



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS FECAIS EM CRIANÇAS NA
PRIMEIRA INFÂNCIA SUBMETIDAS A EXTRESSE TÓXICO

NÍVIAN DE FREITAS ALBUQUERQUE

**FORTALEZA – CE
JUNHO – 2019**

NÍVIAN DE FREITAS ALBUQUERQUE

ANÁLISE DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS FECAIS EM CRIANÇAS NA
PRIMEIRA INFÂNCIA SUBMETIDAS A EXTRESSE TÓXICO

Monografia apresentada ao Curso de
Biotecnologia do Centro de Ciências,
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular da Universidade Federal do Ceará, do
curso de Bacharelado em Biotecnologia.

ORIENTADORA: PROFA. DRA.
DANIELLE MACÊDO GASPAR

FORTALEZA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A311a Albuquerque, Nívian de Freitas.
Análise de Biomarcadores Inflamatórios fecais em crianças na Primeira Infância submetidas a Estresse Tóxico. / Nívian de Freitas Albuquerque. – 2019.
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. ACE. 2. Doença Inflamatória Intestinal. 3. Biomarcadores fecais. I. Título.

CDD 661

NÍVIAN DE FREITAS ALBUQUERQUE

ANÁLISE DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS FECAIS EM CRIANÇAS NA
PRIMEIRA INFÂNCIA SUBMETIDAS A EXTRESSE TÓXICO

Monografia apresentada ao curso de
Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. ^a Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora-UFC)
Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)

Prof. Dra. Kyria Santiago Do Nascimento (Coorientadora-UFC)
Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (DBBM)

Me. João Vicente Menescal (IPREDE)
Coordenador Técnico Científico do Canal Pi

À DEUS. A minha família, ao
meu companheiro, amigos de
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, à **Deus**, por me dotar de capacidade para puder traçar o meu caminho, com muita saúde e com uma família capaz de me apoiar nas minhas escolhas.

Ao **IPREDE**, por me fornecer o tempo, trabalho e crescimento diário nessa jornada.

À **Universidade Federal do Ceará**, por me possibilitar estudar em uma das melhores instituições de ensino superior gratuitamente e por creditar a minha formação

A professora **Dra. Danielle Macêdo**, por se interessar pela minha formação e disponibilizar seus conhecimentos para trabalhar junto comigo nessa campo da sociedade ainda tão carente de pesquisa.

A minha querida e admirável Professora Dra. **Kyria Santiago**, sempre muito amável e fonte de inspiração para aqueles que desejam se diferenciar na sua carreira.

Ao Dr. **João Vicente Menescal**, por sempre colaborar avidamente a minha pesquisa e por ser tão competente com o trabalho as mães do Iprede.

As **Mães e crianças do IPREDE**, que é o motivo do nosso trabalho diário, pelo qual precisamos melhorar a cada dia.

Aos meus queridos **colegas de turma** que foram excepcionais nessa longa jornada, desenvolvendo sempre a empatia e agonias do semestre, em especial a **Nathalia , livia , Dhel e Ana Júlia** que sempre foram muito vibrantes e confidentes.

Ao sempre disponível e amável, posso dizer amigo, **Gilmar** o secretario querido do curso de biotecnologia, aonde todos nos alunos recorreremos!!!

As minhas companheiras de trabalho **Nilvânia e Tatiana**, aonde eu não poderia seguir sem o companheirismo, confiança, empatia, certamente um casamento perfeito.

A minha **Família** linda, a minha **Mãe** que sempre esteve junto comigo e sempre presente de forma muito especial e atenciosa.

Ao meu **pai** (in memoria), por investir e desejar tornar suas filhas formadas.

Ao **Tadeu** meu marido, por suportar meu choro e dias sem dormir e **PACIÊNCIA**, que teve comigo.

As minhas **irmãs, primas e tias** sempre muito presente e ansiosas com essa formação.

Ao meu Chefe, Sogro, Mestre, Prof. **Sullivan Mota** que sempre foi fonte de inspiração de ser humano, competência e por empregar **AMOR** em tudo que faz.

A minha **SOGRA Sonia**, que sempre fez muita torcida a cada semestre conquistado.

Aos colegas que conheci no laboratório e que sem eles dificilmente eu teria as minhas análises, **Júlia, Venúcia, Giovanna, Michelle, Jaqueline, Stefânio.**

“Trabalha constantemente. Edifica sempre. Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração. Não te impressiones nas dificuldades. Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia. Não desistas da paciência. Não creias em realizações sem esforço ..”
Emmanuel- Chico Xavier

RESUMO

O estresse tóxico (da sigla em inglês *adverse childhood experience* – ACE) pode ocorrer quando a criança experimenta adversidades fortes, frequentes e / ou prolongadas - como abuso físico ou emocional, negligência crônica, abuso de substâncias por parte do cuidador ou doença mental, exposição à violência e / ou os ônus acumulados das dificuldades econômicas da família - sem apoio adequado de adultos. Esse tipo de ativação prolongada dos sistemas de resposta ao estresse pode interromper o desenvolvimento da arquitetura cerebral e de outros sistemas orgânicos e aumentar o risco de doenças relacionadas ao estresse e comprometimento cognitivo, até os anos adultos, bem como tantas outras doenças de carácter físico. Vale destacar que essas crianças geralmente apresentam doenças relacionadas a problemas do trato gastrointestinal. Essas doenças inflamatório-intestinais (DII), incluindo colite ulcerosa e doença de Crohn, são distúrbios inflamatórios crônicos do trato gastrointestinal com frequência são diagnosticados na adolescência e na idade adulta jovem, com uma incidência crescente situações pediátricas. Marcadores sorológicos e fecais, já presentes na prática clínica, conseguem fornecer ferramentas quantitativas e reprodutíveis que complementam a avaliação clínica de forma a auxiliar no diagnóstico e gestão das DII. Os biomarcadores fecais têm sido estudados pela sua capacidade de identificação em pacientes com DII, monitoração da atividade da doença e na previsão de recorrência. Assim, a descoberta desses novos biomarcadores e o seu uso em combinação com os que atualmente estão disponíveis na prática clínica poderá melhorar significativamente a avaliação dos pacientes com DII, bem como a sua descoberta em idades precoces pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de prevenção. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou analisar parâmetros inflamatórios intestinais como a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e nitrito através de técnicas espectrofotométricas nas fezes de crianças submetidas a 0-2 ACES e a mais de 4 ACES atendidas no Instituto da Primeira Infância (IPREDE) localizado no município de Fortaleza-CE. Para o estudo foram recrutadas 11 crianças, 4 delas submetidas a 0-2 ACES e 7 submetidas a mais de 4 ACES. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis destes marcadores de processo oxidativo-inflamatório. Importante limitações do presente estudo foram o baixo tamanho amostral principalmente no grupo 0-2 ACES e a dosagem de apenas dois marcadores. Portanto, apesar do presente estudo não ter observado diferenças significativas nos níveis de nitrito e MPO nas fezes de crianças expostas a 0-2 ou mais de 4 ACES, novos estudos com o número maior de pacientes devem ser desenhados.

Palavras-chave: ACE, Doença Inflamatória Intestinal, biomarcadores fecais.

ABSTRACT

Toxic stress (ACE) can occur when your child experiences severe, frequent and / or prolonged adversity - such as physical or emotional abuse, chronic neglect, caregiver substance abuse or mental illness, exposure the violence and / or the accumulated burden of the family's economic difficulties - without adequate adult support. This type of prolonged activation of stress response systems can disrupt the development of brain architecture and other organ systems and increase the risk of stress-related illnesses and cognitive impairment to adulthood, as well as many other physical illnesses. It is worth noting that these children often have diseases related to gastrointestinal tract problems. These inflammatory bowel diseases (IBD), including ulcerative colitis and Crohn's disease, are chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract that are often diagnosed in adolescence and young adulthood, with an increasing incidence in pediatric situations. Serological and fecal markers, already present in clinical practice, can provide quantitative and reproducible tools that complement clinical assessment to assist in the diagnosis and management of IBD. Fecal biomarkers have been studied for their ability to identify patients with IBD, monitor disease activity and predict recurrence. Thus, the discovery of these new biomarkers and their use in combination with those currently available in clinical practice could significantly improve the assessment of patients with IBD, as well as their discovery at an early age may assist in the development of prevention strategies. In this context, the present study aimed to analyze inflammatory bowel parameters such as myeloperoxidase (MPO) and nitrite activity through spectrophotometric techniques in the feces of children submitted to 0-2 ACES and more than 4 ACES attended at the Institute of Early Childhood (IPREDE) located in the municipality of Fortaleza-CE. For the study 11 children were recruited, 4 of them submitted to 0-2 ACES and 7 submitted to more than 4 ACES. No significant differences were observed between the levels of these oxidative-inflammatory process markers. An important limitation of the present study was the small sample size mainly in the 0-2 ACES group. Therefore, although the present study did not observe significant differences in nitrite and MPO levels in the feces of children exposed to 0-2 or more than 4 ACES, further studies with larger numbers of patients should be designed.

Key words: ACE, Inflammatory Bowel Disease, fecal biomarkers.

LISTA DE SIGLAS

IPREDE- Instituto da primeira infância
ACE- Escala de Experiências Adversas da Infância
NPDM- Núcleo de Pesquisa Departamento Médico
DII- Doenças inflamatórias intestinais
DC- Doença de Crohn
MPO- mieloperoxidase
NO- Oxido Nítrico

LISTA DE SÍMBOLOS

μ Mi
 λ lambda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de crianças e quantidades de ACEs.	27
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Escala de experiências adversas-traumas da infância.....	19
Figura 2- Escala dos ACEs.....	20
Figura 3- Ação da mieloperoxidase sobre o peróxido de hidrogênio.....	23
Figura 4 – mecanismo do nitrito, sulfanilamida e a reação de NED.....	30
Figura 5 – concentração de nitrito (nM) por mg de fezes determinada pelo teste de nitrito obtido do Test T de student não pareado no programa GRAPHPAD PRISM, versão 6.0.....	33
Figura 6 – atividade da MPO determinada no Test T de student não pareado no programa GRAPHPAD PRISM, versão 6.0.	34

SUMÁRIO

SUMÁRIO	15
1.INTRODUÇÃO	17
1.1 Escala de Experiências Adversas da Infância (ACE).....	19
1.2 Local do estudo- IPREDE.....	27
1.3 Análise instrumental pelo método de espectrofotometria..	Erro! Indicador não definido.
1.4 Interação da luz com a matéria	Erro! Indicador não definido.
1.5 Mieloperoxidase	21
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1 Pacientes	27
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	28
3.3 Aspectos éticos	28
3.4 Coleta e tratamento das amostras fecal.....	28
3.5 Testes laboratoriais	29
3.5.1 Reagente GRIESS:	29
3.5.1.1 <i>Acido Fosfórico 5%:</i>	29
3.5.1.2 <i>Sulfonilamide 1% em acido fosfórico 5%</i> <i>(p-Aminobenzenesulfonamide- Sigma S 9251):</i>	29
3.5.1.3 <i>NEED 0,1% - C₁₀H₁₄N₂·2HCL (N-(1-Naphtyl)-ethylenediamine</i> <i>dihydrochoride):</i>	29
3.5.2 <i>tampão de fosfato:</i>	29
3.5.3 <i>tampão HTAB (brometo de cetil trimetil amônio)</i>	30
3.5.4 <i>Tampão fosfato de potássio</i>	30

<i>3.6 Determinação da produção de Nitrito na amostra fecal</i>	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
<i>4.1 Avaliação de nitrito em análise fecal</i>	32
<i>4.2 Avaliação da ação do MPO no tempo de 3 minutos</i>	33
5. CONCLUSÃO	35
6. PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A- ROTEIRO DE QUESTIONARIO CYW SOBRE EXPERIÊNCIAS ADVERSAS NA INFÂNCIA (Q-EAI) CRIANÇA	39
ANEXO B- TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DA PESQUISA	41
ANEXO C- PARECER CONSUBSTANCIADO	39

1. INTRODUÇÃO

Crianças submetidas a estresse tóxico que pode ser em ambientes pobres ou não, desenvolvem frequentemente problemas no cognitivo ou até mesmo no comportamental, como também doença cardíaca (Dong, Giles, et al., 2004), doença hepática (Dong, Dube, Giles, Felitti, & Anda, 2004), abuso de substâncias (Dube et al., 2004), depressão (Edwards, Holden, Felitti, & Anda, 2003) e suicídio (Dube et al., 2001), e por meio da Escala de Experiências Adversas na Infância (ACE) é possível a análise do estresse tóxico.

Estresse tóxico é uma resposta tóxica ao estresse que pode ocorrer quando uma criança vivencia uma dificuldade forte, de forma frequente e prolongada, sem apoio adequado de um adulto. Podem ser classificados como exemplos de estresse tóxico: negligência, abuso físico ou emocional, exposição à violência, vício em drogas, problemas mentais ou uma elevada carga de pobreza sendo a escala atual composta por 10 itens. Assim, crianças submetidas a esses tipos de estresse tóxicos são atendidas com frequência no ambulatório do Instituto da Primeira Infância (IPREDE). Vale destacar que estas crianças também apresentam maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças relacionadas a problemas do trato gastrointestinal (MENESCAL, 2018).

As doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo colite ulcerosa e doença de Crohn (DC), são distúrbios inflamatórios crônicos do trato gastrointestinal mais frequentemente diagnosticados na adolescência e na idade adulta jovem, com uma incidência crescente em populações pediátricas. Esses distúrbios são bastante comuns em crianças, de modo que a maioria dos pediatras e outros clínicos pediátricos diagnóstica crianças com DII em sua prática geral. A doença inflamatória intestinal é causada por uma resposta imune da mucosa desregulada à microflora intestinal em hospedeiros geneticamente predispostos. Embora as crianças possam apresentar os sintomas clássicos de perda de peso, dor abdominal e diarreia com sangue, muitas apresentam sintomas não clássicos de baixo crescimento isolado, anemia ou outras manifestações extra-intestinais (GUERRANT et al, 2016).

Uma vez diagnosticado o DII, os objetivos da terapia consistem em eliminar os sintomas, normalizar a qualidade de vida, restaurar o crescimento e prevenir complicações, minimizando os efeitos adversos dos medicamentos. Considerações únicas ao tratar crianças e adolescentes com DII incluem atenção aos efeitos da doença no crescimento e desenvolvimento, saúde óssea e funcionamento psicossocial. A colite ativa (colite ocorre quando há inflamação do intestino grosso (cólon), a doença pode ser tanto aguda quanto crônica, dependendo de sua gravidade, em pacientes com doença inflamatória intestinal está

associada à vasodilatação da mucosa, permeabilidade intestinal aumentada e motilidade colônica anormal (GUERRANT, et al., 2016).

Na tentativa de ultrapassar limitações no diagnóstico da doença, mas também a ideia da possível existência de testes simples, rápidos, não-invasivos e de baixo custo monetário com semelhante ou melhor capacidade diagnóstica, de previsão do curso da doença e sua monitorização, e capaz de permitir a adoção de estratégias terapêuticas individualizadas dirigiu o foco de atenção da comunidade científica para os biomarcadores (ISKANDAR N & CIORBA M.A. 2012).

Por biomarcador entende-se qualquer substância passível de ser medida biologicamente e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (ISKANDAR N & CIORBA M.A. 2012).

Contudo, o biomarcador ideal para a DII não existe e é provável que o recurso ao estudo de painéis de vários biomarcadores em simultâneo, ao invés do estudo isolado, seja mais vantajoso e preciso, algo que se tornou num recente foco de investigação.

De fato, dado todo o potencial benéfico associado ao uso destes instrumentos, tem-se verificado uma intensa e profícua investigação neste tópico, não apenas na verificação da aplicabilidade dos marcadores existentes nos vários domínios da prática clínica, mas também no desenvolvimento de novos biomarcadores através dos avanços tecnológicos em estudos imunológicos, metabólicos, proteômicos e de expressão genética.

Nessa perspectiva de associar o diagnóstico de crianças submetidas a estresse toxico ainda na primeira infância aos distúrbios do trato intestinal recorrente o que leva a essas crianças a apresentarem baixo peso, baixo desempenho cognitivo, e outras anomalias relacionadas ao seu desenvolvimento que o estudo buscou fontes de biomarcadores como o teste de nitrito e o ensaio de mieloperoxidase.

O óxido nítrico é uma molécula mensageira com muitas funções, incluindo regulação do fluxo sanguíneo local, tônus vasomotor e inflamação. Aumento do óxido nítrico a produção e a atividade induzível do óxido nítrico sintetase foram demonstradas em modelos experimentais de colite. Este estudo foi desenhado para determinar a relação entre a produção de óxido nítrico e a inflamação do cólon em crianças com colite ativa (LEVINE et al., 2019).

O ensaio de mieloperoxidase destina-se a terminação qualitativa da mieloperoxidase na urina e nas fezes, projetada para ser também adequada para uma pequena serie de amostras. Apenas para uso de diagnostico *in vitro*. Os grânulos de neutrófilos (aproximadamente 70% dos glóbulos brancos) contêm muitas enzimas diferentes. A

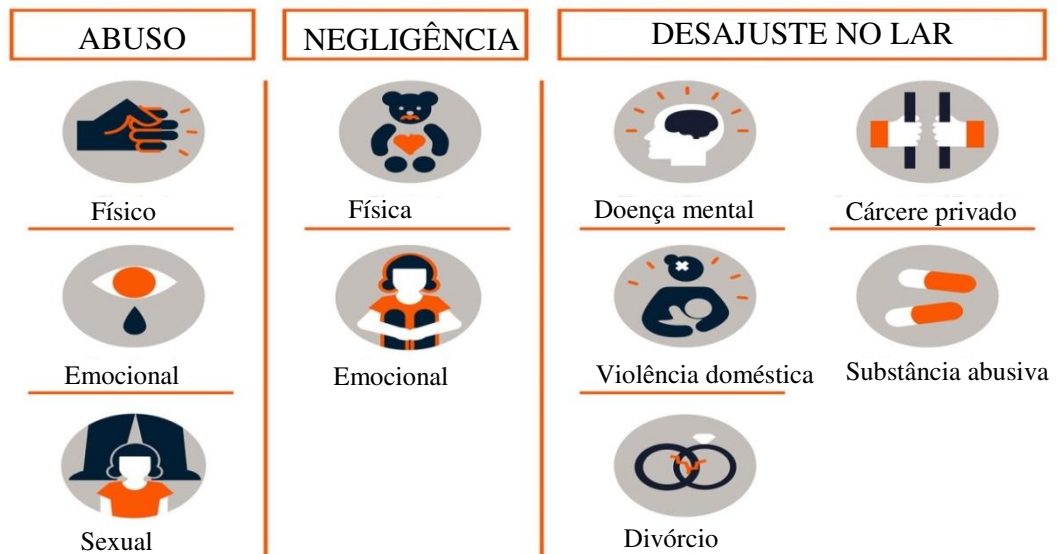
mieloperoxidase (MPO) catalisa a oxidação de substâncias através de H_2O_2 (peróxido de Hidrogênio). O sistema MPO catalisa H_2O_2 possui um efeito tóxico em muitos microrganismos, como bactérias, fungos, vírus e micoplasma. A eficiência da MPO destruidora de bactérias através do sistema H_2O_2 é aumentada pela PMN-Elastase. A determinação de MPO nas fezes reflete a atividade inflamatória da doença de Crohn ou Colite (MARTINS, 2010).

1.1 Escala de Experiências Adversas da Infância (ACE)

A Escala de Experiências Adversas da Infância original (ACE), tornou-se uma ferramenta muito popular entre pesquisadores e defensores preocupados com os efeitos a longo prazo dos traumas infantis. A escala ACE, que avalia experiências adversas precoces como abuso físico, abuso sexual, negligência, foi encontrada para prever resultados negativos na vida adulta, de saúde física e mental, como doença cardíaca, obesidade, hipertensão, (Dong, Giles, et al., 2004), doença hepática (Dong, Dube, Giles, Felitti & Anda, 2004), abuso de substâncias (Dube et al., 2003), depressão (Edwards, Holden, Felitti & Anda, 2003) e suicídio (DUBE et al., 2001).

A escala e seus itens componentes não foram formulados por nenhum processo sistemático, e há muitas razões para acreditar que ela poderia ser melhorada. A escala atual é composta de 10 itens. Cinco deles dizem respeito a aspectos do tratamento infantil: abuso físico, abuso psicológico, abuso sexual, negligência física e negligência emocional. Cinco outras questões dizem respeito a incapacidades familiares ou parentais: perda parental por divórcio, morte ou abandono, prisão parental, doença mental parental, abuso de substância pelos pais e violência contra a mãe (DONG, DUBE, GILES, FELITTI, & ANDA, 2004).

Figura 1: Escala de experiências adversas-traumas da infância.



Fonte: google, 2019

No entanto existem fortes evidências de que outras adversidades comuns da infância também estão ausentes na lista. Entre eles estão o *bullying* na infância, o isolamento e a rejeição entre dos colegas, a pobreza e a privação e a exposição à violência na comunidade. Ao mesmo tempo, algumas das adversidades na lista original do ACE podem não ser fortes indicadores de problemas. Por exemplo, o divórcio dos pais pode, algum momento, ter submetido a criança a um estigma e privação particulares. Pesquisas sobre divórcio sugerem que o elemento tóxico é a exposição ao conflito parental prolongado mais do que o próprio divórcio (BUEHLER ET AL., 1998; KITZMANN, GAYLORD, HOLT E KENNY, 2003; KLINE, JOHNSTON & TSCHANN, 1991; VANDEWATER & LANSFORD, 1998).

As crianças que crescem em comunidades violentas têm sérios problemas de saúde mental e comportamentais (Gorman-Smith & Tolan, 1998) senso estes independentes dos fatores familiares (LINARES et al., 2001). O bullying e a vitimização entre pares têm sido mostrados em estudos longitudinais como tendo consequências no distúrbio psiquiátrico (Copeland, Wolke, Angold, & Costello, 2013), com efeitos em alguns casos excedendo os de maus-tratos parental (PRICE-ROBERTSON, HIGGINS, & VASSALLO, 2013). Além da vitimização do bullying, o isolamento e a rejeição social pelos pares podem fazer uma contribuição independente para problemas e ajustes posteriores (BOIVIN, HYMEL, & HODGES, 2001; JUVONEN & GROSS, 2005; KUPERSMIDT, COIE, & DODGE, 1990). Finalmente, a pobreza tem mostrado múltiplos efeitos no desenvolvimento infantil, levando a

conseqüências físicas e mentais na vida adulta (ABER, BENNETT, CONLEY & LI, 1997; DUNCAN & BROOKS-GUNN, 2000).

Entre os caminhos separados da pobreza para os problemas adultos estão situações como pré-natal mais pobre, maior exposição a doenças e toxinas ambientais, mais acidentes e falta de assistência médica de qualidade. A incerteza das condições de vida sob pobreza também pode levar à desregulação do estresse generalizado associada a problemas de saúde física e mental posteriores (EVANS & KIM, 2007). As cuidadoras dessas crianças foram submetidas ao questionário (ANEXO A) ao qual foram obtidos os seguintes valores de ACEs:

Figura 2: Escala de ACEs



Fonte: free Ace, 2018

1.2 Mieloperoxidase

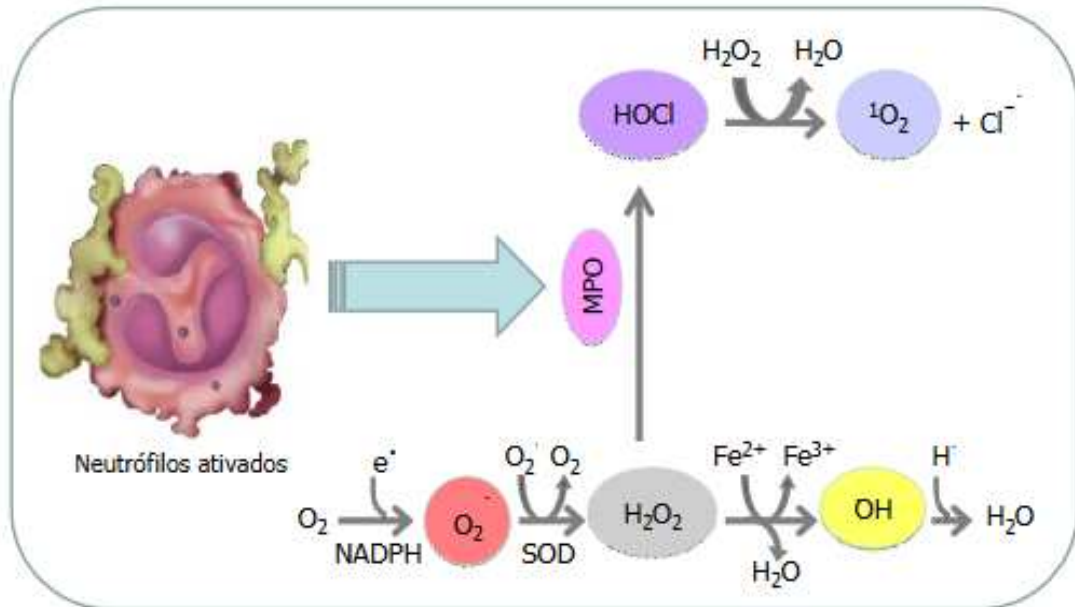
Há mais de 70 anos, Agner (2) descreveu a purificação de uma proteína com atividade de peroxidase contendo ferro intensamente verde a partir de líquido purulento de pacientes com empiema tuberculoso (2). Por causa de sua cor verde, a proteína foi inicialmente denominada verdoperoxidase, mas como estudos subsequentes mostraram que a expressão dessa peroxidase estava restrita a células da linhagem mielóide, ela logo foi alterada para mieloperoxidase (MPO; EC 1.11.1.7) (3, 208 316.317). Após a descrição inicial do MPO por Agner, foram necessários quase 30 anos para que o papel funcional do MPO fosse elucidado. Nos estudos seminais de Klebanoff (175, 176), a MPO, juntamente com seu substrato

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), provou ser um poderoso sistema antimicrobiano, e, como tal, a MPO é um componente essencial da atividade microbicida dependente de oxigênio dos fagócitos, e em particular, neutrófilos.

A síntese de MPO ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea. Esta enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa cerca de 5% do conteúdo proteico total de um neutrófilo e cerca de 1% no monócito (ROMAN et al., 2008). É uma hemoproteína catiônica, e a principal constituinte dos grânulos azurófilos (grânulos primários) dos neutrófilos. É libertada imediatamente após ativação dos neutrófilos, contribuindo para a defesa do organismo. Está geralmente associada com morte bacteriana e lesão oxidativa tecidual. Esta enzima apresenta atividade oxidativa e inflamatória.

No fagossoma de neutrófilos, a MPO converte o peróxido de hidrogênio e íons cloro em ácido hipocloroso (HClO) e água (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008), (Figura 3). O ácido hipocloroso formado é considerado um agente oxidante citotóxico com atividade microbicida (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008). A avaliação da atividade da enzima MPO é utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos, essas células são tradicionalmente visualizadas como células de vida curta e totalmente diferenciadas, cuja função principal é encontrar, ingerir e destruir rapidamente uma ampla gama de patógenos invasores, incluindo bactérias, fungos e protozoários, essa resposta neutrofílica aguda é frequentemente acompanhada de dano no tecido do hospedeiro, esses efeitos de modulação imune são em parte mediados por citocinas e quimiocinas derivadas de neutrófilos que afetam e atraem outras células imunes, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, Além disso, os mesmos mediadores necessários para a morte de patógenos mediada por neutrófilos também podem modular a sinalização celular. Durante muito tempo, o MPO tem sido considerado uma enzima bactericida, cuja principal função é gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que contribuem para a destruição e morte de patógenos engolidos. No entanto, evidências recentes estenderam essa visão, demonstrando que a MPO também está intimamente envolvida na homeostase celular e é um fator importante no início e progressão de várias doenças inflamatórias. Nesse contexto, a MPO e seus produtos e efeitos a jusante ganharam um interesse considerável em várias doenças inflamatórias.

Figura 1 - Ação da mieloperoxidase sobre o peróxido de hidrogênio.



Fonte: Diana ,2011.

A MPO é conhecida por ser um marcador de neutrófilos ativados (LORIA et al., 2008). A migração de neutrófilos para o tecido inflamado é avaliada pela determinação da atividade da MPO, pois durante esta ativação, uma quantidade considerável desta enzima é liberada para o meio extracelular. Os neutrófilos em apoptose liberam MPO e são removidos pelos macrófagos, o que é importante para a resolução da inflamação. A MPO está mais relacionada à ativação de neutrófilos do que mononucleares, uma vez que esta enzima é perdida na maturação dos monócitos (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010).

A MPO está envolvida em várias doenças, especialmente aquelas relacionadas à inflamação mediada por neutrófilos como: doença arterial coronária, artrite reumatoide, doença inflamatória do intestino, asma, câncer (GUILPAIN ET AL., 2008) aterosclerose, esclerose múltipla e glomerulonefrite. Nestas doenças se observa o aumento significativo da atividade desta enzima (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010).

1.3 Óxido Nítrico Sintase - Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira de radicais livres pleiotrópica. Há muitas evidências de que a forma induzível da enzima NO sintase (iNOS), responsável pela produção de NO de alta produção da L-arginina, é regulada de maneira positiva em várias formas de inflamação da mucosa. Consistente com isso, várias estratégias de detecção demonstraram que a expressão da iNOS, a atividade enzimática e a produção de NO aumentam nos tecidos da doença inflamatória intestinal em humanos. Há também evidências de que o nível de NO derivado da iNOS se correlaciona bem com a atividade da doença na colite ulcerosa, enquanto na doença de Crohn, os resultados são mais variáveis. Quando metabolizada a citrulina, a arginina promove a formação de compostos nitrogenados como: Óxido nítrico, nitritos e nitratos. Grande parte da importância da arginina está atribuída a sua função precursora da síntese de óxido nítrico (NO), uma vez que esta se constitui no único substrato para síntese de NO e para todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas células eucarióticas. O óxido nítrico possui papel importante em diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo responsável pelo tônus vascular e regulação sanguínea, funcionando como vasodilatador. É sintetizado a partir da conversão da arginina em citrulina pela NOS. A NOS combina-se com o nitrogênio do grupo guanidino, oxigênio molecular (O_2) e elétrons do $NADPH_2$, formando ON, citrulina e $NADP^+$. A $NADPH_2$ e cálcio funcionam como co-fatores para a síntese de ON. A Citrulina gerada pode ser utilizada na síntese de arginina em células endoteliais, macrófagos e células do sistema nervoso periférico- ciclo citrulina/ON. A enzima é encontrada em três formas diferentes. A NOS-1 ou nNOS tem origem neuronal e função de neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico, sendo expressa nos plexos mientéricos do intestino. A NOS-3 e eNOS, de origem endotelial, é um potente vasodilatador que regula o fluxo sanguíneo gastrointestinal. Estas duas isoformas são dependentes de cálcio e produzem baixos níveis de NO. NO entanto, a terceira isoforma indutiva NOS-2 ou iNOS é produzida em quantidades maiores e é regulada pelo estímulo inflamatório gerado por lipopolissacarídeos de membrana bacteriana, endotoxinas, citocinas pró-inflamatórias em humanos e em outros animais de sepse (NADLER & FORD, 2000; WIEST & RATCH, 2003). O NO é um potente regulador vasoativo, neuromodulador e molécula sinalizadora. Durante a inflamação, age mediando mecanismos de citotoxicidade e defesa não específica do hospedeiro. É o principal fator de relaxamento derivado do endotélio, melhorando a vasoconstrição e aumentando o fluxo sanguíneo em tecidos injuriados (SAMEL et al., 2003). Existem algumas controvérsias quanto aos efeitos do ON.

ON possui potentes efeitos bactericidas contra a grande variedade de microorganismos, no entanto, situações de excesso na sua produção induzidas pelo estímulo inflamatório podem ocasionar efeitos tóxicos sobre as células do hospedeiro. Uma vez que a suplementação com a arginina esta associada ao estímulo a NOS e conseqüentemente elevada da produção de oxido nítrico, seu uso tem sido bastante controverso (HARDY et al., 2006; NADLER & FORD, 2000; DEITCH et al.,2002).

1.7 Justificativa

Conforme acima mencionado, crianças submetidas a estresse tóxico criadas em ambientes pobres ou não, desenvolvem frequentemente problemas no cognitivo ou até mesmo no comportamental, como doença cardíaca (Dong, Giles, et al., 2004), doença hepática (Dong, Dube, Giles, Felitti, & Anda, 2004), abuso de substâncias (Dube et al., 2004), depressão (Edwards, Holden, Felitti, & Anda, 2003), suicídio (Dube et al., 2001), e alterações intestinais. A maior parte destas alterações ocorre de forma progressiva da infância para a idade adulta. Importante destacar que por meio da Escala de Experiências Adversas na Infância (ACE) é possível a análise do estresse tóxico e que o número de exposições a estresse tóxico está relacionado a um pior prognóstico.

Face a estas evidências, vimos a necessidade de avaliar em crianças em situação de vulnerabilidade, marcadores fecais associados a doença inflamatória, como forma de trabalhar a prevenção futura de doenças intestinais nestas crianças. Os marcadores nitrito e MPO foram escolhidos a partir de evidências da literatura.

Foi utilizado MPO e nitrito, como biomarcadores de processos inflamatórios intestinais. Por se tratar de um projeto piloto, ainda sem muitos estudos, correlacionando as amostras fecais com os ACEs, sendo usado nessa monografia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar marcadores inflamatórios nas fezes de crianças ainda na primeira infância expostas a estresse tóxico comparando crianças expostas a 0-2 ACEs ou a mais de 4 ACEs (consequências da exposição das experiências).

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a atividade da MPO e os níveis de nitrito nas fezes de crianças expostas a estresse tóxico.
- b) Identificar crianças com estresse tóxico, ainda na primeira infância e a partir dessa identificação sugerir um melhor acompanhamento para a recuperação da saúde das mesmas.
- c) Escrever um projeto um piloto, para desenvolver um trabalho de conclusão de curso.

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes

A coleta das amostras foi realizada no ambulatório do IPREDE, ligado a Universidade Federal do Ceará (UFC), onde há o atendimento de crianças com desnutrição leve a moderada diagnosticadas com um grau de ACE. Foram incluídos no estudo 11 pacientes, acompanhados mediante a resposta de um questionário (anexo A) submetida aos cuidadores dessas crianças e todas foram às mães dessas crianças. O questionário foi de carácter classificativo. Após a avaliação positiva da participação dos candidatos a pesquisa, a cuidadora que normalmente é a mãe do participante escolhido, foi instruída quanto ao procedimento de coleta, armazenamento correto da amostra fecal, bem como de sua conservação até a entrega dela.

Tabela 1 - Quantidade de crianças e quantidades de ACEs.

Número de Crianças	Quantidade de ACEs
1ª criança	4ACEs
2ª criança	2ACEs
3ª criança	0ACEs
4ª criança	5ACEs
5ª criança	1ACE
6ª criança	6ACEs
7ª criança	5ACEs
8ª criança	4ACEs
9ª criança	2ACEs
10ª criança	7ACEs
11ª criança	7ACEs

Fonte: do autor.

3.2 Local do estudo

O estudo se realizou na sede do Instituto da Primeira Infância- IPREDE, localizado à Rua Professor Carlos Lobo Nº 15, Cidade dos Funcionários, CEP: 60821 – 740, Fortaleza/CE. O IPREDE uma organização não-governamental, com mais de três décadas de prestação de serviço à comunidade, dedicada a nutrição e o desenvolvimento na primeira infância, prestando assistência às crianças e suas famílias por meio de projetos de prevenção, intervenção, assistência e inclusão social.

As amostras fecal foram analisadas no laboratório da Universidade Federal do Ceará em que a professora Daniela Macedo do NPDM é responsável.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Pacientes de 3 a 7 anos atendidas no IPREDE com desnutrição leve ou moderada, submetidas a algum tipo de estresse tóxico analisados pela escala ACE, no qual as crianças que estão expostas a uma classificação de estresse tóxico que relaciona os extremos 0-2 e 4 ou +, mediante a resposta dos cuidadores dessas crianças ao questionário aplicado pelos profissionais do Iprede.

3.3 Aspectos éticos

Esse estudo foi submetido à apreciação do Comitê de ética UFC/IPREDE (CAAE: 17818819.7.0000.5054). O estudo não impôs riscos aos participantes e/ou a seus familiares, uma vez que sua participação consiste em ceder uma única amostra fecal, coletada em sua residência. A autonomia do participante foi respeitada, sendo possível a desistência em qualquer momento da pesquisa, sem o prejuízo do atendimento do participante na instituição. A confidencialidade dos dados dos pacientes foi respeitada ao longo de toda a pesquisa e após o seu término, o risco pode ter ocasionado, seria o risco leve no que está relacionado ao que o questionário possa trazer lembranças desagradáveis.

3.4 Coleta e tratamento das amostras fecal

Após a entrevista e a confirmação do paciente para a pesquisa, o mesmo era orientado como deveria ser a coleta dessa amostra até a sua entrega. O paciente recebia um frasco estéril de coleta, onde o paciente era orientado a fazer a coleta da amostra no dia da entrega e que era marcada sempre para o dia da sua consulta de rotina, assim era possível ser entregue no ambulatório e ser acondicionado no freezer a -20°C . As amostras foram colocadas em isopor com gelo e foram transportadas ao laboratório do NPDM (laboratório de neuropsicofarmacologia). No laboratório as amostras eram acondicionadas em freezer a -80°C até as análises posteriores.

3.5 Testes laboratoriais

3.5.1 Determinação de nitrito nas fezes

Reagente GRIESS:

Como preparar:

3.5.1.1 Ácido Fosfórico 5%:

-Colocar 5mL de ácido fosfórico no balão volumétrico de 100mL e completar com H₂O destilada – colocar lentamente.

3.5.1.2 Sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%

(p-Aminobenzenesulfonamida- Sigma S 9251):

-Pesar 0,1g da sulfonilamida e completar até 10mL com ácido fosfórico 5%.

3.5.1.3 NEED 0,1% - C₁₀H₁₄N₂·2HCL (N-(1-Naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride):

-Pesar 10mg do NEED completar volume até 10mL com água destilada.

Reagente de GRIESS precisa ser preparado no dia do uso.

3.5.2 Tampão fosfato:

-6,7-Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄)4,69g:

-6,5-Fosfato de sódio monobásico(Na₂H₂PO₄)1,66g:

-água destilada q.s.p.: 300mL

Preparar:

1. Colocar a metade do volume
2. Dissolver o material
3. Medir o pH - deve estar em 7,4
4. Complete o volume

Medindo o pH:

1. Tirar o tubo com HCl
2. Lavar o eletrodo com água destilada
3. Secar com papel toalha sem apertar
4. Liga – seleção pH
5. Se o pH não estiver em 7,4 deve-se colocar NaOH (1gt – mexe até 7,4)
6. Colocar o tubo com HCl

3.5.3 tampão HTAB (brometo de cetil trimetil amônio)

Pesar 5g de HTAB e diluir em 1L de tampão de fosfato de potássio. Se for preciso, aquecer levemente (40°C) para dissolver. Armazenar em geladeira e aquecer levemente (40°C) para redissolver quando requerido. Ajustar o pH desse tampão para 6,0.

Os tampões podem ser preparados vários dias antes do experimento e armazenados na geladeira. A solução de θ -dianisidina precisar ser feita no dia do experimento.

θ -dianisidina:

- 5,567 mg de θ -dianisidina;
- 29mL de água destilada
- 3,3mL de tampão de fosfato
- 1mL de peróxido de hidrogênio 30%

Atenção: Diidrocloreto de θ -dianisidina é um carcinógeno. Manipule com cuidado.

3.5.4 Tampão fosfato de potássio

Solução A: 6,8g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em 1L de água destilada.

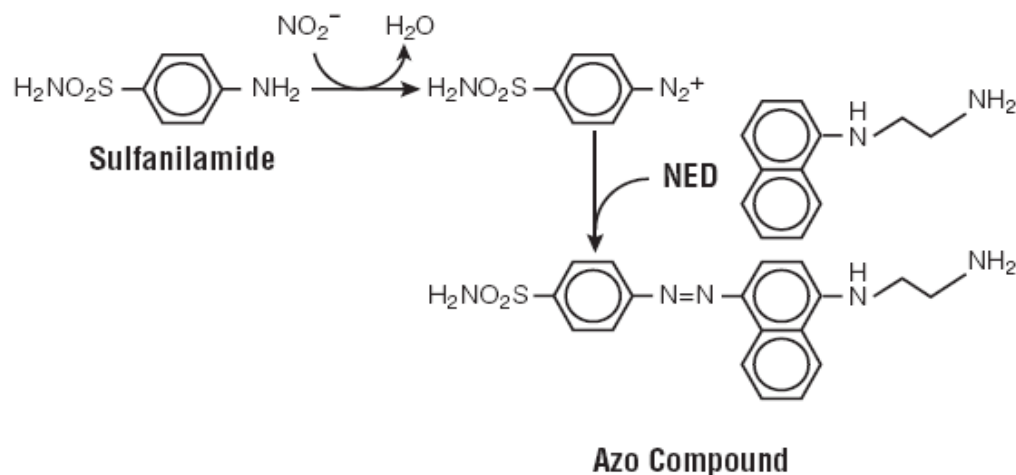
Solução B: 8,7g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) em 1L de água destilada.

Juntar 988mL de A+12mL de B para 1L de tampão de fosfato de potássio.

3.6 Determinação da produção de Nitrito na amostra fecal

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorbância em 540nm.

Figura 2 – o mecanismo do nitrito, sulfanilamide, e a reação de NED.



Fonte: adaptado de Promega

As onze amostras fecais foram descongeladas a temperatura ambiente. Todas amostras foram pesadas individualmente em balança de precisão, colocadas em tubo de ensaio com um valor próximo a 100mg, adicionados 5ml do tampão de lavagem. As amostras foram homogeneizadas, em seguida centrifugadas por 10 minutos a 3000rpm, retirado 1ml do sobrenadante. Centrifugada por mais 5 minutos a 13.000rpm, para a análise da quantificação nos poços da placa contendo amostras de nitrito usou-se 100 μl da amostra e 100 μl de reagente de GRIESS, cronometrou-se 10minutos e levado ao espectrofotômetro a 540nm para medir a absorbância.

3.7 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO) para amostra fecal

As amostras fecais foram descongeladas a temperatura ambiente. Todas as amostras coletadas foram pesadas individualmente em uma balança de precisão colocadas em tubo de ensaio com um valor muito próximo a 100mg, foram adicionados 500 μL do tampão de HTAB em 100mL de água, as amostras foram homogeneizadas com um bastão de vidro, logo em seguida centrifugadas por 10 minutos a 3000rpm, foi retirado 1ml do sobrenadante, e feita uma nova centrifugação por 5 minutos a 13.000rpm, nos poços da placa de ELISA para quantificação mieloperoxidase adicionou-se 30 μL da amostra em cada poço e 200 μL do reagente de θ -dianisidina, sendo feita a 1 leitura no minuto 0, e a segunda leitura passados 3 minutos, medir com base na densidade ótica (460nm) que muda devido a decomposição do

peróxido de hidrogênio H_2O_2 na presença de o-dianisidina. Utilizou-se um ensaio previamente desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia (NPDM/UFC) para dosagem dessa enzima em tecidos previamente homogeneizados (SOUZA et al. 2000), com algumas modificações.

Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo programa GraphPad Prism versão 6.0. Foi utilizado o teste T de Student considerando significativo quando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

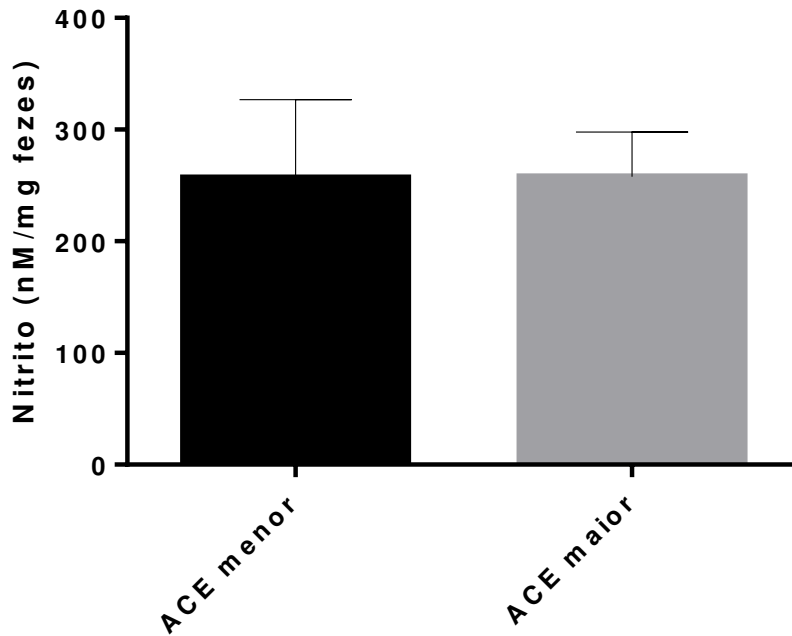
Este estudo foi desenhado para correlacionar a presença de óxido nítrico e MPO nas fezes das crianças com indicação de ACE e a inflamação intestinal.

4.1 Avaliação de nitrito em análise fecal

A presença ou não de nitrito foi medido nas fezes dessas crianças usando o teste de Griess. Pacientes com colite manifestam um aumento da produção gastrointestinal de uma variedade de citocinas e mediadores. Assim, sendo o óxido Nítrico (NO) uma molécula mensageira com muitas funções, incluindo a regulação do fluxo do sangue local, tônus vasodilatador e inflamação. A síntese de óxido nítrico é mediada por isoformas constitutivas e induzíveis de NO sintase (NOS). O nitrato e nitrito são metabólitos estáveis do NO, e a medição desses produtos de oxidação em fluidos biológicos é uma medida útil da produção de NO.

Foi observado que as respostas ao ensaio de nitrito não foram significativas, tanto em pacientes com uma quantidade menor de ACE (0-2) que certamente era o esperado, como em pacientes com a maior quantidade de ACE (4+) (Tabela 2). O estudo estatístico foi realizado usando o um Test T de Student não pareado para comparação de grupo de ACEs menor x ACEs maior (Figura 5). Com isso foi constatado que não houve diferenças significativas na estatística entre os grupos analisados com um valor de $P > 0,05$ ($P=0,99$).

Figura 3 – Concentração de nitrito (nM) por mg de fezes determinada pelo teste de nitrito obtido do Test T de student não pareado

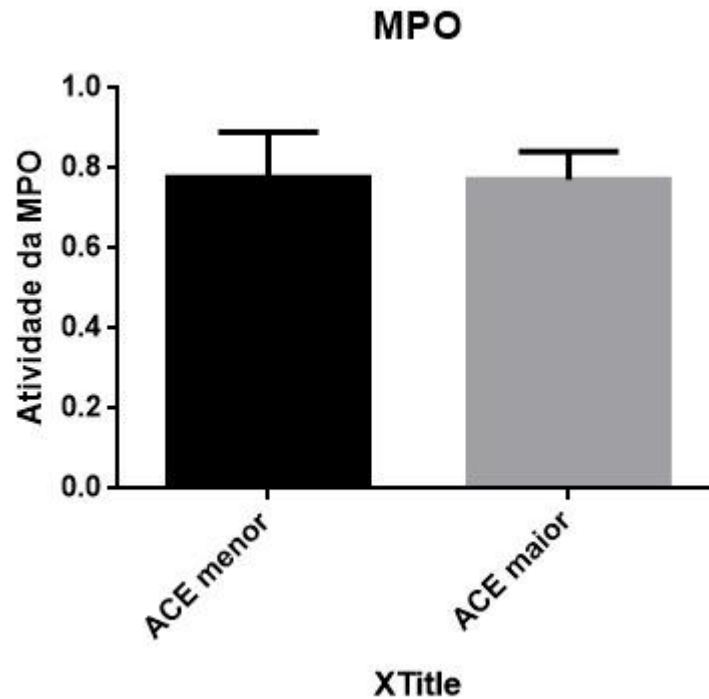


Fonte: do autor.

4.2 Avaliação da ação do MPO no tempo de 3 minutos

O teste de MPO foi realizado com os dois grupos o de ACE menor e o de maior ACE. A estatística utilizada foi a mesma do nitrito pelo Test T de Student não pareado, e como sendo $P > 0,05$ a correlação passa a não existir dentro desses parâmetros ,ou por que o número de amostras foi ineficiente ou por que esse biomarcador sozinho não corrobora com a análise clínica.

Figura 4 – Atividade da MPO determinada no Test T de student não pareado no programa GRAPHPAD PRISM, versao 6.0.



Fonte: do autor.

Esse trabalho ainda não descrito na literatura, aonde se faz a associação de parâmetros entre os ACEs e marcadores biológicos.

Contudo, o biomarcador ideal para a DII não existe e é provável que o recurso ao estudo de painéis de vários biomarcadores em simultâneo, ao invés do estudo isolado, seja mais vantajoso e preciso, algo que se tornou num recente foco de investigação.

Entretanto, para diagnóstico de DII, esses dois tipos de biomarcadores não tiveram alterações expressivas nos níveis de MPO e nitrito, o que desta forma parece não ser um marcador apropriado para a predição de crianças submetidas a ACEs e DII.

5. CONCLUSÃO

Os dados mostram que não há alteração significativa nos parâmetros MPO e nitrito quando comparadas crianças submetidas a menos de 2 ACES e mais de 4 ACES.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectiva para uma possível continuidade deste trabalho, é um maior esclarecimento dos mecanismos envolvidos nos seguintes processos citados:

- Utilizar um número amostral maior, pois sendo esse um trabalho piloto, utilizou-se um número reduzido de amostras para realizar a correlação;
- Cruzar informações da microbiota intestinal de crianças com os possíveis processos inflamatórios ocasionados tendo como a causa as crianças que apresentam um alto e baixo índice de ACES.
- É necessário fazer uma triagem de crianças recém ingressas e crianças que já já apresentam uma recuperação por parte do tratamento já realizado na instituição.

REFERÊNCIAS

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. **Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 500, p. 92-106, 2010.

Apostila de Espectrofotometria Molecular. Análise Instrumental, CEFET química-Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ATKINSON A.; COLBURN W.; DEGRUTTOLA V.; DEMETS D.; DOWNING G.; HOTH D.; et. al. **Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.** *Clin Pharmacol Therapeutics*. USA, 2001.

ANDRADE S.; **Efeitos da administração intragástrica de *bifidobacterium longum* subsp. *infantis* chcc2228 em um modelo murino agudo de colite ulcerativa induzida por sulfato sódico de dextrana (dss),** 2013. Dissertação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

BARRIE A, MOURABET ME, WEYANT K, CLARKE K, GAJENDRAN M, RIVERS C, PARK SY, HARTMAN D, SAUL M, REGUEIRO M, YADAV D, BINION DG. (2012). **Recurrent blood eosinophilia in ulcerative colitis is associated with severe disease and primary sclerosing cholangitis.** *Digestive Diseases and Science*, 58:222-228

ISKANDAR H,N, CIORBA MA.**Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Current Practices and Recent Advances.** Division of Gastroenterology, Washington University in Saint Louis School of Medicine, Saint Louis, MO, USA, 2012.

CHRISTIAN, G.D. **Analytical Chemistry.** John Wiley & Sons, Inc., 5ª edição, 1994.

DANESE S. (2012). **New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside.** *Gut*, 61:918-932.

PEREIRA, A.D. (2011). **Estudo farmacológico do extrato bruto, frações e compostos isolados da *lotus corniculatus* var. *sao Gabriel* utilizando-se o modelo da pleurisia em**

camundongos. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

DONG, M.; GILES W.; FELITTI, V.; DUBE, S.; et al. (2004) **Insights Into Causal Pathways for Ischemic Heart Disease**. From the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.

DONG, M.; ANDA R., FELITTI V.; DUBE S.; et al. (2004) **The interrelatedness of multiple forms of childhood abuse, neglect, and household dysfunction.** Division of Adult and Community Health, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, 4770 Buford Highway, N.E., MS K-67, Atlanta, GA 30341-3717, USA.

EDWARDS, V. J., HOLDEN, G. W., FELITTI, V. J., & ANDA, R. F. (2003). **Relationship Between Multiple Forms of Childhood Maltreatment and Adult Mental Health in Community Respondents: Results From the Adverse Childhood Experiences Study.** *American Journal of Psychiatry*, 160(8), 1453-1460.

FELL JME. (2011). **Update of the management of inflammatory bowel disease.** *Archives of Disease in Childhood*, 97:78-83.

GREEN L.C.; WAGNER D.A.; GLOGOWSKI J.; SKIPPER P.L.; WISHNOK J.S.; TANNENBAUM S.R.; **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids.** Department of Nutrition and Food Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA, 1982.

LEVINE J.; MICHEL P.; VANDERRAM E.; GOLD D.M.; KESSLER B.H.; HOWARD T.; **Nitric Oxide and Inflammatory Bowel Disease: Evidence for Local Intestinal Production in Children with Active Colonic Disease.** *Nutrition Divisions of Gastroenterology and Nutrition.* USA. 1998.

LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators of Inflammation*, v.1, p. 1-4, 2008.

MARTINS B.A.; **Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas.** Dissertação de Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Araraquara-São Paulo,2010.

MENESCAL, J.V.; **Experiências adversas na infância de mães e a correlação com o vínculo materno de crianças assistidas numa instituição de primeira infância.** 2018. Dissertação da Faculdade de Medicina universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2018.

GUERRANT, R.L.; LEITE,A.M.; PINKERTON, R.; et al (2016) **Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil.** University of Chicago Medical Center, USA, 2016.

ROSEN M.J.; DHAWAN A.; SAEED S.A; **bowel disease in children and adolescents.** Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, 2015.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. Arq Bras Cardiol, 2008, 91:11-9.

SILVA M.M. **Biomarcadores na doença inflamatória intestinal.** 2013. 53f. Dissertação de Mestrado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Porto, 2013.

VICTORIA C.G; ADAIR L.; FALL C.; HALLAL P.C; MARTORELL R.; RICHETER L.; et al. **Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital.** Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

ANEXO A - ROTEIRO DE QUESTIONARIO CYW SOBRE EXPERIÊNCIAS ADVERSAS NA INFÂNCIA (Q-EAI) CRIANÇA

QUESTIONÁRIO DO CYW SOBRE EXPERIÊNCIAS ADVERSAS NA INFÂNCIA (Q-EAI) CRIANÇA

Data de aplicação do questionário: _____ (J _____) _____ Data de nascimento: _____
Prontuário: _____ Nome da criança: _____

Nome do cuidador(a): _____

Relação com a criança: _____ Nome do aplicador: _____

Muitas crianças passam por experiências estressantes que podem afetar sua saúde e seu bem-estar. Os resultados deste questionário ajudarão o médico de seu filho a avaliar sua saúde e dar orientações.

Por favor, leia as frases seguintes, conte o número de declarações que se aplicam ao seu filho e escreva o total na caixa abaixo.

Por favor, NÃO marque nem indique quais declarações específicas se aplicam a seu filho.

1) Das afirmações da Seção 1, QUANTAS se aplicam a seu filho? Escreva o número total na caixa.

Seção 1. Em algum momento, desde o nascimento...

- Os pais ou responsáveis de seu filho se separaram ou se divorciaram.
- Seu filho viveu com um membro do agregado familiar que foi preso ou cumpriu pena na cadeia.
- Seu filho viveu com um membro do agregado familiar que sofria de depressão ou distúrbios mentais ou tentou suicídio.
- Seu filho viu ou ouviu membros do agregado familiar ferirem ou ameaçarem ferir um ao outro.
- Um membro do agregado familiar xingou, insultou, humilhou ou denegriu seu filho de forma a assustá-lo, ou um membro do agregado familiar agiu de forma que fez seu filho ter medo de ser agredido fisicamente.
- Alguém tocou as partes íntimas do seu filho ou pediu que ele tocasse suas partes íntimas de uma maneira sexual.
- Mais de uma vez, seu filho ficou sem comida, sem roupas ou sem um lugar para morar, ou não teve ninguém para protegê-lo.
- Alguém empurrou, agarrou, deu uma tapa ou atirou algo em seu filho, ou seu filho foi agredido com tanta força que ficou ferido ou com marcas.
- Seu filho viveu com alguém que tinha problemas com bebidas ou usava drogas.
- Seu filho se sentia com frequência sem apoio, sem amor ou desprotegido.

2) número total na caixa. Seção 2. Em algum momento, desde o nascimento ...

- Seu filho ficou em um lar temporário.
- Seu filho sofreu assédio ou foi vítima de *bullying* na escola.
- Seu filho viveu com um dos pais ou responsável que morreu.
- Seu filho foi separado de seu principal cuidador por motivo de deportação ou imigração.
- Seu filho foi submetido a um procedimento médico sério ou teve uma doença que representou risco de vida.
- Seu filho viu ou ouviu com frequência, violência no bairro ou nos arredores de sua escola.
- Seu filho foi maltratado com frequência por causa de raça, orientação sexual, local de nascimento, deficiência ou religião.

ANEXO B - TERMO DE ACEITACAO DO PARTICIPANTE A PESQUISA**INSTITUTO DA PRIMEIRA INFÂNCIA-IPREDE**

Reconhecido de Utilidade Pública Federal: Decreto MS n.º 18.238/91-87 de 03/09/1992; Estadual: Lei n.º 11.377 de 18/11/87; Municipal: Lei n.º 6.173 de 01/12/86; Certificado no CNAS: Reg. n.º 23.002.003309/88-70 de 31/08/88.

Eu, _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa, os riscos e benefícios da minha participação e do meu filho(a), que não terei nenhum prejuízo caso desista de participar a qualquer momento e que terei o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos que eu desejar. Sendo assim concordo em participar do estudo.

Fortaleza, _____ de _____ de 2018

Assinatura do participante
1ª via participante/2ª via pesquisador



ANEXO C- PARECER CONSUBSTANCIADO

UFC- UNIVERSIDADE FEDERA
CEARÁ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Promoção da Segurança do Apego através da Regulação Emocional e Psicológica de Crianças em um Contexto de Vulnerabilidade

Pesquisador: Álvaro Jorge Madeiro Leite

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17818819.7.0000.5054

Instituição Proponente: INSTITUTO DA PRIMEIRA INFANCIA-IPREDE

Patrocinador Principal: INSTITUTO DA PRIMEIRA INFANCIA-IPREDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.538.517

Apresentação do Projeto:

Esta pesquisa trata da análise da eficácia da Intervenção Relacional (IR) como estratégia clínica que visa promover a saúde mental e o desenvolvimento de crianças em risco ou em situação de vulnerabilidade social e suas famílias. A IR é um protocolo de curta duração (8 sessões) que tem demonstrado eficácia na melhora da sensibilidade dos pais, na segurança do apego da criança e no desenvolvimento mental e/ou psicológico, diminuindo a desorganização e os problemas de comportamentos a curto prazo.

Essa pesquisa ocorrerá na sede do Instituto da Primeira Infância - PREDE.

É uma pesquisa mista, com abordagem quantitativa e qualitativa, dividida em quatro componentes: Componente 1, estudo transversal; Componente 2, ensaio clínico randomizado e controlado; Componente 3, qualitativa e Componente 4, análise socioeconômica.

Em relação aos 4 componentes: (1) identificar as competências mais adequadas para um bom mediador, (2) examinar os efeitos da Intervenção Relacional (IR) na díade mãe/filho, (3) analisar as percepções das participantes da IR, durante a pesquisa e (4) examinar os custos e benefícios econômicos da IR na instituição, na perspectiva de aplicação em larga escala.

No Componente 1 da pesquisa referente aos critérios de seleção dos mediadores ocorrerá para os adultos (mediadores em potencial), serão aplicados questionário e realizado filmagem de sessões de IR. No Componente 2 da pesquisa, um ensaio clínico randomizado e controlado sobre a IR, envolverão crianças e suas mães/cuidadoras principais, a díade será submetida a entrevista com aplicação de questionário, filmagem de momento de brincar livre, filmagem do procedimento de situação estranha, coleta de cabelo e fezes, sessões de IR. Os atendimentos serão realizados por entrevistadores treinados (e supervisionados) com cuidado de não constranger, não induzir ou provocar qualquer situação de desconforto. As filmagens de crianças e mães/cuidadoras principais estão baseadas em protocolo padronizado, com treinamento e supervisão adequados dos aplicadores do procedimento.

No Componente 3, pesquisa qualitativa com as mães/cuidadoras principais serão utilizados as técnicas de photovoice e grupo focal. O Componente 4 da pesquisa referente a análise socioeconômica usará de documentos e do cálculo dos custos para a realização da IR.

A hipótese principal se refere ao aumento da sensibilidade materna e do comportamento de apego das crianças do grupo de intervenção em relação ao grupo controle. A coleta dos dados será por informações do prontuário, questionários, entrevistas, grupo focal, photovoice, filmagem da díade mãe/filho em momento de brincar livre e na situação estranha, coleta de cabelo e fezes para marcadores biológicos relacionados ao estresse tóxico das crianças.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliação da eficácia e da efetividade da IR. Examinar os efeitos da IR junto aos pais e crianças (1-3 anos) potencialmente vítimas de maus-tratos e em situação de vulnerabilidade socioeconômicas, assistidas no IPREDE.

Objetivo Secundário:

Identificação dos critérios de seleção dos mediadores da IR, com o objetivo de identificar um conjunto de competências do mediador que sejam necessárias ou suficientes para aumentar a probabilidade de sucesso da IR.

Análise qualitativa dos participantes da pesquisa acerca da IR, com o objetivo de analisar a partir das percepções dos mediadores e pais, as facilidades e dificuldades que contribuem para o sucesso da intervenção, a participação na IR, a figura do mediador e as experiências da mãe acerca da sensibilidade parental.

Análise socioeconômica da IR com o objetivo de examinar os custos e benefícios da IR no IPREDE e na perspectiva de aplicação em larga escala.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**RISCOS:**

As mães/cuidadoras principais que se sentir constrangidas em falar sobre sua vida e a da sua família, ou por estar participando de filmagens, como também a possibilidade de risco de lembranças desagradáveis no momento da aplicação do questionário, caso aconteça, elas terão apoio da equipe de psicólogos da instituição. As crianças poderão se sentir desconfortáveis ou irritadas, mas as mães/cuidadoras principais confortarão os filhos no momento que desejar, assim como pedir para que o procedimento seja interrompido; caso ache necessário, elas poderão pedir atendimento pela equipe de profissionais da instituição para seus filhos. Os potenciais mediadores nas respostas aos questionários e a participação como mediador nas 8 sessões da IR poderão suscitar lembranças desagradáveis atuais ou referentes a infância, para tanto contamos com supervisões sistemáticas e caso necessário encaminhamento ao serviço de psicologia do IPREDE.

BENEFICIOS:

A pesquisa é importante, pois os resultados trarão benefícios e melhorias para o atendimento as crianças e as mães assistidas na instituição, em particular a Intervenção Relacional (IR). Assim como qualificar a promoção de ações que possam fortalecer o vínculo mãe-filho, contribuindo para que as crianças tenham regulação emocional e psicológica no seu desenvolvimento. A participação das mães/cuidadoras principais e potenciais mediadores permitirá também melhor avaliar o custo social e econômico dessa intervenção, contribuindo assim para que possa ser utilizada em outras instituições, com possibilidade de beneficiar outras famílias.

É importante salientar que em caso de mal-estar ou desconforto, o IPREDE oferecerá a possibilidade de um apoio suplementar pelo serviço de psicologia, treinado para acolher e atender esses casos e o pesquisador reforça que serão tomados os cuidados para não constranger, não induzir, não provocar qualquer situação de desconforto e para manter a privacidade e o sigilo dos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que aborda um tema relevante. Os maus-tratos praticados por pais contra seus filhos são um fenômeno mundial, bastante comum na nossa sociedade. Desse modo é primordial a identificação dos fatores de proteção familiar que contribuem para o pleno desenvolvimento da criança ainda que essa viva em um ambiente hostil. O apego seguro da criança constitui um fator de proteção importante para a retomada do pleno desenvolvimento da criança que sofre maus-tratos. A Intervenção Relacional é a primeira intervenção de curta duração (8 sessões) fundamentada na teoria do apego e em vídeo feedback para pais e crianças (0 a 5 anos) vítimas de maus-tratos ou negligência.

A pesquisa será realizada por uma parceria com o Instituto da Primeira Infância (IPREDE), que já recebe esse perfil de participante da pesquisa, sendo possível sua execução.

Tem critérios de inclusão e exclusão bem definidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

É necessário enviar o relatório final da pesquisa para o CEP após a conclusão da mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICA_ROJETO_1371378.pdf	15/07/2019 08:15:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PromocaoApegoCriançasContextualidade.pdf	15/07/2019 08:12:59	Alvaro Jorge Leite	Aceito
Outros	CARTA_DE_SOLICITACAO_DE_APRE	05/07/2019 09:14:36	Alvaro Jorge Madeiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_FIEL_DEPOSITARIO.pdf	05/07/2019 09:09:56	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_COMPROMISSO_UTILIZACAO_DE_DADOS.pdf	05/07/2019 09:08:35	Alvaro Jorge Leite	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_ANUENCIA.pdf	05/07/2019 08:43:49	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito

Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.pdf	05/07/2019 08:43:28	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPesquisaMediadores.pdf	05/07/2019 08:41:34	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPesquisaMaes.pdf	05/07/2019 08:41:14	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	05/07/2019 08:39:33	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_CONCORDANCIA.pdf	05/07/2019 08:36:08	Alvaro Jorge Madeiro Leite	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	05/07/2019 08:35:06	Alvaro Jorge Madeiro	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoPesquisa.pdf	05/07/2019 08:22:40	Alvaro Jorge Madeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 28 de Agosto de 2019

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))