autorizou a sua realização.

Os resultados da pesquisa vão ser publicados em revistas científicas, mas não vamos colocar seu nome e se usarmos uma foto sua não vamos mostrar o seu rosto. Assim, ninguém saberá que você participou da pesquisa, se você não quiser.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento, li junto com o pesquisador e com meus pais (ou responsáveis) e concordo em participar da pesquisa.

Campo Grande, MS, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

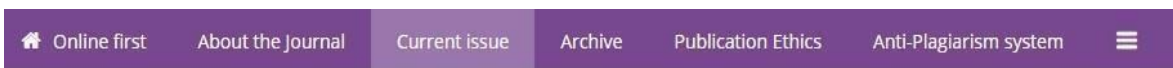
\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

## ANEXO C - Artigo publicado em Periódico B1



Journal of Pre-Clinical  
and Clinical Research

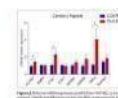
### Current issue

2/2024 vol. 18



RESEARCH PAPER

#### Buccal epithelial cells as non-invasive biological material for fibrodysplasia ossificans progressiva gene expression studies



Ana Ligia Barbosa Messias, Suzana Lopes Bomfim Balaniuc, Lorena Falcão Lima, Deborah Ribeiro Nascimento, Marilene Garcia Palhares, Fabiana Alves, Helen Lima Del Puerto, Jose Mauro Goulart Brum, Durval Batista Palhares, Almir Sousa Martins

J Pre Clin Clin Res. 2024;18(2):89-94

DOI: <https://doi.org/10.26444/jpccr/188214>

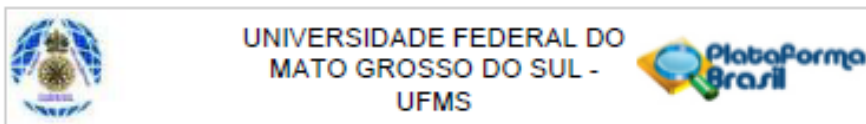
Abstract

Article (PDF)

Stats

RESEARCH PAPER

## ANEXO D - Parecer de aprovação do projeto do Comitê de Ética UFMS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, PROPRANOLOL, HESPERIDINA E

**Pesquisador:** Durval Batista Palhares

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 40606820.5.0000.0021

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

**Patrocinador Principal:** INSTITUTO DE ASSISTENCIA E PESQUISA EM EDUCACAO E SAUDE - IAPES

#### DADOS DO PARECER

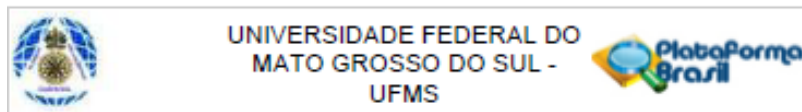
**Número do Parecer:** 4.763.072

#### Apresentação do Projeto:

A Fibrodissiplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença genética rara, caracterizada por grave ossificação heterotópica. Sem tratamento curativo, importa ampliar o conhecimento de aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares relacionados aos efeitos do ácido ascórbico associado ao propranolol (FOPCON), sobre vias de sinalização possivelmente envolvidas na fisiopatologia da doença. A fim de potencializar tais efeitos, propõe-se a análise adicional dos efeitos da hesperidina e da epigallocatequina, quando administrados entre as doses habituais de FOPCON, na forma de novos compostos: ácido ascórbico + hesperidina (AA+HSP) e ácido ascórbico + epigallocatequina (AA+Epl). A pesquisa será desenvolvida com 4 grupos de indivíduos: Grupo 1: indivíduos saudáveis (n=8); Grupo 2: indivíduos portadores de FOP em tratamento com FOPCON (n=8); Grupo 3: indivíduos portadores de FOP em tratamento com FOPCON e AA+HSP (n=8); Grupo 4: indivíduos portadores de FOP em tratamento com FOPCON e AA+Epl (n=8). Os aspectos clínicos serão observados e registrados por meio de questionário e exames físico e laboratorial. Aspectos bioquímicos e moleculares relacionados à inflamação, fibrose e ossificação, serão analisados em laboratório, em modelos in vivo e in vitro, a partir de amostras individuais de sangue e de raspado de mucosa oral. Para análise estatística dos resultados será utilizado o método CT comparativo e aplicados Teste t-Student não pareado e ANOVA (p<0,05). Este projeto, além de incrementar a história natural da FOP e o entendimento de sua fisiopatologia, explicará

**Endereço:** Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros - Prédio das Pró-Reitorias - Hércules Meymonet, 1º andar  
**Bairro:** Pioneiros **CEP:** 70.070-900  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br

## ANEXO E - Parecer de aprovação do projeto do Comitê de Ética UFMS



Continuação do Parecer: 4.763.072

Biobanco	SEIUFMSBIORREPOSITORIO.pdf	07/04/2021 05:56:58	Durval Batista Palhares	Aceito
Outros	ParecerComissaoSetorialdepesquisa.pdf	03/03/2021 16:00:02	Durval Batista Palhares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	03/03/2021 15:54:45	Durval Batista Palhares	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ResolucaoUFMSBiobancosBiorrepositorios.pdf	03/03/2021 15:52:45	Durval Batista Palhares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	03/03/2021 15:44:11	Durval Batista Palhares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel_legal.pdf	03/03/2021 15:44:04	Durval Batista Palhares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_1.pdf	03/03/2021 15:43:48	Durval Batista Palhares	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	01/12/2020 10:46:18	Durval Batista Palhares	Aceito
Outros	SEI_UFMS_2269287_Parecer.pdf	01/12/2020 10:44:33	Durval Batista Palhares	Aceito
Outros	Res_CF_182_2020_Manifesta_favoravel_ao_Projeto_de_Pesquisa_FOP__Durval_Palhares_1.pdf	01/12/2020 10:38:27	Durval Batista Palhares	Aceito
Declaração do Patrocinador	TERMO_RESPONSABILIDADE_ORCAMENTARIA.png	16/11/2020 14:01:04	Durval Batista Palhares	Aceito

**Situação do Parecer:**


Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros - Prédio das Pró-Reitorias - Hércules Maymone - 1º andar  
 Bairro: Pioneiros CEP: 70.070-900  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: cepconep.prop@ufms.br

## ANEXO F – Certificado de Análise Hesperidina

CERTIFICADO DE ANÁLISE	
INFORMAÇÕES DO PRODUTO	
Produto...: HESPERIDINA	Código...: 044500.000500
Origem...: CHINA	Procedência...: BRASIL
Lote Interno...: PURI016485	Lote do Fabricante...: SHM20210105
Fabricação : 17/01/2021	Validade : 16/01/2025
Peso Molecular : 610.57	Formula Molecular : C28H34O15
DCB : 04619	CAS : 520-26-3
Categoria Terapeutica : BIOFLAVONOIDES	Parte Utilizada : Não Aplicável
Nome Científico : Não Aplicável	Familia : Não Aplicável
Ordem de Produção : 01648501001	Data de Análise : 03/09/2021
Data de Emissão : 16/12/2021	Nota Fiscal : 000253594
REFERÊNCIAS / OBSERVAÇÕES	
METANOL: ( MAXIMO 300 PPM ) = 113 PPM. OBS. 3: SUBTANCIAS RELATADAS: DIDYMIN ( MAXIMO 2,80% ) = 2,103%. OBS. 4: MERCURIO, CHUMBO, CADMIO, SOLVENTE RESIDUAL TRANSCRITO DO LAUDO DE ANALISE DO FABRICANTE (DESENVOLVIMENTO LOCAL). OBS. 5: FATOR DE CORRECAO: 0,9760. CONSERVACAO: CONSERVAR DE 15 A 30°C EM LOCAL SECO E PROTEGIDO DA LUZ.	
RESULTADO FINAL	
<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
SERVIÇO DE ATENDIMENTO GEMINI	
Email : <a href="mailto:sacgo@purifarma.com.br">sacgo@purifarma.com.br</a> - 0800-77-15008	
 <b>Dra. Luciana Pereira</b> <b>Farm. Resp. CRF-GO 2400</b>	
<small>REFERÊNCIAS / OBSERVAÇÕES</small> <small>ESTE É UM DOCUMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE GEMINI</small>	
<small>INDUSTRIA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS LTDA</small>	
<a href="http://www.purifarma.com.br">www.purifarma.com.br</a>	
<b>Matriz - Goiás</b> Via Primária 4D, Qd 08A, Módulo I e II, D.A.I.A Anápolis / GO / Brasil - CEP 75132-105 Fone 55 62 3701-5450	<b>Filial - São Bernardo do Campo</b> Rua Faustino Negrí, 285 Galpao 05 - Cooperativa SBC / SP / BRASIL - CEP 09851-720 Fone 55 11 2067-5600
	<b>Filial - São Paulo</b> Rua Coronel Cabrita, 137 - Jd da Glória São Paulo / SP / Brasil - CEP 01545-030 Fone 55 11 2067-5600

## ANEXO G – Certificado de Análise Hesperidina



## CERTIFICADO DE ANÁLISE

## INFORMAÇÕES DO PRODUTO

Produto.: HESPERIDINA	Código.: 044500.000500
Origem.: CHINA	Procedência.: BRASIL
Lote Interno.: PURI016485	Lote do Fabricante.: SHM20210105
Fabricação : 17/01/2021	Validade : 16/01/2025
Peso Molecular : 610.57	Formula Molecular : C28H34O15
DCB : 04619	CAS : 520-26-3
Categoria Terapeutica : BIOFLAVONOIDES	Parte Utilizada : Não Aplicável
Nome Científico : Não Aplicável	Familia : Não Aplicável
Ordem de Produção : 01648501001	Data de Análise : 03/09/2021
Data de Emissão : 16/12/2021	Nota Fiscal : 000253594

## Análises

Ensaio	Especificação	Resultado
ABSORBANCIA	SOLUCAO EM NAOH 1 M: MAXIMO 0,30	0,0572
ARSENIO	MAXIMO 1 PPM	< 1 PPM
ASPECTO FISICO	PO BRANCO A AMARELO PALIDO	PO AMARELO PALIDO
CADMIO	MAXIMO 1 PPM	< 0,01 PPM
CHUMBO	MAXIMO 3 PPM	< 0,7 PPM
CONTAGEM TOTAL MICRO-ORGANISMOS VIAVEIS	MAXIMO 1000 UFC/G	< 10 UFC / G
CONTAGEM TOTAL DE FUNGOS E LEVEDURAS	MAXIMO 100 UFC/G	< 10 UFC / G
ESCHERICHIA COLI	AUSENTE	AUSENTE
SALMONELLA	AUSENTE	AUSENTE
IDENTIFICACAO - IR	I.R. - O ESPECTRO DA AMOSTRA CORRESPONDE AO DO PADRAO	DE ACORDO
IDENTIFICACAO - HPLC	O TEMPO DE RETENCAO DO PICO PRINCIPAL DA SOLUCAO AMOSTRA, CORRESPONDE AO DA SOLUCAO PADRAO NO TESTE DE DOSEAMENTO	DE ACORDO
MERCURIO	MAXIMO 0,1 PPM	0,05 PPM
SOLUBILIDADE	PRATICAMENTE INSOLUVEL EM AGUA, SOLUVEL EM DIMETIL SULFOXIDO, DISSOLVE EM DILUENTES DE SOLUCOES DE HIDROXIDO ALCALINAS.	DE ACORDO
SUBSTANCIAS RELATADAS	CUMPRE TESTE	DE ACORDO
SUBSTANCIAS RELATADAS	ISONARINGINE: MAXIMO 4,00%	< 4,0%
SUBSTANCIAS RELATADAS	HESPERETINE: MAXIMO 1,00%	0,183%
DOSEAMENTO	MINIMO 99,0% (LV)	102,46%
DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO	0,4300 G / ML
CINZAS SULFATADAS (%)	Max. 0,50	0,21
PERDA POR SECAGEM (%)	Max. 5,00	3,72

## REFERÊNCIAS / OBSERVAÇÕES

OBS. 1: RESULTADOS DE ACORDO COM ANÁLISES REALIZADOS NO LABORATORIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GEMINI (METODOLOGIA DO FABRICANTE).  
OBS. 2: SOLVENTE RESIDUAL:

Gemini Industria de Insumos Farmacêuticos Ltda

www.purifarma.com.br

## Matriz - Goias

Via Primaria 4D, Qd 08A, Modulo I e II, D.A.I.A  
Anapolis / GO / Brasil - CEP 75132-105  
Fone 55 62 3701-5450

## Filial - São Bernardo do Campo

Rua Faustino Negri, 285 Galpao 05 - Cooperativa  
SBC / SP / BRASIL - CEP 09851-720  
Fone 55 11 2067-5600

## Filial - São Paulo

Rua Coronel Cabrita, 137 - Jd da Gloria  
São Paulo / SP / Brasil - CEP 01545-030  
Fone 55 11 2067-5600



## ANEXO H - Normas Reguladoras para o Armazenamento e Uso de Material Biológico Humano

RESOLUÇÃO Nº 240, DE 18 DE SETEMBRO DE 2017.

*Estabelece as Normas Reguladoras para o Armazenamento e o Uso de Material Biológico Humano, no âmbito da UFMS.*

**O PRESIDENTE DO CONSELHO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO** da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, de acordo com a Resolução nº 441/11-CNS; a Portaria nº 2.201/2011, do Ministério da Saúde; a Resolução nº 292/99-CNS; a Resolução nº 466/2012-CNS; e considerando demais documentos contidos no Processo nº 23104.004929/2015-30, resolve, **ad referendum**:

Art. 1º Estabelecer as **Normas Reguladoras para o Armazenamento e Uso de Material Biológico Humano** da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

### CAPÍTULO I DAS DEFINIÇÕES E DA ABRANGÊNCIA

Art. 2º Estas Normas norteiam as ações para a elaboração de Protocolo de Desenvolvimento para o Armazenamento e Uso de Material Biológico Humano e dispõe sobre as regras pertinentes a essa finalidade, no âmbito da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Art. 3º Para fins destas Normas considera-se:

I - Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais;

II - Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais;

III - Material Biológico Humano: espécimes, amostras e alíquotas de material original e seus componentes fracionados;

IV - Informações Associadas: quaisquer informações relativas ao participante da pesquisa e seu material biológico, incorporadas ao registro no biobanco ou biorrepositório;

V - Projeto de Pesquisa: documento em que é descrita a pesquisa em seus aspectos fundamentais, incluindo informações relativas ao participante da pesquisa, detalhamento a respeito dos métodos que serão utilizados para a coleta e tratamento das amostras biológicas, qualificação dos pesquisadores e instâncias responsáveis;

VI - Protocolo de Desenvolvimento: documento no qual são definidos a constituição de biobancos e biorrepositórios, seus responsáveis e seus aspectos fundamentais, como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a ser utilizado, as informações relativas ao participante





e às amostras e as etapas de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte de material biológico humano;

VII - Participante da Pesquisa: aquele que, de forma esclarecida, livre e autônoma, consente em participar de pesquisas, atuais ou potenciais, envolvendo o armazenamento de seu material biológico em biobancos ou biorrepositórios;

VIII - Regimento Interno para Biobanco (RIB): documento que contempla as características, a finalidade, a estrutura organizacional e o modus operandi de cada biobanco, bem como a descrição dos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) que correspondem à sistematização das técnicas de coleta, processamento, armazenamento, disponibilização e descarte de materiais biológicos humanos;

IX - Termo de Responsabilidade Institucional (TRI): declaração institucional de responsabilidade técnica e financeira para constituição e manutenção do biobanco, integrante do Protocolo de Desenvolvimento;

X - Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB): documento devidamente aprovado pelo Sistema CEP/Conep quando da proposição do projeto de pesquisa, por meio do qual o pesquisador responsável recebe o material biológico humano armazenado com suas informações associadas, assumindo a responsabilidade pela sua guarda e utilização, pela garantia do respeito à pessoa e à confidencialidade e pelo fornecimento, ao biobanco, das informações obtidas em sua pesquisa; e

XI - Termo de Compromisso para o Uso de Material Biológico: documento em que o pesquisador se responsabiliza pelo uso e destinação de material biológico e informações associadas, resguardando a confidencialidade e o sigilo.

## **CAPÍTULO II**

### **DA ORGANIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA O ARMAZENAMENTO E USO DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO NA UFMS**

Art. 4º Os locais para o armazenamento e o uso de material biológico humano podem estar situados na UFMS em apenas uma ou em várias edificações, construídas ou adaptadas para este fim.

Art. 5º Os locais para o armazenamento e o uso de material biológico humano devem adotar um conjunto de práticas e dispor de equipamentos e instalações voltados à prevenção, minimização e/ou eliminação de riscos inerentes à saúde humana, às atividades de pesquisa e ao meio ambiente.

Art. 6º As pesquisas que utilizam materiais biológicos humanos devem prever o retorno dos benefícios ao indivíduo e à sociedade, delineados de forma clara e consubstanciada.

Art. 7º Os materiais biológicos humanos armazenados e as informações associadas a eles devem ser organizados na UFMS como:

- I - Biobanco; ou
- II - Biorrepositório.

Art. 8º São critérios primordiais do funcionamento de Biobancos e de Biorrepositórios:



- I - a qualidade, a segurança, a adequação técnica, a observância aos preceitos éticos, morais e jurídicos do material armazenado e das informações associadas; e
- II - o controle e a administração do material biológico e das informações associadas.

Art. 9º Todos os materiais biológicos humanos e informações associadas deverão ter garantida a preservação de privacidade, sigilo, segurança e integridade dos dados.

### Seção I Do Biobanco

Art. 10. A constituição e o credenciamento do Biobanco requerem a submissão prévia de um Protocolo de Desenvolvimento para análise do CEP/UFMS e, após aprovado nesta instância, à análise e parecer final da Conep.

Art. 11. O Protocolo de Desenvolvimento para constituição de Biobanco na UFMS deve conter a descrição das políticas de segurança para os sistemas de acesso às amostras armazenadas no Biobanco e as informações associadas, com níveis de permissão diferenciados e formas de evitar, por meio de processos de codificação e decodificação, a identificação do participante da pesquisa por pessoal não autorizado.

Art. 12. O Protocolo de Desenvolvimento deve conter a descrição das políticas de utilização racional do material biológico humano armazenado, a fim de garantir a preservação do acervo, privilegiar o seu uso social e científico e evitar o esgotamento desnecessário das amostras.

Art. 13. O Protocolo de Desenvolvimento deve conter os seguintes anexos:

- I - Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) aplicáveis ao material biológico humano armazenado;
- II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- III - Termo de Responsabilidade Institucional (TRI); e
- IV - Regimento Interno do Biobanco (RIB).

Art. 14. O Biobanco deverá conter um sistema seguro de identificação, que garanta o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados dos participantes da pesquisa, para fornecimento de informações do interesse destes ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa.

Art. 15. Quando houver alteração da titularidade da responsabilidade pelo Biobanco, tal fato deve ser prontamente comunicado ao Sistema CEP/Conep.

Art. 16. O Biobanco está sujeito à inspeção sanitária pelos órgãos competentes.

### Seção II Do Biorrepositório



Art. 17. O Biorrepositório deve estar vinculado a um projeto de pesquisa específico, previamente aprovado pelo CEP/UFMS e, quando for caso, pela Conep.

Art. 18. Os responsáveis por Biorrepositório, instalados na UFMS, devem atender às determinações do Protocolo de Desenvolvimento para armazenamento e uso de material biológico.

Art. 19. O período de armazenamento dos materiais biológicos, e das informações vinculadas ao projeto, será definido da seguinte forma:

- I - No projeto de pesquisa correspondente, observando o cronograma aprovado pelo CEP e, quando for o caso, pela Conep; e
- II - Nos POPs específicos.

Parágrafo único. Para uso compartilhado do material biológico armazenado e/ou informações associadas em Biorrepositório, o pesquisador deverá ter a expressa aprovação do responsável pelo Biorrepositório.

Art. 20. Todo e qualquer uso adicional de materiais biológicos humanos e informações associadas deverá ser objeto de uma emenda ao projeto original ou de um novo projeto de pesquisa igualmente submetido e aprovado pelo CEP e, quando for o caso, pela Conep.

### **CAPÍTULO III**

#### **DO PROCESSO DE CONSENTIMENTO INFORMADO E DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Art. 21. Todos os materiais biológicos humanos e informações associadas deverão ser obtidos com autorização dos participantes de pesquisa ou responsáveis legais, por meio de um processo de consentimento, que deverá ser pautado pelo princípio da responsabilidade e da confiança entre estes e o pesquisador contemplando as regras específicas destas Normas.

Art. 22. O consentimento referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano em Biobanco e Biorrepositório deverá ser formalizado por meio de TCLE.

§ 1º Tratando-se de amostras para Biobanco, o TCLE deve oferecer ao participante da pesquisa a possibilidade de optar por uma das seguintes situações, excludentes entre si:

- I - Manifestação expressa da necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e
- II - Manifestação expressa de dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

§ 2º Na opção prevista no inciso I o sujeito da pesquisa pode indicar, no TCLE, de forma expressa, as pessoas que podem consentir na utilização de seu material biológico humano armazenado, em caso de óbito ou condição incapacitante.

§ 3º Deve ser garantido gratuitamente, a qualquer tempo pelo pesquisador, acesso do participante da pesquisa aos resultados obtidos a partir do seu material biológico armazenado e às orientações quanto às suas implicações, incluindo o aconselhamento genético, quando aplicável.



Art. 23. O processo de consentimento informado, para a coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico identificado deve ser prévio à realização da coleta ou do processamento do material para a pesquisa e registro das informações associadas, e formalizado por meio de TCLE.

Art. 24. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa.

Art. 25. Quando fundamentada a impossibilidade de contato com o sujeito de pesquisa, deverá o pesquisador submeter o projeto ao CEP, a quem caberá julgar a pertinência da solicitação e emitir parecer sobre a utilização ou não do material biológico humano armazenado.

Art. 26. O processo de consentimento deve assegurar aos participantes de pesquisa, responsáveis ou representantes legais:

I - A livre manifestação da vontade para autorizar o armazenamento e o registro das informações associadas ao material biológico;

II - O acesso às justificativas, às informações pessoais, aos objetivos e aos procedimentos relativos à utilização do material biológico e informações associadas;

III - A informação sobre os riscos possíveis e os benefícios esperados da pesquisa;

IV - O direito de conhecer a identificação dos responsáveis, pessoa física ou jurídica, pela guarda do material biológico e informações associadas;

V - A liberdade de retirar o seu consentimento para a manutenção ou a utilização de seu material biológico armazenado e informações associadas, em Biobanco ou Biorrepositório, a qualquer tempo, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sem que isso importe qualquer prejuízo pessoal;

VI - A liberdade manifestada por escrito e assinada, de optar por não conhecer o resultado da pesquisa que possa estar relacionada ao material biológico cedido e/ou às informações associadas;

VII - A vontade, que deverá ser expressa por escrito e assinada no TCLE, de não ser novamente contatado para consentir sobre o uso do material biológico e/ou informações associadas, em caso de futuras e distintas pesquisas; e

VIII - O cadastramento das informações prestadas em sistema de informação seguro que possibilite a manutenção do sigilo e o contato posterior.

§ 1º No caso do estabelecido no inciso V, a retirada do consentimento será formalizada por manifestação expressa, assinada, do participante da pesquisa ou seu representante legal.

§ 2º Conforme estabelecido no inciso V, o material deverá ser descartado, nos moldes do Capítulo VII e as informações associadas ignoradas, salvo quando se tratar de amostras associadas também a procedimentos assistenciais.

§ 3º Quando se tratar de amostras armazenadas em biorrepositório, no caso do inciso VII, o participante da pesquisa sempre deverá ser contatado novamente para obtenção de novo TCLE.



Art. 27. No caso específico de informações genéticas relacionadas ao material biológico armazenado e/ou informações associadas, o processo de consentimento informado deve observar:

I - As informações genéticas não relacionadas com o objetivo da pesquisa, para a qual o material biológico foi coletado, não serão comunicadas ao participante, exceto nos casos em que haja tratamento disponível;

II - O participante da pesquisa deverá, por escrito, manifestar a não autorização para a divulgação personalizada de informação obtida com a pesquisa que possa ter implicações para outros indivíduos da família na atualidade ou em gerações futuras; e

III - No caso de o participante de pesquisa não manifestar por escrito a negativa mencionada no inciso II deste artigo, o pesquisador responsável poderá comunicar a outros indivíduos da família resultados que possam beneficiá-los ou aos seus descendentes.

Art. 28. São direitos do participante da pesquisa que devem obrigatoriamente constar do TCLE:

I - O acesso gratuito às informações associadas ao seu material biológico humano armazenado;

II - O acesso gratuito às informações obtidas a partir do seu material biológico humano utilizado;

III - O acesso gratuito às informações genéticas obtidas a partir do seu material biológico humano utilizado, inclusive aquelas que implicam riscos para doenças não preveníveis ou riscos familiares;

IV - O anonimato em quaisquer formas de divulgação das informações ou resultados associados ao material biológico humano utilizado;

V - A retirada do consentimento, a qualquer tempo;

VI - A designação das pessoas que poderão ter acesso à sua informação genética, em caso de óbito ou condição incapacitante; e

VII - O acesso às informações sobre as finalidades do armazenamento, incluindo seu responsável legal, os riscos e benefícios potenciais, as garantias de qualidade da conservação e integridade de seu material biológico, bem como as medidas para garantir a privacidade e a confidencialidade.

§ 1º A garantia do cumprimento do disposto nos incisos II, III e IV é atribuição do pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa.

§ 2º Tratando-se de Biobanco, cabe ao responsável pelo seu gerenciamento fornecer, ao pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa, a identificação do participante cuja amostra foi utilizada, nas situações previstas nos incisos II, III e IV.

Art. 29. A proteção dos direitos dos participantes da pesquisa, em particular a confidencialidade dos dados e a conservação adequada do Material Biológico Humano armazenado, cabe ao pesquisador responsável e à Instituição.



Parágrafo único. O participante da pesquisa deve ser comunicado sobre a perda, alteração ou destruição de suas amostras biológicas ou da decisão de interrupção da pesquisa, quando for o caso, como também sobre a dissolução ou transferência do Biorrepositório ou do Biobanco.

#### **CAPITULO IV**

### **DA COLETA, CONCESSÃO, GUARDA E UTILIZAÇÃO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS E DAS INFORMAÇÕES ASSOCIADAS**

Art. 30. Em todos os casos de coleta, concessão, guarda e utilização dos materiais biológicos e das informações associadas devem ser asseguradas a confidencialidade e a privacidade.

Art. 31. São consideradas situações que podem impossibilitar a obtenção prévia do consentimento informado, para a coleta de material biológico e informações associadas:

- I - Situações assistenciais de emergência;
- II - Situações inesperadas durante a realização de procedimentos diagnósticos e terapêuticos;
- III - Impossibilidade de contatar as pessoas para consentir, por estarem em lugar incerto e não sabido; e
- IV - Falecimento do interessado e nenhuma manifestação contrária deste em vida, expressa por escrito, ou de seus familiares, na seguinte ordem: cônjuge ou companheiro, descendentes maiores e capazes e ascendentes.

Art. 32. No caso de coleta e/ou o armazenamento do material biológico e informações associadas ter sido feito de forma identificada, porém sem o prévio consentimento dos participantes ou dos pacientes, o pesquisador deverá:

- I - Nos casos possíveis, obter o posterior consentimento dos participantes ou dos sujeitos;
- II - Mencionar e justificar a impossibilidade de obtenção do consentimento no projeto de pesquisa a ser submetido à avaliação do CEP; e
- III - Utilizar o material biológico e informações associadas somente após a aprovação do projeto pelo CEP.

Art. 33. Fica assegurado às autoridades de vigilância sanitária o acesso aos registros para fins de inspeção e investigação, nos casos previstos em lei e que possam colocar em risco a saúde pública. Igualmente, nestes casos, fica assegurada a confidencialidade das informações.

Art. 34. No caso da coleta realizada de material biológico e armazenado na Instituição sob conhecimento e anuência do CEP/UFMS, anteriormente a estas Normas, e de forma anônima e sem identificação, fica dispensado o processo de consentimento e respectivo TCLE para a sua utilização, desde que seja aprovada pelo CEP a anonimização.



§1º Nessas circunstâncias, o pesquisador responsável deverá ter a previsão de uso do material biológico e informações anonimizadas devidamente esclarecidas no projeto de pesquisa ou de desenvolvimento, o qual deverá ser consubstanciado por Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico.

§2º O Termo de Compromisso para Uso de Dados e Material Biológico deve ser assinado por todos os pesquisadores envolvidos na manipulação e uso do material biológico e informações associadas sem identificação, e constar como anexo do projeto.

Art. 35. As concessões devem ser gratuitas não podendo, em qualquer hipótese, ser remuneradas, cabendo apenas o ressarcimento eventual de gastos de transporte e alimentação relacionados aos procedimentos de coleta o qual, obrigatoriamente, deverá estar estabelecido e especificado no projeto de pesquisa, previamente aprovado pelo CEP.

Parágrafo único. No Termo de Consentimento, devem estar descritas as informações que serão obtidas e armazenadas.

Art. 36. A utilização comercial e o patenteamento de material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório são vedados nos termos da legislação vigente.

Art. 37. Os procedimentos de assistência à saúde têm preferência sobre a coleta e utilização de material biológico humano para fins de pesquisa, cabendo, neste caso, apenas a manipulação do material excedente.

§1º A coleta será realizada, sempre que possível, de forma conjunta com os procedimentos necessários para diagnóstico e tratamento, salvo quando se tratar de coleta prospectiva para fins de pesquisa aprovada previamente pelo CEP e, quando for o caso, pela Conep.

§2º Quando o material biológico não for procedente de atividades assistenciais, somente é cabível a coleta das partes renováveis integrantes do corpo humano.

§3º O material biológico humano deverá retornar ao setor competente da mesma instituição com vistas à utilização em atividades de assistência ou diagnóstico complementar, quando for o caso.

Art. 38. No caso de coleta de sangue, deverão ser adotados os procedimentos técnicos-científicos vigentes.

Art. 39. O acesso do pesquisador responsável às amostras armazenadas em Biobanco ou Biorrepositório na UFMS dar-se-á somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP ou pela Conep, quando for o caso.

## **CAPÍTULO V**

### **DO TRANSPORTE DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS E TRANSFERÊNCIA DAS**



## INFORMAÇÕES ASSOCIADAS, QUANDO FOR O CASO

Art. 40. O transporte de material biológico e a transferência de informações associadas poderão ser realizados internamente na UFMS e/ou para outras instituições de pesquisa, no âmbito regional, nacional e internacional, devendo atender:

I - Às exigências da lei e/ou de resoluções respectivas, se existentes, emitidas pelas autoridades competentes a cada situação, como a Resolução nº 20, RDC, de 10 de abril de 2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

II - Aos POPs estabelecidos ou, se inexistentes estes, aos POPs reconhecidos no estado da arte, especificamente relacionados ao material transferido;

III - Às exigências éticas e jurídicas relacionadas à transferência de informações associadas; e

IV - Ao Termo de Transferência de Material Biológico.

Parágrafo único. A transferência do material biológico humano armazenado entre Biobanco ou Biorrepositório, da própria ou de outra instituição, deverá ser comunicada ao participante da pesquisa, mediante novo contato com o participante da pesquisa; e, sempre que possível, ou na impossibilidade, deverá ser apresentada justificativa ao sistema CEP/Conep.

Art. 41. No caso de pesquisa com material biológico armazenado e informações associadas envolvendo mais de uma instituição, sejam regionais, nacionais ou estrangeiras, deverá haver um acordo prévio e formal de colaboração entre as instituições.

§1º Essas instituições poderão fazer uso comum do material biológico armazenado e suas informações, conforme estabelecido nos referidos acordos, incluindo o Termo de Transferência de Material Biológico e contemplando as formas de operacionalização e de utilização descritas nos respectivos POPs.

§2º Toda e qualquer utilização destes materiais deve estar prevista em projeto de pesquisa aprovado pelo CEP.

§3º O respectivo acordo deverá estabelecer, obrigatoriamente, regras relacionadas ao resguardo dos direitos do participante de pesquisa dos quais é obtida a amostra bem como dos direitos decorrentes dos resultados da pesquisa e sua exploração comercial.

Art. 42. Nos casos de utilização compartilhada do material biológico armazenado sem identificação, previstos em acordos institucionais, é necessária a obtenção de Termo Específico para Transferência deste material à instituição parceira, respeitando-se os procedimentos de transferência previstos nos respectivos POPs, nestas Normas e na lei.

Art. 43. Quando os materiais biológicos coletados na UFMS forem depositados em outras instituições para atividade de Biobanco, a UFMS deve ter uma participação formal e poder de decisão sobre o uso do material e de suas informações associadas, devendo o pesquisador responsável pelo projeto fazer constar no acordo interinstitucional que:





I - O material biológico armazenado e informações associadas deverão ser compartilhados igualmente entre as instituições signatárias do acordo, de modo que estes materiais biológicos e informações associadas não poderão ser considerados de uso exclusivo da instituição depositária;

II - O material biológico armazenado e informações associadas não poderão ser utilizados sem a ciência e concordância da instituição cedente; e

III - Os pesquisadores da UFMS terão o direito de acesso ao material biológico e suas informações para futuras pesquisas, cumpridas as formalidades previamente estabelecidas em Lei, nestas Normas e no acordo celebrado.

Art. 44. No caso de remessa de material biológico humano de Biorrepositório ou de Biobanco, para instituição sediada fora do território nacional, obedecer-se-á à Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde.

## **CAPÍTULO VI DO ARMAZENAMENTO E DO DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO E INFORMAÇÕES ASSOCIADAS.**

Art. 45. De acordo com os princípios éticos e jurídicos estabelecidos nesta Resolução, e em conformidade com os respectivos POPs de coleta e dos cronogramas dos projetos de pesquisa aprovados, fica estabelecido que o período de armazenamento do material biológico e das informações vinculadas será de até dez anos no âmbito da UFMS para Biorrepositório.

§1º Poderá haver renovação do período estabelecido no projeto por mais cinco anos mediante solicitação justificada do pesquisador responsável, acompanhada do relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material até esta etapa, e de acordo com um novo cronograma para o projeto de pesquisa submetido ao CEP Institucional.

§2º O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado.

Art. 46. O material biológico humano armazenado em Biorrepositório pode:

- I - Permanecer armazenado, se em conformidade com as normas pertinentes do CNS;
- II - Ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação dos CEPs e das instituições envolvidas; ou
- III - Ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

Art. 47. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição, deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados.



Art. 48. O descarte do material biológico humano armazenado pode ocorrer:

- I - Pela retirada do consentimento do participante;
- II - devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade;
- III - Por iniciativa da Instituição; ou
- IV - Pela dissolução do Biobanco.

Art. 49. Nas hipóteses previstas nos incisos III e IV do artigo anterior, são obrigatórias:

- I - A oferta formal do material biológico humano armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e
- II - A submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da Conep.

## **CAPÍTULO VII DA RESPONSABILIDADE**

Art. 50. O Biobanco localizado nas Unidades da Administração Setorial ficará sob a coordenação geral da Administração Central da Instituição, por meio da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação ou por delegação de competência, ouvida a Direção da respectiva Unidade da Administração Setorial.

Parágrafo único. Entende-se por coordenação geral, nestas Normas, as atividades de criação, planejamento, manutenção, avaliação e extinção do Biobanco.

Art. 51. Caberá à Direção da Unidade da Administração Setorial onde o Biobanco está localizado, compor as comissões responsáveis pelo desenvolvimento de atividades relacionadas à organização, manutenção e gerenciamento destes, ouvida a Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação.

Art. 52. As comissões de que trata o artigo anterior deverão ser compostas por três a cinco pesquisadores e um técnico-administrativo, lotados na respectiva Unidade, e deverão manter a Direção regularmente informada sobre a situação, por meio de termos de organização, manutenção e gerenciamento do respectivo Biobanco.

Art. 53. O gerenciamento dos Biorrepositório ficará a cargo dos coordenadores de projetos de pesquisa a eles associados.

Parágrafo único. A Direção da Unidade de Administração Setorial deverá ser formalmente comunicada pelo coordenador do projeto de pesquisa da existência do Biorrepositório, incluindo o nome do projeto a ele associado, bem como sua vigência.

Art. 54. As Comissões designadas para organização, manutenção e gerenciamento do Biobanco deverão elaborar um regulamento interno de funcionamento do Biobanco respeitando a legislação vigente e estas Normas.



Art. 55. Os pesquisadores responsáveis por projetos que utilizem materiais biológicos previamente armazenados, ou suas informações, deverão se comprometer, assim como toda a sua equipe de pesquisa, com o cumprimento de todas as normas, POPs e com acordos previamente estabelecidos.

Art. 56. Os procedimentos assistenciais que tenham a previsão de coleta ou armazenamento de material biológico e informações associadas para uso em pesquisa serão de responsabilidade do profissional de saúde envolvido com o projeto, salvo outras disposições constantes no projeto de pesquisa.

## **CAPÍTULO VIII DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS**

Art. 57. O Biobanco/Biorrepositório constituído na UFMS anteriormente a estas Normas deverá adequar-se ao nela disposto no prazo de um ano, contado a partir da data de sua publicação.

Parágrafo único. A observância das normas previstas nesta Resolução será objeto de análise e aprovação pelo Sistema CEP/Conep.

Art. 58. O Biobanco deverá estar credenciado no Sistema CEP/Conep e estará sujeito à inspeção sanitária pelos órgãos competentes.

Art. 59. A Instituição, por meio da Direção da Unidade da Administração Setorial e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, responsável pelo Biobanco, deverá encaminhar ao sistema CEP/Conep, a cada cinco anos, o relatório de atividades no qual conste o número de participantes incluídos no período e a relação de pesquisas que utilizaram material biológico.

Art. 60. Os POPs relativos aos Materiais Biológicos Humanos existentes e armazenados na UFMS deverão ser elaborados pelas Comissões responsáveis pelos Biobancos e aprovados pelo CEP no prazo máximo de doze meses após a entrada em vigência destas Normas.

Art. 61. Os casos omissos serão avaliados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pelas instâncias pertinentes da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Art. 62. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 63. Fica revogada a Resolução nº 193, de 9 de dezembro de 2015.

NALVO FRANCO DE ALMEIDA JUNIOR



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

