

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

USO DO SORO DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE NO ESTUDO *IN VITRO* DO
NÚCLEO CELULAR EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Maria Eduarda Nunes Marques

UBERLÂNDIA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

USO DO SORO DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE NO ESTUDO *IN VITRO* DO
NÚCLEO CELULAR EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Maria Eduarda Nunes Marques

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como pré-requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia pelo curso de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele
Zanon

Co-orientadora: Me. Natália Ferreira Silva

UBERLÂNDIA

2024

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Eduarda Nunes Marques

Uso do soro de indivíduos com obesidade no estudo *in vitro* do núcleo celular em linhagem de glioblastoma humano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Co-orientadora: Me. Natália Ferreira Silva

Uberlândia, 17 de Janeiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Renata Graciele Zanon

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Ciências Biomédicas)

Membro: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira,

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Biotecnologia)

Membro: Dra. Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Biotecnologia)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Elsimar e Ivanilde, que me ensinaram o valor da educação, me apoiaram incondicionalmente e acompanharam cada passo tomado durante a minha trajetória. Sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui.

À minha irmã, Eva Tacyanne, que mesmo nos momentos em que eu não acreditava em mim, manteve sua confiança inabalável e vibrou por cada conquista que alcancei.

Ao meu sobrinho, Lucca, e ao Natsu, que me cobriram com risadas e travessuras, me fazendo relaxar nos momentos essenciais, vocês encheram a memória do meu celular e transbordaram meu peito de amor.

À todos os amigos que ganhei durante essa jornada e que tornaram o percurso mais leve. Ao Vinícius, que preencheu meus dias com alegria, admiração, cuidado e que deixou Uberlândia menos cinzenta de morar. À Juliana Fadul, que foi calma em meio ao caos e a quem não precisava comunicar em palavras o que acontecia porque as nossas almas já estavam conversando entre si.

À Gabriela, Gabs, com que dividi trabalhos, estresse, alegrias, dores de cabeça e até uma casa, obrigada por compartilhar sua existência comigo e é uma honra compartilhar minha existência com você. Ao Erick, que não me deixou duvidar de mim mesma, que me abrigou na sua vida antes mesmo dessa trajetória começar e que seguiu deixando meus dias mais alegres, encontrei na nossa amizade o que nem imaginava precisar.

Agradeço aos professores da graduação por terem compartilhado tantos ensinamentos e aos professores que vieram antes da graduação, em especial Kelly e Maraíza, que tanto me apoiaram e me guiaram. Seus ensinamentos contribuíram para eu chegar até aqui.

À minha orientadora, Renata Zanon, a quem sou eternamente grata por ter me dado a oportunidade de fazer parte do LAMOC e ter compartilhado tanto conhecimento comigo. Você é um exemplo de mulher, cientista, professora, orientadora, obrigada por ser tanto e por todas as oportunidades.

À minha coorientadora, Natália Ferreira, que compartilhou comigo conhecimento, conselhos, planejamentos, inseguranças, oportunidades e que também se dedicou tanto para que esse projeto acontecesse. Você é minha inspiração.

Agradeço ao Professor Robson e ao pessoal do CITOGEM por terem me guiado em tantos passos para a execução desse trabalho.

À toda equipe do Ambulatório de Endocrinologia e Cirurgia Bariátrica do HC-UFU que tornaram possível a realização do recrutamento de voluntários e aos voluntários que se disponibilizaram em fazer parte dessa pesquisa.

À Profª Drª Elza T. Sakamoto Hojo do Departamento de Genética, FMRP-USP que realizou a doação das células utilizadas nesse estudo e ao Phelipe e Heitor que se disponibilizaram em trazê-las para o LAMOC.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig APQ-01483-22).

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

MARQUES, M.E.N. **Uso do soro de indivíduos com obesidade no estudo *in vitro* do núcleo celular em linhagem de glioblastoma humano**. 2024. 42p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2024.

O glioblastoma é caracterizado como uma das neoplasias malignas mais agressivas, possuindo taxa média de sobrevivência após o diagnóstico de 12 a 15 meses. Atualmente, os casos de obesidade atingiram níveis pandêmicos e se colocam como fator de risco para diversos tipos de cânceres, podendo contribuir com o desenvolvimento, progressão e sustentação do ambiente tumoral por meio de diversas vias. O estudo da arquitetura do núcleo celular emergiu como um campo promissor para a compreensão dos mecanismos subjacentes às neoplasias malignas. Dessa forma, no presente estudo analisou-se as alterações nucleares em cultura celular de glioblastoma humano quando exposta ao soro de pessoas com obesidade. Para tal, o soro de 12 voluntários, sendo 6 indivíduos com obesidade e 6 sem obesidade, foi coletado e utilizado para avaliação da instabilidade genética, por meio do ensaio de micronúcleo, e para avaliação da organização de cromatina com utilização do fluorocromo DAPI. Além disso, os questionários de qualidade de vida SF-36 e o questionário de Baecke foram aplicados para caracterização do perfil dos voluntários. Não houve diferença estatística significativa entre o grupo com obesidade e sem obesidade em relação às respostas dos questionários. Todavia, as células tratadas com o soro do grupo com obesidade apresentaram maior frequência de micronúcleos, maior área nuclear e menor presença de heterocromatina. Estudos adicionais são necessários para identificar componentes específicos que podem levar a essas alterações, mas esses resultados indicam que a obesidade favorece a instabilidade genética e induz alterações na organização da cromatina, que podem influenciar uma cascata de eventos propícia para a progressão do glioblastoma.

Palavras-chave: Câncer cerebral; Obesidade; Núcleo celular.

ABSTRACT

MARQUES, M.E.N. **Use of serum from obese individuals in the in vitro study of the cell nucleus in a human glioblastoma line.** 2024. 42p. Final paper (Monography) (Graduation in Biotechnology) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 2024.

Glioblastoma is characterized as one of the most aggressive malignant neoplasms with an average survival rate after diagnosis of 12 to 15 months. Currently, cases of obesity have reached pandemic levels, and it is a risk factor for various types of cancer, and may contribute to the development, progression and support of the tumor environment through various pathways. The study of cell nucleus architecture has emerged as a promising field for understanding the mechanisms underlying malignant neoplasms. Therefore, this study analyzed nuclear alterations in human glioblastoma cell cultures when exposed to serum from obese people. To this end, the serum of 12 volunteers, 6 of whom were obese and 6 of whom were not, was collected and used to assess genetic instability using the micronucleus assay and to assess chromatin organization using the fluorochrome DAPI. In addition, the SF-36 quality of life questionnaire and the Baecke questionnaire were used to characterize the profile of the volunteers. There was no statistically significant difference between the obese and non-obese groups in terms of the answers to the questionnaires. However, the cells treated with serum from the obese group showed a higher frequency of micronuclei, a larger nuclear area and a lower presence of heterochromatin. Further studies are needed to identify specific components that may lead to these changes, but these results indicate that obesity favors genetic instability and induces changes in chromatin organization, which may influence a cascade of events favourable to the progression of glioblastoma.

Keywords: Brain cancer; Obesity; Cell nucleus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hallmarks of cancer.....	11
Figura 2 – Fotomicrografia da linhagem U87MG.....	17
Figura 3 – Ensaio Micronúcleo	23
Figura 4 – Ensaio com DAPI	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise dos escores do questionário de Baecke.....	21
Tabela 2 - Análise dos escores dos domínios do SF-36.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O Câncer e o Sistema Nervoso Central	11
1.2. Obesidade e Gliomas	12
1.3. Alterações Nucleares, Câncer e Obesidade	14
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Cultura Celular	17
4.2. Soro dos voluntários.....	17
4.3. Caracterização do perfil dos voluntários	18
4.4. Avaliação da instabilidade genética por ensaio de micronúcleo	19
4.5. Avaliação da organização da cromatina.....	19
4.6. Análise Estatística	20
4.6.1. Questionários	20
4.6.2. Micronúcleo e organização da cromatina	20
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Caracterização do perfil dos voluntários	21
5.2. Avaliação da instabilidade genética por ensaio de micronúcleo	22
5.3. Avaliação da organização da cromatina.....	23
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
9. ANEXOS	35
9.1. Aprovação do CEP/UFU.....	35
9.2. Ficha de Avaliação	36
9.3. Questionário de atividade física habitual de Baecke.....	37
9.3.1. Cálculo dos escores do questionário Baecke	38
9.4. Versão brasileira do questionário de qualidade de vida – SF – 36	39
9.4.1. Cálculo dos escores do Questionário de Qualidade de Vida SF-36.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer e o Sistema Nervoso Central

A proliferação desordenada das células é um ponto em comum para mais de cem doenças que são abrangidas pelo termo câncer (INCA, 2022). Além disso, como ferramenta de compreensão da complexidade genotípica e fenotípica que os cânceres possuem, Hanahan e Weinberg (2000), propuseram as Marcas do Câncer (do inglês, *Hallmarks of cancer*) que englobam características cruciais adquiridas pelas células para formação de cânceres e com o avanço da oncologia molecular, essas marcas seguem sendo atualizadas.

Atualmente, são descritas quatorze marcas (**Figura 1**), sendo elas: evasão de supressores tumorais, evasão do sistema imune, potencial replicativo infinito, inflamação pró-tumoral, capacidade de invasão e metástase, angiogênese, instabilidade genômica e mutações, resistência a morte celular, desregulação do metabolismo energético, sinalização proliferativa sustentada, desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos, senescência celular (Hanahan, 2022).

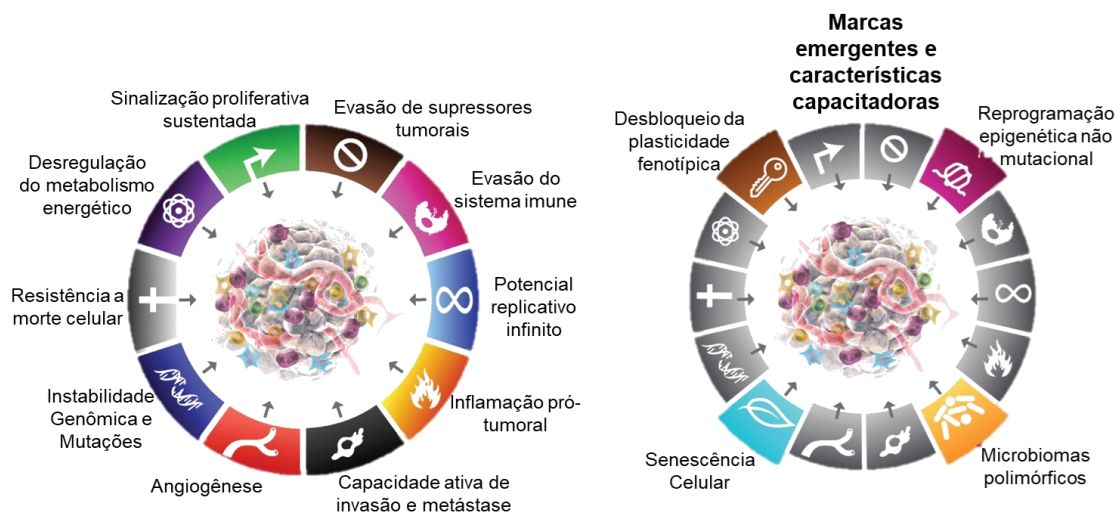


Figura 1: *Hallmarks of cancer*. Fonte: HANAHAN (2022) (adaptado).

Os tumores cerebrais referem-se a um grupo misto de neoplasias, originadas de tecidos intracranianos e das meninges, que variam de benignas a malignas (McKinney, 2004). Estes podem ser classificados em tumores primários ou secundários. Os tumores primários se originam diretamente no cérebro ou na medula espinhal, enquanto os secundários, se originam em outra região do corpo e sofrem metástase para o Sistema Nervoso Central (SNC) (NIH, 2023). Com base nos dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022) no Brasil, projeta-se a ocorrência de 11490 novos casos de câncer no SNC a cada ano, durante o triênio de 2023

a 2025. Estes tumores, de acordo com McNeill *et al.* (2016), estão associados a um aumento significativo na mortalidade e morbidade, contribuindo com aproximadamente 25% do total de óbitos relacionados ao câncer.

Os principais tipos de tumores primários do SNC são os gliomas e os meningiomas, representando 70% e 20% dos tumores cerebrais, respectivamente (Sergentanis *et al.*, 2015). Os meningiomas são geralmente caracterizados como neoplasias benignas de crescimento lento, originados de células meningoteliais (Ogasawara; Philbrick; Adamson, 2021). Por outro lado, os gliomas pertencem ao grupo dos tumores cerebrais malignos mais frequentes, é originado de células gliais ou precursoras e são considerados tumores infiltrativos altamente difusos que afetam o tecido cerebral circundante (Mesfin; Ai-Dhahir, 2023).

Os critérios para a nomenclatura e diagnóstico de gliomas são definidos pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), na qual os gliomas são classificados em graus de 1 a 4, de acordo com sua malignidade (Louis *et al.*, 2021). A classificação leva em consideração o perfil histopatológico, genômico, transcriptômico e epigenético, de forma a contribuir com o diagnóstico e abordagens terapêuticas mais integradas. Quanto aos fatores de risco, uma pequena parcela de tumores cerebrais são devido a síndromes genéticas e susceptibilidade genética e a radiação ionizante se coloca como o único fator ambiental não contestado para tais tipos de tumores (Michaud, 2011).

Dentre os gliomas, o glioblastoma é identificado como grau 4 e é tido como uma das neoplasias malignas mais agressivas e também o tumor maligno primário mais comum do SNC (Grochans *et al.*, 2022). Estes representam um grande desafio terapêutico visto que apesar dos tratamentos agressivos, que incluem cirurgia combinada com quimioterapia e radioterapia, a taxa média de sobrevivência após o diagnóstico continua extremamente baixa, de 12 a 15 meses (Ahir; Engelhard; Lakka, 2020; Ostrom *et al.*, 2017).

1.2. Obesidade e Gliomas

As estatísticas acerca de sobrepeso e obesidade aumentaram drasticamente ao nível mundial e estima-se que, em 2025, 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso, sendo 700 milhões de indivíduos com obesidade (ABESO, 2019). Entre os anos de 1990 a 2019, as mortes globais por câncer atribuíveis ao elevado índice de massa corporal (IMC) saíram de 117,79 mil mortes para 462,55 mil e projeta-se um crescimento ainda maior para os próximos anos (Zhi *et al.*, 2022).

A obesidade é definida como uma doença crônica, multifatorial e neurocomportamental resultante do acúmulo excessivo de tecido adiposo e um desbalanço entre consumo e gasto de

energia (Izquierdo-Torres *et al.*, 2022). O IMC é utilizado para avaliar a massa corporal geral. Com base na classificação de 2000, adaptada pela OMS, convencionou-se chamar de sobrepeso pessoas com IMC entre 25 a 29,9 kg/m², de obesidade grau I para IMC entre 30-34,9 kg/m², de obesidade grau II para IMC entre 35-39,9 kg/m², obesidade grau III ou mórbida para IMC maior ou igual a 40 kg/m², e IMC normal entre 18,5-24,9 kg/m² (WHO, 2000).

Dados na literatura atestam a obesidade como fator envolvido no desenvolvimento e progressão de variados tipos de cânceres (Nimptsch; Pischon, 2015). Abrangendo o câncer de mama (Chan *et al.*, 2014), colorretal (Kocarnik *et al.*, 2016), da tireoide (Renehan *et al.*, 2008; Wolin *et al.*, 2010), múltiplo mieloma (Marques-Mourlet *et al.*, 2023), pancreático (Xu *et al.*, 2018) e a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) confirma efeito preventivo do câncer na ausência de excesso de gordura corporal para tais tipos (Lauby-Secretan *et al.*, 2016).

Embora existam fortes evidências para a associação entre a obesidade e os demais tipos de câncer, resultados conflitantes foram relatados sobre a relação entre a obesidade e os gliomas. Alguns estudos reconhecem que a obesidade não tem uma relação clara com a ocorrência de cânceres cerebrais (Cote *et al.*, 2018; Disney-Hogg *et al.*, 2018; Niedermaier *et al.*, 2015). Zhang *et al.* (2016) destacam em seus estudos que o excesso de peso corporal está associado ao maior risco de ocorrência de meningiomas, mas não de gliomas. Complementarmente, a IARC considera que há insuficiência de dados contundentes para estabelecer uma associação entre obesidade e gliomas, mas reconhece a relação entre excesso de peso corporal e a incidência de meningiomas (Lauby-Secretan *et al.*, 2016).

Ainda, Wiedmann e colaboradores (2017) reconhecem que a obesidade não está associada ao risco de gliomas, enquanto Kuan *et al.* (2019) sugerem que a dieta pode não desempenhar um papel na incidência do glioma. Adicionalmente, em uma pesquisa que utilizou randomização mendeliana para investigar a relação entre estilo de vida, fatores dietéticos e sua influência no risco de gliomas, os autores não identificaram associações relevantes (Saunders *et al.*, 2020).

Em contrapartida, em um estudo de coorte prospectivo, Moore e colaboradores (2009) identificaram que indivíduos que apresentaram obesidade aos 18 e 35 anos possuíam um risco significativamente maior de desenvolver glioma posteriormente na vida, em comparação com indivíduos com IMC normal nessas mesmas faixas etárias. De forma semelhante, Ahn e colaboradores (2021) demonstraram que indivíduos com excesso de peso corporal apresentavam um maior risco de desenvolver glioma do que aqueles com peso normal.

Adicionalmente, utilizando linhagens celulares Almeida *et al.* (2019) evidenciaram que fatores liberados pelos adipócitos estão relacionados com a angiogênese do glioma, seu

crescimento e comportamento metabólico, atestando assim a associação entre gliomas e obesidade. Corroborando a esses achados, Benson e colaboradores (2008) em um estudo de coorte prospectivo com 1,3 milhões de mulheres de meia idade, constataram que a incidência de gliomas e meningiomas aumentava com o aumento do IMC. Ademais, estudos que avaliaram o peso corporal em relação à sobrevivência de indivíduos com glioma revelaram taxas de mortalidade mais elevadas em indivíduos com excesso de peso (Chambless *et al.*, 2012; Siegel *et al.*, 2013).

Dado este contexto, não está claro quais mecanismos podem estar envolvidos nessas relações. Os genes que influenciam a obesidade são altamente expressos no cérebro e também podem mediar a suscetibilidade ao glioma (Benson *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2009). A obesidade pode atuar em diversas vias de promoção ao câncer, como por meio da resistência crônica à insulina, aumento da síntese de leptina e aumento da atividade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), além de poder estar interligada com alterações nucleares (Lawrence *et al.*, 2012; Renehan *et al.*, 2008; Usman; Volpi, 2018).

1.3. Alterações Nucleares, Câncer e Obesidade

O desenvolvimento e sustentação do ambiente tumoral é um processo complexo e multifacetado que envolve vias celulares e moleculares. As alterações nucleares, como a instabilidade genética e alterações na organização da cromatina, desempenham um papel significativo nesse processo e assim, o estudo da arquitetura nuclear frente a essas alterações emerge como um campo promissor para a compreensão dos mecanismos subjacentes às neoplasias malignas.

A instabilidade genética pode ser definida como um estado dinâmico caracterizado por taxas elevadas de alterações genéticas resultantes de disfuncionalidades do ciclo celular ou de eventos que afetam a integridade do DNA (Usman *et al.*, 2021). Ela é uma característica facilitadora para o processo da tumorigênese, sendo considerada um dos *Hallmarks* do câncer (Hanahan, 2022).

Associações entre danos no DNA e instabilidade genômica com a obesidade foram abordadas anteriormente na literatura (Negrini *et al.*, 2010; Usman *et al.*, 2021; Usman; Volpi, 2018). Estudos conduzidos por Włodarczyk *et al.* (2018) demonstraram níveis de danos no DNA quase duas vezes maiores em grupos de mulheres com obesidade em relação ao grupo sem obesidade, corroborando os resultados de Tomasello *et al.* (2011), que reconheceram que a obesidade pode ser considerada um fator de risco para lesões ao DNA.

Adicionalmente, estudos reportaram que lesões no DNA associados à obesidade levaram

ao aumento da resistência a apoptose, contribuíram com a angiogênese e induziram alterações na expressão gênica, favorecendo assim a proliferação e migração de células tumorais (Cerdá *et al.*, 2014; Kabzinski *et al.*, 2016; Włodarczyk; Nowicka, 2019).

Dentre as principais marcas de danos ao DNA estão a formação de micronúcleos. Esses micronúcleos são reconhecidos como marcadores de estresse genotóxico e instabilidade genômica (Usman; Volpi, 2018). Por definição, os micronúcleos representam corpos extranucleares dentro do citoplasma celular, contendo fragmentos cromossômicos resultantes de eventos clastogênicos, que envolvem a quebra dos cromossomos, ou contendo cromossomos inteiros, advindos de eventos aneugênicos que são caracterizados pela segregação anormal dos cromossomos (Krupina; Goginashvili; Cleveland, 2021; Usman; Volpi, 2018).

Na literatura, estudos relataram aumento de frequência de micronúcleos em linfócitos derivados do sangue periférico em pacientes diagnosticados com câncer (Bonassi *et. al.*, 2011; Iarmarcovai *et. al.*, 2008; Murgia *et. al.*, 2008). Além disso, a formação de micronúcleos têm sido associada ao fenômeno da cromotripsia, um processo mutacional que permite rearranjos mutagênicos nos cromossomos e que está intrinsicamente relacionado ao câncer (Zhang *et. al.*, 2015). Esses rearranjos, por meio de ciclos mitóticos subsequentes, são passados para as células filhas e possuem um papel crítico na arquitetura nuclear e genômica, estando envolvidos na perda da função supressora de tumor e na ativação de oncogenes (Krupina; Goginashvili; Cleveland, 2021; Simovic; Ernst, 2022).

Somando-se à instabilidade genética, a organização da cromatina têm desempenhado um papel importante no ambiente tumoral. A cromatina refere-se à um conjunto de DNA, proteínas histônicas e não-histônicas presentes no núcleo das células. A camada mais básica deste conjunto são os nucleossomos que são constituídos de 146 pares de base de DNA enrolados em um octâmero contendo duas de cada uma das quatro proteínas centrais de empacotamento de DNA: histonas H2A, H2B, H3 e H4A (Carvalho; Recco-Pimentel, 2007).

A organização hierárquica da cromatina garante a compactação necessária para acomodar todo o DNA celular no núcleo e também regula o acesso a fatores transcripcionais, de reparo ou replicativos, assegurando a funcionalidade e integridade do genoma (Sehgal; Chaturvedi, 2023). Além disso, a cromatina pode ser funcionalmente dividida em dois subtipos, eucromatina e heterocromatina. A eucromatina possui uma organização relaxada e é transcricionalmente ativa, e a heterocromatina é condensada e transcricionalmente silenciada (Janssen; Colmenares; Karpen, 2018).

Estudos na literatura apontam a perda da heterocromatina como um fenômeno recorrente envolvido no estabelecimento e progressão de eventos neoplásicos (Douet *et. al.*, 2017; Oh;

Gertych; Tajbakhsh, 2013; Somsuan *et. al*, 2019). A redução da compactação da cromatina afeta sua mobilidade e conduz a uma perda da rigidez nuclear. Esses aspectos podem servir como eventos oncogênicos secundários, facilitando futuras translocações cromossômicas e promovendo instabilidade genética (Sehgal; Chaturvedi, 2023).

Suplementarmente, Garske e colaboradores (2023) demonstraram que o ambiente obesogênico perturba o funcionamento adequado dos pré-adipócitos através de alterações na organização e acessibilidade da cromatina de forma que há um impulsionamento na inflamação relacionada à obesidade. Essa inflamação, por sua vez, afeta a estabilidade genômica, modula a expressão gênica e é um fator de risco para lesões ao DNA.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da relação entre alterações nucleares e o câncer têm ganhado destaque na literatura e se mostrado um campo promissor, todavia, a influência da obesidade nesses processos, em especial no que tange o comportamento de gliomas, ainda carece de maiores informações. Além disso, a incidência e a prevalência de obesidade na população mundial tornam evidente a relevância das investigações acerca da influência dessa patologia no desenvolvimento e/ou progressão das neoplasias malignas.

O presente estudo objetivou contribuir com o melhor entendimento de como substâncias presentes no sangue de pessoas com obesidade podem influenciar o comportamento celular de glioblastoma *in vitro*. Com foco em alterações nucleares, a pesquisa pode fornecer insights valiosos sobre os mecanismos celulares e moleculares que envolvem essa interação. Isso pode levar à identificação de alvos terapêuticos específicos e contribuir com estratégias para a prevenção, diagnóstico e tratamento dessas patologias.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar as alterações nucleares em cultura celular de glioblastoma humano, U87MG, quando exposta ao soro de pessoas com obesidade.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterização do perfil dos voluntários;
- Avaliação da instabilidade genética por meio de ensaio de micronúcleo;
- Avaliação da organização da cromatina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem celular de glioblastoma humano, U87-MG (**Figura 2**), doada pela Prof^a Dr^a Elza T. Sakamoto Hojo, Departamento de Genética, FMRP-USP. Considerando uma área de 75 cm², o meio de base para a linhagem consistiu em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM ou DMEM), 1% de antibiótico e suplementação com 10% de soro fetal bovino. As condições da cultura em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37°C.

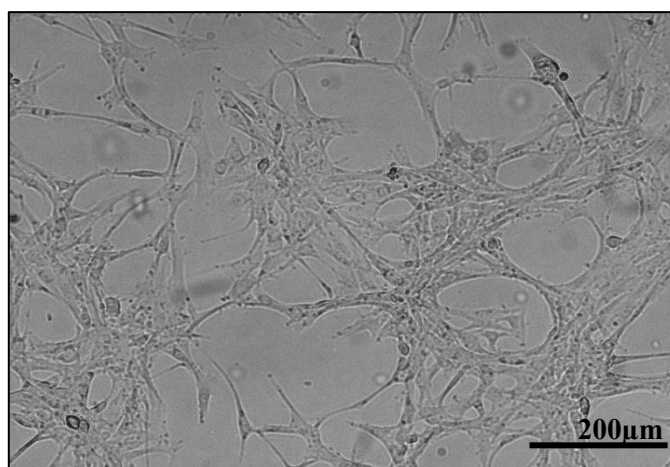


Figura 2- Fotomicrografia da linhagem U87MG, escala de 200µm. Fonte: O autor, 2024.

4.2. Soro dos voluntários

O soro de pacientes obesos e não obesos foram adquiridos por meio do Ambulatório de Endocrinologia e Cirurgia Bariátrica do HC-UFU (**Autorização CEP-UFU Anexo 9.1**). Foram utilizados o soro de 6 pacientes portadores de obesidade e de 6 pacientes não obesos. O grupo dos voluntários com obesidade foi representado pela sigla OB e o grupo de voluntários sem obesidade representou o grupo controle, indicado pela sigla NO.

Os critérios de inclusão para voluntários com obesidade foram: portadores de obesidade tipo I e II (IMC entre 30-39,9 kg/m²), pessoas que não realizavam mais de 150 minutos de atividade física por semana, valor de referência adotado pela OMS para estabelecimento do quadro de sedentarismo, indivíduo que não tivesse histórico de câncer na família (parente de primeiro grau) diagnosticado até o momento do recrutamento. Os critérios de exclusão para tal grupo foram: menores de 18 anos, diagnóstico prévio de câncer, com episódios de infecções recente, com doenças inflamatórias crônicas, com doenças neurodegenerativas, com uso de anti-inflamatórios, portadores de síndromes genéticas, com alterações cognitivas e indivíduos pós-bariátrica.

Os critérios de inclusão para o grupo sem obesidade foram: participantes sem obesidade (IMC entre 18,5kg/m² e 24,9kg/m²) que não realizam mais de 150 minutos de atividade física por semana, que não tenha histórico de câncer na família (parente de primeiro grau) e que não possuam doenças crônicas metabólicas associadas (*diabetes mellitus*, hipertensão arterial e hipercolesterolemia). Os critérios de exclusão para tal grupo foram: pessoas menores de 18 anos, diagnóstico prévio de câncer, com episódios de infecções recente, com doenças inflamatórias crônicas, com doenças neurodegenerativas, com uso de anti-inflamatórios, portadores de síndromes genéticas e com alterações cognitivas.

4.3. Caracterização do perfil dos voluntários

Para identificar informações de saúde e comorbidades associadas, qualidade de vida e rotina de atividade física foram aplicados uma ficha de avaliação (**anexo 9.2**), o ‘*Questionário de atividade física habitual de Baecke*’ (**anexo 9.3**) e a ‘*Versão brasileira do questionário de qualidade de vida – SF – 36*’ (**anexo 9.4**).

O Questionário de atividade física habitual de Baecke é indicado para estudos epidemiológicos no Brasil e é aplicado de forma rápida e eficaz. Esse questionário possibilita que a atividade física seja investigada para além da atividade que inclui somente exercícios físicos, como caminhadas, academia, corridas, mas permite também que seja analisado as atividades realizadas durante o momento de trabalho, de lazer, locomoção. Dessa forma, ele conta com 16 questões, que abrangem três domínios de atividade física: atividade física ocupacional (AFO- Q1 a Q8), atividade física de lazer (AFL – Q9 a 12) e atividade física de lazer e locomoção, excluindo exercícios físicos (ALL – Q13 a Q16).

Para análise do questionário Baecke, utiliza-se a escala de resposta psicométrica, desenvolvida por Likert (1932), utilizada habitualmente em questionário e em pesquisas de opinião para se obter o escore. Os escores para AFO, AFL, ALL e o escore total de atividade física são obtidos conforme fórmulas e parâmetros especificados no **Anexo 9.3.1** e a medida que o nível de atividade física aumenta, o escore é aumentado (Florindo; Latorre, 2003).

O questionário SF-36 (Short-Form Health Survey) é um instrumento de qualidade de vida multidimensional que foi desenvolvido em 1992 por Ware e Sherbourne e validado no Brasil por Ciconelli *et al.* (1999). Ele inclui questões relacionadas à saúde e quesitos relacionados à capacidade de desempenhar atividades habituais, sendo dividido em oito domínios: capacidade funcional, limitação aspectos físicos, dor, vitalidade, aspectos sociais, limitação aspectos emocionais, estado geral de saúde e saúde mental. Para a avaliação dos resultados do SF-36 calcula-se um escore para cada domínio conforme as fórmulas e parâmetros

estabelecidos no **Anexo 9.4.1**. Posteriormente, os escores são transformados em uma escala de 0 a 100, onde zero corresponde a um pior estado de saúde e 100 a um melhor, sendo analisada cada dimensão em separado.

4.4. Avaliação da instabilidade genética por ensaio de micronúcleo

A genotoxicidade das linhagens tumorais frente a adição do soro de voluntários com obesidade e sem obesidade foi avaliada por ensaio de micronúcleo *in vitro* de acordo com a OCDE (2010); protocolo com pequenas modificações (Araldi *et al.*, 2015). Para a realização do ensaio, 2×10^4 células de glioblastoma, U-87MG, foram dispostas em placas de cultura de 96 poços. Após 4 horas mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, para aderência inicial, foi adicionado 10% de soro dos voluntários OB/NO. Foi utilizado um controle negativo que recebeu adição do meio DMEM e grupos controle positivos, aos quais foram adicionados a droga com comprovada atividade mutagênica Colchicina (0,01 µg/ml), responsável por eventos aneugênicos, e a droga Mitomicina C (2 µg/ml), associada a eventos clastogênicos.

As células foram incubadas com os tratamentos por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas com o tratamento, o sobrenadante dos poços foi retirado e a citocalasina B (2,5 µg/ml) foi adicionada e mantida por mais 24 horas a 37 °C e 5% CO₂. A citocalasina B atua se ligando aos microfilamentos de actina de forma com que as células que passam por divisão celular se tornam binucleadas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida fixadas com formol 10% diluído em PBS 1x. As células foram incubadas a 4 °C overnight. Para remoção do fixador foi usado PBS 1x e posteriormente foi adicionado o fluorocromo Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 µM, com intuito de marcar o DNA da célula, sendo incubada por 20 min a 37°C no escuro. As imagens foram capturadas com aumento de 20x no microscópio invertido de fluorescência Evos (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA). As análises prosseguiram com a contagem de um valor mínimo de 1000 células binucleadas por poço e apenas os micronúcleos presentes em células binucleadas foram considerados.

4.5. Avaliação da organização da cromatina

A organização da cromatina da linhagem de glioblastoma frente a adição do soro dos grupos OB e NO foi avaliada por ensaio de marcação com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) conforme Wavelet-Vermuse *et al.* (2022), protocolo com pequenas modificações (SILVA, *et al.*, 2023). Para tal, 2×10^4 células da linhagem U-87MG foram dispostas em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, foi adicionado

10% de soro dos voluntários OB/NO. Foi utilizado um controle negativo que não recebeu adição do soro dos voluntários. As células foram incubadas com os tratamentos por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas com o tratamento, foram lavadas com PBS 1x e em seguida fixadas com formol 10% diluído em PBS 1x. Após 10 minutos em temperatura ambiente, o fixador foi removido por meio de lavagem com PBS 3x5' e posteriormente foi adicionado o fluorocromo DAPI na concentração de 1µg/ml, diluído em 5ml de PBS (0,01M) e 5ml de glicerol.

As imagens foram capturadas por meio do filtro UV, com aumento de 20x, através do microscópio *Nikon Tsi* (Nikon, Japão). A análise da cromatina foi realizada por medida de densidade integrada, através do software ImageJ. Os parâmetros do microscópio e da câmera foram padronizados e aplicados para todos os grupos. As etapas a seguir foram realizadas para a análise da cromatina de pelo menos 150 núcleos por poço, totalizando 900 núcleos por grupo estudado: 1) Image > Color > Split channels; 2) select the blue (DAPI) channel; 3) Process > Subtract background (Rolling ball radius = 130 – diâmetro médio do núcleo em pixels); 4) Image > Adjust > Threshold (Auto); 5) Analyze > Set measurements > Integrated density and area; 6) Measure command (Silva, 2023). Sequencialmente, foi calculado a área de cada núcleo (área em µm²), para observar possíveis diferenças entre os grupos.

4.6. Análise Estatística

4.6.1. Questionários

Para a análise estatística dos questionários, os valores dos domínios foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, para dados paramétricos empregou-se o teste t student e para dados não paramétricos utilizou-se o teste Mann-Whitney. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. As diferenças de significância foram determinadas usando o programa GraphPad Prism 6.0 assumindo um intervalo de confiança de 95% (p <0,05).

4.6.2. Micronúcleo e organização da cromatina

Os ensaios destes ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados numéricos foram analisados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e aplicado Anova *one way* com pós teste de Dunnett para os ensaios de micronúcleo e pós teste de Tukey para as análises com DAPI. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. As diferenças de significância foram determinadas usando o programa GraphPad Prism 6.0 assumindo um intervalo de confiança de 95% (p <0,05).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do perfil dos voluntários

Os voluntários recrutados possuíam média geral de idade de 37 anos e ambos os grupos (OB e NO) contaram com 3 homens e 3 mulheres cada. Por meio da Ficha de Avaliação foi constatado que os voluntários não apresentavam comorbidades associadas como hipercolesterol e *diabete mellitus*, com exceção de apenas um voluntário do grupo com obesidade que apresentou histórico de hipertensão arterial. Além disso, com exceção de um indivíduo em cada grupo, não foi constatado a prática de atividades regulares na rotina dos participantes. Os voluntários que praticavam atividade regular não excediam, entretanto, 150 minutos de atividade semanal, validando suas participações nos estudos.

A **Tabela 1** apresenta a comparação de média e erro padrão entre os domínios do questionário de Baecke e o escore total de atividade física. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para os domínios de AFO, AFL e ALL, evidenciando que os voluntários apresentavam, no geral, níveis de atividade semelhantes. Em relação ao escore total do questionário, o grupo NO obteve média de escore de 6,83 enquanto o grupo OB obteve escore de 6,12, não tendo também diferença significativa entre os grupos para esse parâmetro.

Tabela 1– Análise dos escores do questionário de Baecke

Baecke	NO	OB	p-value
	média ± erro padrão	média ± erro padrão	
Escore AFO	2,70 (0,22)	2,91 (0,26)	0,63
Escore AFL	1,95 (0,11)	1,50 (0,24)	0,19
Escore ALL	2,16 (0,24)	1,75 (0,28)	0,29
Escore Total	6,83 (0,43)	6,12 (0,60)	0,36

Teste t student foi aplicado para ALL e Escore Total, demais seguiram com teste de Mann-Whitney. Legenda: Atividade Física Ocupacional (**AFO**), Atividade Física no Lazer (**AFL**), Atividade Física Lazer e Locomoção (**ALL**).

Apresenta-se na **Tabela 2** os dados em relação ao questionário de qualidade de vida SF-36, em que não foi encontrado diferença estatística significativa entre os grupos para os oito domínios estudados. Observa-se, todavia, que apenas o grupo dos voluntários sem obesidade chegou a obter escores maiores do que 90 dentre os domínios (quanto mais próximo de 100, maior é qualidade de vida), mas também foram o grupo que apresentaram os menores escores, 50,83 e 57,83, para os domínios de vitalidade e dor, respectivamente.

Tabela 2 - Análise dos escores dos domínios do SF-36

Domínio SF-36	NO	OB	p-value
	média ± erro padrão	média ± erro padrão	
Capacidade Funcional	96,67 (3,33)	85 (7,63)	0,19
Limitação Aspectos Físicos	95,83 (4,16)	70,83 (18,73)	0,45
Dor	57,83 (9,83)	72,17 (8,51)	0,29
Estado Geral da Saúde	60,83 (9,98)	68,83 (5,69)	0,90
Vitalidade	50,83 (9,61)	61,67 (9,18)	0,52
Aspectos Sociais	83,33 (16,6)	87,50 (12,5)	>0,99
Limitação Aspectos Emocionais	66,67 (21,0)	66,67 (21,0)	>0,99
Saúde Mental	68 (11,07)	74 (7,43)	0,77

Teste t student foi aplicado para o domínio Dor e os demais seguiram com aplicação do teste de Mann-Whitney.

5.2. Avaliação da instabilidade genética por ensaio de micronúcleo

A **Figura 3A** apresenta fotomicrografias das células binucleadas com destaque para aquelas contendo micronúcleos, as quais foram consideradas para as análises de frequência.

Na **Figura 3B** têm-se as frequências de micronúcleos encontrados em células binucleadas em que observou-se uma maior frequência no grupo OB quando comparado ao grupo controle negativo tratado com DMEM ($p < 0,0001$). Foi encontrado também maior frequência de micronúcleos nas células tratadas com o soro do grupo OB em relação as células tratadas com o soro do grupo NO (**Figura 3C**).

Além disso, verificou-se a presença significativa de micronúcleos nos grupos controle positivos tratados com colchicina e mitomicina C ($p < 0,0001$ e $p = 0,0037$, respectivamente), todavia, não foi encontrado frequência significativa de micronúcleos no grupo NO quando comparado ao controle negativo ($p = 0,4790$).

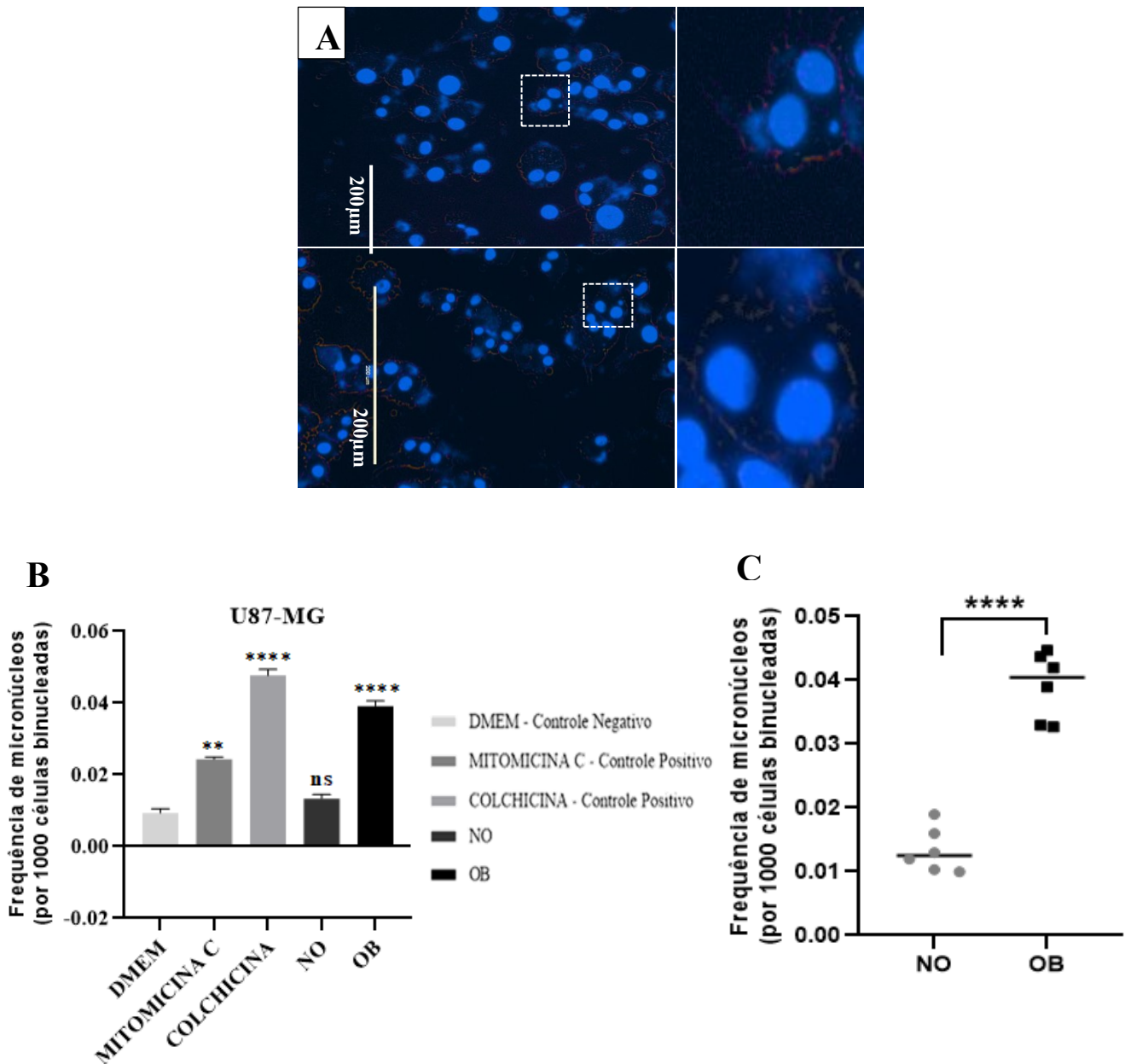


Figura 3 – Ensaio Micronúcleo - Células após o ensaio de micronúcleo fotografadas através do microscópio de fluorescência Evos, aumento de 20x, destacando células binucleadas contendo micronúcleos (A). Análise de frequência de micronúcleos (B) com os diferentes tratamentos sendo comparados ao controle DMEM por análise de ANOVA *one way* com pós teste de Dunnett. (C) Análise de frequência comparando o grupo NO e OB. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; ns-não significativo. Escala de 200µm.

5.3. Avaliação da organização da cromatina

A **Figura 4** apresentam a análise dos núcleos corados com DAPI para investigação da organização da cromatina e área nuclear. A densidade integrada foi medida em 900 núcleos por grupo, NO e OB, e representa a quantidade de heterocromatina. Assim, quanto menor a densidade integrada, menor o valor da heterocromatina e consequentemente, maior é o valor da eucromatina no núcleo.

Os resultados mostraram que as células da linhagem U87-MG, tratadas com o soro dos indivíduos com obesidade apresentaram menor densidade integrada quando comparadas ao grupo controle DMEM ($p = 0,0293$) (**Figura 4A**) e ao grupo NO ($p = 0,0395$) (**Figura 4B**), indicando assim maiores níveis de eucromatina nos núcleos desse grupo.

Além disso, foi realizada a análise da área nuclear (**Figura 4C**) em que observou-se maiores áreas nas células tratadas com o soro do grupo OB, com uma área média de $150\mu\text{m}^2$, quando comparado ao grupo NO, que apresentou área média de $143\mu\text{m}^2$. A área nuclear das células tratadas com o controle DMEM, área média de $145\mu\text{m}^2$, não apresentou significância estatística quando comparada ao grupo OB. Em ambas análises as células tratadas com o soro do grupo NO não diferiram significativamente das células do controle DMEM.

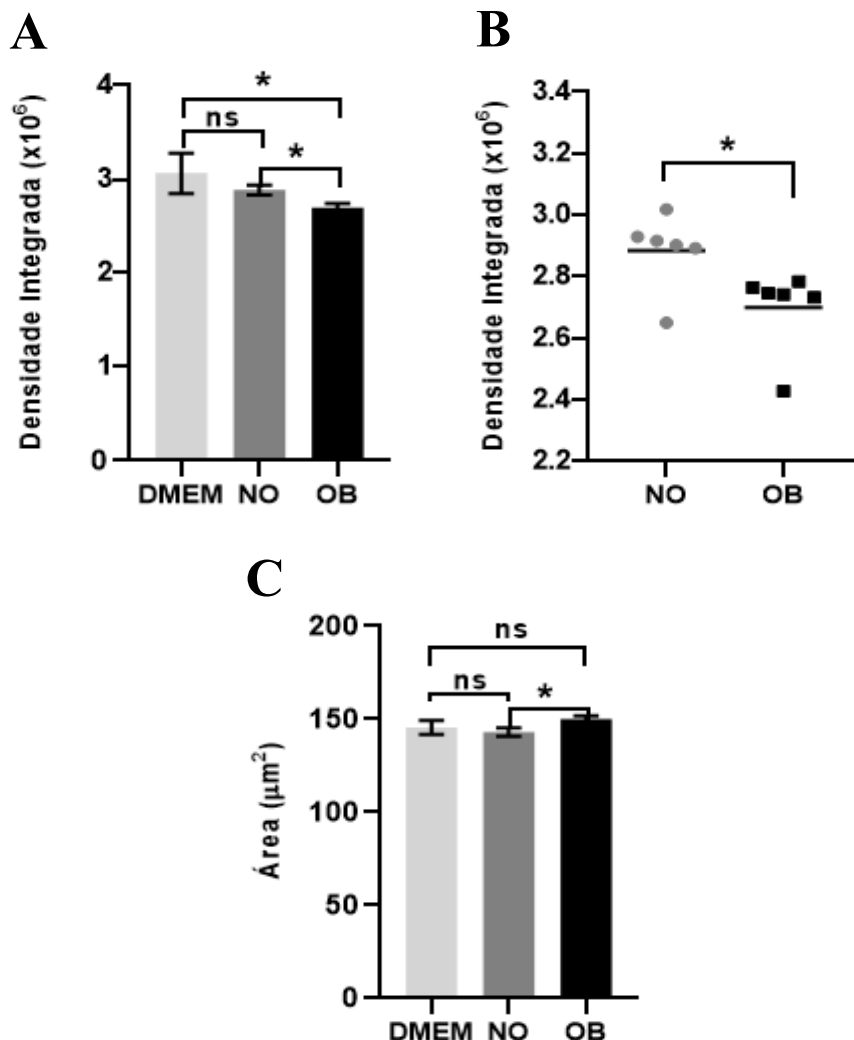


Figura 4 – Ensaio com DAPI: Densidade integrada e área nuclear obtida por meio da análise ANOVA one way com pós teste de Tukey. Células tratadas com soro dos voluntários com obesidade (grupo OB) apresentaram menor densidade integrada (A) quando comparada ao controle negativo DMEM e ao grupo sem obesidade (NO) (B) ($p=0,0293$ e $p=0,0395$, respectivamente). O grupo OB apresentou maior área nuclear (B) em relação ao grupo NO ($p=0,0389$) e não houve diferenças significativas entre as células tratadas com DMEM e o grupo OB ($p=0,3965$). * $p<0,05$; ns-não significativo.

6. DISCUSSÃO

Indivíduos com obesidade apresentam taxas elevadas de comportamento sedentário e inatividade física (Silveira *et al.*, 2022). Por outro lado, estudos na literatura mostram que a atividade física pode agir como efeito modificador da gordura corporal e, consequentemente, contribuir com a diminuição de vários tipos de cânceres (Dieli-Conwright *et al.*, 2016; Friedenreich, Ryder-Burbidge, McNeil, 2021; Neil-Sztramko *et al.*, 2017). Nesse contexto, como tentativa de eliminar possíveis interferências ocasionadas pela prática de atividade física buscou-se a presença de comportamento sedentário nos grupos OB e NO. Além disso, o uso do questionário de Baecke permitiu uma avaliação ampla dos diferentes tipos de atividades físicas praticadas, proporcionando assim um melhor entendimento do perfil dos voluntários recrutados.

Os resultados obtidos mostraram que ambos os grupos mantinham hábitos de atividade física semelhantes e os valores obtidos no escore total de atividade física não diferiram estatisticamente entre si, tendo sido alcançado 6,83 para o grupo NO e 6,12 para o grupo OB. Esses valores atestam a baixa taxa de atividade física praticada pelos voluntários, considerando diferentes domínios e, se contrastam significativamente com os valores encontrados por Renz e Macedo (2020), em que indivíduos com sobrepeso e obesidade apresentaram escore total de atividade física de 14,3 após intervenções com atividade física diárias.

O questionário de qualidade de vida SF-36 têm sido uma ferramenta amplamente utilizada para medir a qualidade de vida em indivíduos com obesidade. No presente estudo não foi identificado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as pontuações dos domínios do SF-36. Em contrapartida, em estudos de maiores coorte, como de Livingston e Ko (2002) e Battisti *et al.* (2017) foi encontrado que a qualidade de vida declina conforme há aumento do IMC. De forma similar, Moraes (2004), em um grupo de 45 mulheres, verificou que mulheres com obesidade apresentavam maiores limitações na qualidade de vida quando comparadas às mulheres sem obesidade. E, é válido ressaltar que grande parte dos voluntários com obesidade destes estudos apresentavam comorbidades como hipertensão arterial, *Diabetes mellitus* e complicações cardiovasculares que afetaram diretamente a qualidade de vida.

Desse modo, os resultados encontrados podem ter sido influenciados pelo pequeno número amostral utilizado e pela ausência quase total de comorbidades associadas à obesidade apresentadas pelos voluntários recrutados. Ademais, o quadro de sedentarismo apresentado por ambos os grupos, pode ter influenciado os resultados obtidos, visto que o domínio de vitalidade foi o que obteve as menores pontuações, 50,83 para o grupo NO e 61,67 para o grupo OB.

Em relação aos experimentos com a linhagem celular, as células de glioblastoma tratadas

com o soro do grupo com obesidade apresentaram frequência de micronúcleos significativamente elevada em relação aos grupos controles utilizados. Esses resultados estão em conformidade com o que é relatado na literatura. Scarpato *et al.* (2011), por exemplo, detectaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em linfócitos periféricos de crianças com obesidade/sobrepeso em relação às crianças sem obesidade, evidenciando assim um comprometimento da integridade e estabilidade celular.

Ainda, estudos como o de Donmez-Altuntas *et al.* (2014) e Santovito e Gendusa (2020), destacaram que a frequência de micronúcleos está positivamente correlacionada com o aumento do IMC. E, de forma complementar, Bankoglu *et al.* (2018) demonstraram que a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica resultou em uma redução significativa na frequência de micronúcleos, fortalecendo as evidências da influência da obesidade na indução de efeitos genotóxicos.

Zhang e colaboradores (2015) evidenciaram, através de seus estudos, que os micronúcleos induzem a ocorrência da cromotripsia. A cromotripsia oferece um mecanismo para o rápido acúmulo de centenas de rearranjos genômicos em algumas divisões celulares. Esse evento cataclísmico pode estar envolvido na patogênese de tumores agressivos de crescimento acelerado, como o glioblastoma com mutação no Gene Isocitrato Desidrogenase (IDH) caracterizado por numerosas aberrações cromossômicas e altos níveis de instabilidade genética (Ah-Pine, 2021; Cortés-Ciriano *et al.*, 2020; Lewis, Golsreyn, 2016).

Estudos recentes envolvendo 2658 tumores de 38 tipos de câncer, identificaram presença de cromotripsia em 29% dos tumores, com 100% dos liposarcomas analisados, 85% de osteosarcomas e 84% de glioblastomas possuindo ao menos um evento de cromotripsia em seus genomas (Cortés-Ciriano *et al.*, 2020). Complementarmente, Ah-Pine e colaboradores (2021) analisando cromotripsia em glioblastomas identificou 30 fusões genéticas com potenciais atividades oncogênicas que contribuíam para o desenvolvimento, progressão e agressividade do tumor.

A perturbação do genoma ocasionada por eventos que promovem a instabilidade genética confere aos tumores capacidades evolutivas melhoradas devido ao aumento da heterogeneidade intratumoral e facilita a resistência adaptativa às terapias (Tijhuis, Johnson, McClelland, 2019). Somando-se à esses resultados, a análise da organização da cromatina mostrou que as células tratadas com o soro do grupo OB apresentaram maiores níveis de eucromatina e maior área nuclear. Foi relatado anteriormente que células cancerígenas com núcleos aumentados e cromatina difusa demonstravam ter maior resistência a terapias anticancerígenas (Braadland, Urbanucci, 2019; Wavelet-Vermuse, 2022).

Além disso, Zhu e colaboradores (2011) demonstraram que a redução da heterocromatina em câncer de mama e ovário levavam a deficiência do BRCA1, um importante supressor de tumor para esses tipos de cânceres. Suplementarmente, sabe-se que a perda da heterocromatina nas células cancerosas, em particular na cromatina pericentromérica e telomérica, provoca um aumento na instabilidade genética que, por sua vez, está envolvida na alteração da expressão gênica, sustentação e desenvolvimento tumoral (Gurrion *et al.*, 2017; Millanes-Romero *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2011).

É válido ressaltar que a Temozolomida e Carmustina, drogas usualmente utilizadas no tratamento de gliomas, incluem como mecanismos de ação alteração na organização nuclear e indução do aumento da heterocromatina (Papait *et al.*, 2009). Ademais, os resultados da análise da área nuclear convergem com os dados encontrados na literatura, em que tipicamente células cancerígenas são caracterizadas por morfologia e tamanho anormal do núcleo celular (Sehgal, Chaturvedi, 2023). Fischer *et al.* (1998) e Debes *et al.* (2005) observaram em suas pesquisas que o aumento da expressão de vários oncogenes envolvidos, por exemplo, na proliferação tumoral e evasão imune, levavam à alteração do volume nuclear.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou a influência da obesidade sob alterações nucleares na linhagem U-87MG de glioblastoma humano. Por meio dos ensaios de efeito genotóxico e avaliação da organização da cromatina foi encontrado um aumento expressivo na frequência de micronúcleos, redução da heterocromatina e aumento da área nuclear nas células de glioblastoma, que receberam o tratamento com soro de indivíduos obesos. Esses resultados podem influenciar uma cascata de eventos propícia para a progressão do glioblastoma. Assim, a obesidade se coloca não somente como um fator de risco para a instabilidade genética, mas contribui também com alterações na organização da cromatina que impactam a expressão gênica das células.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIR, B. K.; ENGELHARD, H. H.; LAKKA, S. S. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 2461–2478, 2020.

AHN, S. *et al.* Associações de obesidade geral e abdominal com o risco de desenvolvimento de glioma. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 12, p. 2859, 2021.

AH-PINE, F. *et al.* RNA-sequencing of IDH-wild-type glioblastoma with chromothripsis identifies novel gene fusions with potential oncogenic properties. **Translational Oncology**, v. 14, n. 1, p. 100884, 2021.

ALMEIDA, J. *et al.* Adipocyte proteome and secretome influence inflammatory and hormone pathways in glioma. **Metab Brain Dis**, v. 34, p. 141–152, 2019.

ARALDI, R.P., *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE (ABESO): Mapa da Obesidade, c2019. Página inicial. Disponível em: < <https://abeso.org.br/>>. Acesso em: 09/01/2024.

BANKOGLU, E.E. *et al.* Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery. **Scientific Reports**, v. 8, p. 11195, 2018.

BATTISTI, Larissa *et al.* Percepção da qualidade de vida e funcionalidade em obesos candidatos a cirurgia bariátrica: um estudo transversal. **Revista Brasileira de Qualidade de Vida**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 125-140, 2017.

BENSON, V. *et al.* Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. **Br J Cancer**, v. 99, p. 185–190, 2008.

BONASSI, Stefano *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93–100, 2011.

BRAADLAND, P. R.; URBANUCCI, A. Chromatin reprogramming as an adaptation mechanism in advanced prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 26, p. R211–R235, 2019.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. A Célula. 2ª edição, Barueri, São Paulo: Manole, 2007. 380p.

CERDÁ, C. *et al.* Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 824, p. 5-17, 2014.

CHAMBLESS, L.B. *et al.* Type 2 diabetes mellitus and obesity are independent risk factors for

poor outcome in patients with high-grade glioma. **J Neurooncol**, v. 106, p. 383–389, 2012.

CHAN, D. S. M. *et al.* Body mass index and survival in women with breast cancer— systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. **Annals of OncologyElsevier Ltd**, 2014.

CICONELLI, R.M. *et al.* Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). **Rev Bras Reumatol**, v. 39, n. 3, p. 143-150, 1999.

CORTÉS-CIRIANO *et al.* Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. **Nature Genetics**, v. 52, p. 331–341, 2020.

COTE, David J. *et al.* Height, Waist Circumference, Body Mass Index, and Body Somatotype across the Life Course and Risk of Glioma. **Cancer Causes & Control**, v. 29, n. 8, p. 707–19, 2018.

DEBES, J.D *et al.* P300 Modulates Nuclear Morphology in Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 65, p. 708–712, 2005.

DIELI-CONWRIGHT, C. M. *et al.* Reducing the risk of breast cancer recurrence: an evaluation of the effects and mechanisms of diet and exercise. **Current Breast Cancer Reports**, v. 8, n. 3, p. 139-150, 2016.

DISNEY-HOGG, L. *et al.* Influence of obesity-related risk factors in the etiology of glioma. **British journal of cancer**, v. 118, n. 7, p. 1020-1027, 2018.

DONMEZ-ALTUNTAS, Hamiyet *et al.* Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 771, p. 30-36, 2014.

DOUET, Julien *et al.* MacroH2A histone variants maintain nuclear organization and heterochromatin architecture. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 9, p. 1570–1582, 2017.

FISCHER, A.H. *et al.* Papillary Thyroid Carcinoma Oncogene (RET/PTC) Alters the Nuclear Envelope and Chromatin Structure. **The American Journal of Pathology**, v. 153, p. 1443–1450, 1998.

FLORINDO, Alex Antonio; LATORRE, Maria do Rosario. Validation and reliability of the Baecke questionnaire for the evaluation of habitual physical activity in adult men. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, p. 129-135, 2003

FRIEDENREICH, C. M.; RYDER-BURBIDGE, C.; MCNEIL, J. Physical activity, obesity, and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 3, p. 790-800, 2021.

GARSKE, K. M. *et al.* Increased body mass index is linked to systemic inflammation through altered chromatin co-accessibility in human preadipocytes. **Nature Communications**, v. 14, p. 4214, 2023.

GROCHANS, S. *et al.* Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review. **Cancers**, v. 14, p. 2412, 2022.

GURRION, C.; URIOSTEGUI, M.; ZURITA, M. Heterochromatin Reduction Correlates with the Increase of the KDM4B and KDM6A Demethylases and the Expression of Pericentromeric DNA during the Acquisition of a Transformed Phenotype. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 14, p. 2866-2875, 2017.

HANAHAH, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, Jan. 2022.

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

IARMARCOVAI, G. *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 3, p. 274-283, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Câncer do sistema nervoso central. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/sistema-nervoso-central>. Acesso em 09/01/2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). O que é câncer. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 09/01/2024.

IZQUIERDO-TORRES, E. *et al.* Obesity, the other pandemic: linking diet and carcinogenesis by epigenetic mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Elsevier Inc., 2022.

JANSSEN, A. Aniek; COLMENARES, Serafin U.; KARPEN, Gary H. Heterochromatin: Guardian of the Genome. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 34, n. 1, p. 265-288, 2018.

KABZINSKI, J. *et al.* Efficiency of Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage and Its Impact on the Risk of Colorectal Cancer in the Polish Population. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 3125989, 2016.

KOCARNIK, J. M. *et al.* Relationship of prediagnostic body mass index with survival after colorectal cancer: Stage-specific associations. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 5, p. 1065–1072, 1 set. 2016.

KRUPINA, K.; GOGINASHVILI, A.; CLEVELAND, D. W. Causes and consequences of micronuclei. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 70, p. 91-99, jun. 2021.

KUAN, A. *et al.* Diet and risk of glioma: combined analysis of 3 large prospective studies in the UK and USA. **Neuro-oncology**, v. 21, n. 7, p. 944-952, 2019.

LAUBY-SECRETAN, B. *et al.* Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-8, 2016.

LAWRENCE, J.E. *et al.* Leptin promotes glioblastoma. **Neurol Res Int**, v. 2012:870807, 2012.

LEWIS, C. W.; GOLSTEYN, R. M. Cancer cells that survive checkpoint adaptation contain micronuclei that harbor damaged DNA. **Cell Cycle**, v. 15, n. 22, p. 3131-3145, 2016.

LIKERT, R. A technique for the measurement of attitudes. **Archives in Psychology**, 140, p. 1-55, 1932.

LIVINGSTON, E. H.; KO, C. Y. Use of the health and activities limitation index as a measure of quality of life in obesity. **Obesity Research**, v. 10, n. 8, p. 824-832, ago. 2002.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

MARQUES-MOURLET, C. *et al.* Obesity and myeloma: Clinical and mechanistic contributions to disease progression. **Frontiers in Endocrinology**, 2023.

MCKINNEY, P. A. Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 75, p. ii12-ii17, 2004.

MCNEILL, K. Epidemiology of brain tumors. **Neurologic clinics**, v. 34, n. 4, p. 981-998, 2016.

MESFIN, F. B.; AL-DHAHIR, M. A. Gliomas. In: **Stat Pearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2023 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441874/>.**

MICHAUD, D. *et al.* Anthropometric measures, physical activity, and risk of glioma and meningioma in a large prospective cohort study. **Cancer Prev Res**, v. 4, n. 9, p. 1385- 1392, 2011.

MILLANES-ROMERO, A. *et al.* Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. **Molecular Cell**, 2013.

MOORE, Steven C. *et al.* Height, Body Mass Index, and Physical Activity in Relation to Glioma Risk. **Cancer Research**, v. 69, n. 21, p. 8349–8355, 2009.

MORAIS, Luciene Vaccaro de. A vida cotidiana de mulheres com obesidade: a percepção da saúde e do funcionamento ocupacional. 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

MURGIA, Elena *et al.* Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as an early cancer risk biomarker in a nested case–control study. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 639, n. 1–2, p. 27–34, 2008.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). Brain and Spinal Cord Tumors. 2023. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/brain-and-spinal-cord-tumors#toc-where-can-i-find-more-information-about-brain-and-spinal-cord-tumors>. Acesso em: 09/01/2024.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V.; HALAZONETIS, T. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 220–228, 2010.

NEIL-SZTRAMKO, S. E. *et al.* Does obesity modify the relationship between physical activity and breast cancer risk? **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 166, n. 2, p. 367–381, 2017.

NIEDERMAIER, T. *et al.* Body mass index, physical activity, and risk of adult meningioma and glioma: a meta-analysis. **Neurology**, v. 85, n. 15, p. 1342–1350, 2015.

NIMPTSCH, Katharina; PISCHON, Tobias. Body fatness, related biomarkers and cancer risk: an epidemiological perspective. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 22, n. 2, p. 39–51, 2015.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Test Guideline 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Paris, 2010.

OGASAWARA, C.; PHILBRICK, B. D.; ADAMSON, D. C. Meningioma: A Review of Epidemiology, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, p. 319, 2021.

OH, J. H.; GERTYCH, A.; TAJBAKHSH, J. Nuclear DNA methylation and chromatin condensation phenotypes are distinct between normally proliferating/aging, rapidly growing/immortal, and senescent cells. **Oncotarget**, v. 4, n. 3, p. 474–493, 2013.

OSTROM, Q. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-oncologia**, v. 19, p. 1–88, 2017.

PAPAIT, Roberto *et al.* Temozolomide and carmustine cause large-scale heterochromatin reorganization in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, n. 2, p. 434–439, 2009.

RENEHAN, A. *et al.* Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569–578, 2008.

RENZ, F. J.; MACEDO, R. C. Efeito do automonitoramento sobre perda de peso e adesão à

dieta em indivíduos sobrepeso e obesos: um ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 14, n. 86, p. 488-497, 2020.

SANTOVITO, A.; GENDUSA, C. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects living in Turin (North-Italy): contribution of body mass index, age and sex. **Annals of Human Biology**, v. 47, n. 1, p. 48-54, 2020.

SAUNDERS, Charlie N. *et al.* Lack of association between modifiable exposures and glioma risk: a Mendelian randomization analysis. **Neuro-Oncology**, v. 22, n. 2, p. 207–215, 2020.

SCARPATO, R. *et al.* Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the γ -H2AX focus assay and micronucleus test. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 685-693, 2011.

SEHGAL, P.; CHATURVEDI, P. Chromatin and Cancer: Implications of Disrupted Chromatin Organization in Tumorigenesis and Its Diversification. **Cancers**, v. 15, n. 2, p. 466, 2023.

SERGENTANIS, T. *et al.* Obesity and risk for brain/CNS tumors, gliomas and meningiomas: a meta-analysis. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0136974, 2015.

SIEGEL, E. *et al.* Prediagnostic body weight and survival in high grade glioma. **Journal of neuro-oncology**, v. 114, n. 1, p. 79-84, 2013.

SILVA, N. F. *et al.* Alterations in the dentate gyrus of the offspring of rats treated with alprazolam during gestation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 129, 2023.

SILVEIRA, E. A. *et al.* Sedentary behavior, physical inactivity, abdominal obesity, and obesity in adults and older adults: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 50, p. 63-73, 2022.

SIMOVIC, Milena; ERNST, Aurélie. Chromothripsis, DNA repair and checkpoints defects. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 123, p. 110-114, 2022.

SOMSUAN, K. *et al.* ARID1A knockdown triggers epithelial-mesenchymal transition and carcinogenesis features of renal cells: role in renal cell carcinoma. **FASEB Journal**, v. 33, n. 11, p. 12226-12239, 2019.

TIJHUIS, A.E.; JOHNSON, S.C.; MCCLELLAND, S.E. The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity. **Molecular Cytogenetics**, v. 12, p. 17, 2019.

TOMASELLO, B. *et al.* DNA damage in normal-weight obese syndrome measured by Comet assay. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 99– 104, 2011.

USMAN, M. *et al.* Obesity, oxidative DNA damage and vitamin D as predictors of genomic instability in children and adolescents. **Int J Obes** v. 45, p. 2095–2107, 2021.

USMAN, Moonisah; VOLPI, Emanuela V. DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 778, p. 23-37, 2018. ISSN 1383-5742.

WARE, John E.; SHERBOURNE, Cathy Donald. The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36): I. Conceptual Framework and Item Selection. **Medical Care**, v. 30, n. 6, p. 473-483, 1992.

WAVELET-VERMUSE, C. *et al.* CDC20-Mediated hnRNP Ubiquitination Regulates Chromatin Condensation and Anti-Cancer Drug Response. **Cancers**, v. 14, n. 15, p. 3732, 2022.

WIEDMANN, M. K. H. *et al.* The impact of body mass index and height on the risk for glioblastoma and other glioma subgroups: a large prospective cohort study. **Neuro- oncology**, v. 19, n. 7, p. 976-985, 2017.

WŁODARCZYK, M. *et al.* Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. **Nutrients**, v. 10, n. 5, 2018.

WŁODARCZYK, M.; NOWICKA, G. Obesity, DNA damage, and development of obesity-related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

WOLIN, K.; CARSON, K.; COLDITZ, G. Obesity and cancer. **The oncologist**, v. 15, n. 6, p. 556, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: prevention and control of the global epidemic. 2000.

XU, M. *et al.* Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiology and Potential Prevention by Weight Loss. **Pancreas Lippincott Williams and Wilkins**, 2018.

ZHANG, D. *et al.* Body mass index and risk of brain tumors: a systematic review and dose-response meta-analysis. **Eur J Clin Nutr**, v. 70, p. 757–765, 2016.

ZHANG, C. Z *et al.* Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. **Nature**, v. 522, p. 179–184, 2015.

ZHI, X. *et al.* The global burden and temporal trend of cancer attributable to high body mass index: Estimates from the Global Burden of Disease Study 2019. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

ZHU, Q. *et al.* BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. **Nature**, v. 477, p. 179–184, 2011.

9. ANEXOS

9.1. Aprovação do CEP/UFU

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Uso do soro de obesos no estudo in vitro do desenvolvimento e progressão de cânceres cerebrais

Pesquisador: Renata Graciele Zanon

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45449821.2.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.944.853

Apresentação do Projeto:

"Para o estudo, serão recrutados de 43 pacientes portadores de obesidade grau I e 30 pacientes não obesos, considerando estudo de BRATTI, 2017. O grupo dos portadores de obesidade será representada pela sigla OB e o grupo de pacientes não obesos representará o grupo controle, indicado pela sigla CT. Será realizado a coleta do plasma sanguíneo do grupo OB assim como do CT. A coleta será realizada através do Ambulatório de Endócrino e Cirurgia Bariátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e outros setores relacionados, cujo o responsável é o Prof. Dr. Ricardo Rodrigues. Essa coleta será realizada pelo profissional que comumente realiza a punção venosa de sangue na devida unidade e posteriormente este será repassado para o Laboratório de Morfologia e Cultura Celular (LAMOC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), cuja a responsável é a Profa Dra Renata Graciele Zanon. Antes do procedimento, todos os participantes serão questionados a fim de preencher uma ficha de avaliação, onde será averiguado se os mesmos se encaixarão nos critérios de inclusão e além disso, antes que o procedimento seja realizado, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) será apresentado, explicado e devidamente assinado pelo participante. De cada paciente recrutado, será coletado 30ml de sangue acondicionados assepticamente em dois tubos de ensaio estéreis de 15 ml. Uma vez que o material tenha sido coletado, as amostras serão levadas ao Laboratório de Morfologia e Cultura Celular (LAMOC), onde ocorrerá a separação do plasma e soro; os experimentos serão realizados, utilizando linhagens de células tumorais com meio de cultura

9.2.Ficha de Avaliação

INFORMAÇÕES PESSOAIS			
Idade:			
Sexo:			
Peso:			
Altura:			
IMC:			

INFORMAÇÕES DE SAÚDE			
	SIM	NÃO	
Último exame sanguíneo de rotina sem alterações			Qual (ais) alterações? Qual ano da realização?
Realiza atividade física regularmente			Qual (ais)? Por quanto tempo?
Realiza tratamento natural (chás, homeopático e afins)			Qual (ais)? Quando?
Histórico familiar de câncer			Qual parentesco? Qual tipo de câncer?
Portador de síndromes genéticas			Qual (ais)?
Tabagista			Por quanto tempo? Quantidade de cigarro?
Diagnóstico prévio de câncer			
Doenças neurodegenerativas			
Doença inflamatória crônica			
Infecção nos últimos 3 meses			
Alterações de coagulopatia			
Uso de anti-inflamatórios			
Cirurgia bariátrica			
Alterações cognitivas			

COMORBIDADES ASSOCIADAS			
	SIM	NÃO	MEDICAÇÕES
Diabetes Mellitus (DM)			
Hipertensão Arterial (HAS)			
Hipercolesterolemia			

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES	

9.3. Questionário de atividade física habitual de Baecke

1. Qual a sua ocupação principal? _____
2. No trabalho, eu fico sentado:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
3. No trabalho, eu fico em pé:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
4. No trabalho, eu ando:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
5. No trabalho, eu levanto objetos pesados:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
6. No trabalho, eu me sinto cansado:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
7. No trabalho, eu sudo:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
8. Em comparação com o trabalho de outras pessoas da minha idade, o meu trabalho é fisicamente:
☐ Muito mais pesado ☐ Mais pesado ☐ Igualmente pesado ☐ Mais leve ☐ Muito mais leve
9. Você pratica exercício físico? ☐ Sim ☐ Não
Qual exercício você pratica mais frequentemente? Quantas horas por semana você?

10. Em comparação com outras pessoas da minha idade, minha atividade física durante os momentos de lazer é:
☐ Muito maior ☐ Maior ☐ Igual ☐ Menor ☐ Muito menor
11. Durante os momentos de lazer, eu sudo:
☐ Muito frequente ☐ Frequente ☐ Às vezes ☐ Raramente ☐ Nunca
12. Durante os momentos de lazer, eu pratico exercícios físicos:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
13. Durante os momentos de lazer, eu assisto à televisão:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
14. Durante os momentos de lazer, eu ando:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
15. Durante os momentos de lazer, eu ando de bicicleta:
☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às vezes ☐ Frequentemente ☐ Sempre
16. Quantos minutos você caminha/anda de bicicleta por dia para ir e voltar do trabalho, escola ou shopping?

9.3.1. Cálculo dos escores do questionário Baecke

Fórmulas para cálculo dos escores do questionário Baecke de AFH

ATIVIDADES FÍSICAS OCUPACIONAIS (AFO)	
$\text{Escore de AFO} = \frac{\text{questão1} + \text{questão2} + \text{questão3} + \text{questão4} + \text{questão5} + \text{questão6} + \text{questão7} + \text{questão8}}{8}$	
Cálculo da primeira questão referente ao tipo de ocupação:	
♦ Intensidade (tipo de ocupação)=1 para profissões com gasto energético leve ou 3 para profissões com gasto energético moderado ou 5 para profissões com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de ocupação: o gasto energético da profissão deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth)	
EXERCÍCIOS FÍSICOS NO LAZER (EFL)	
Cálculo da questão 9 referente a prática de esportes/exercícios físicos:	
• Intensidade (tipo de modalidade)=0,76 para modalidades com gasto energético leve ou 1,26 para modalidades com gasto energético moderado ou 1,76 para modalidades com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de modalidade: o gasto energético da modalidade deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth) • Tempo (horas por semana)=0,5 para menos de uma hora por semana ou 1,5 entre maior que uma hora e menor que duas horas por semana ou 2,5 para maior que duas horas e menor que três horas por semana ou 3,5 para maior que três e até quatro horas por semana ou 4,5 para maior que quatro horas por semana (determinado pela resposta das horas por semana de prática) • Proporção (meses por ano)=0,04 para menor que um mês ou 0,17 entre um a três meses ou 0,42 entre quatro a seis meses ou 0,67 entre sete a nove meses ou 0,92 para maior que nove meses (determinado pela resposta dos meses por ano de prática) ♦ Para o cálculo desta questão, os valores devem ser multiplicados e somados: [Modalidade 1=(Intensidade*Tempo*Proporção)+Modalidade 2=(Intensidade*Tempo*Proporção)] ♦ Após o resultado deste cálculo, para o valor final da questão 9, deverá ser estipulado um escore de 0 a 5 de acordo com os critérios especificados abaixo: [0 (sem exercício físico)=1/ entre 0,01 até <4=2/ entre 4 até <8=3/ entre 8 até <12=4/≥12,00=5]	
Os escores das questões dois a quatro serão obtidos de acordo com as respostas das escalas de Likert	
O escore final de EFL deverá ser obtido de acordo com a fórmula especificada abaixo:	
$\text{Escore de EFL} = \frac{\text{questão9} + \text{questão10} + \text{questão11} + \text{questão12}}{4}$	
ATIVIDADES FÍSICAS DE LAZER E LOCOMOÇÃO (ALL)	
Os escores das questões cinco a oito serão obtidos de acordo com as respostas das escalas de Likert	
O escore final de ALL deverá ser obtido de acordo com a fórmula especificada abaixo:	
$\text{Escore de ALL} = \frac{(6 - \text{questão13}) + \text{questão14} + \text{questão15} + \text{questão16}}{4}$	
Escore total de atividade física (ET)= AFO+EFL+ALL	

9.4. Versão brasileira do questionário de qualidade de vida – SF – 36

1. Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim

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

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave
1	2	3	4	5

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

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

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

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

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

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

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

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

9.4.1. Cálculo dos escores do Questionário de Qualidade de Vida SF-36

Fase 1: Ponderação dos dados:

Questão	Pontuação	
01	Se a resposta for	Pontuação
	1	5,0
	2	4,4
	3	3,4
	4	2,0
	5	1,0
02	Manter o mesmo valor	
03	Soma de todos os valores	
04	Soma de todos os valores	
05	Soma de todos os valores	
06	Se a resposta for	Pontuação
	1	5
	2	4
	3	3
	4	2
	5	1
07	Se a resposta for	Pontuação
	1	6,0
	2	5,4
	3	4,2
	4	3,1
	5	2,0
	6	1,0
08	A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7 Se 7 = 1 o valor da questão é (6) Se 7 = 2 à 6, o valor da questão é (5) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 2, o valor da questão é (4) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (3) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 4, o valor da questão é (2) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 5, o valor da questão é (1) Se a questão 7 não for respondida, o escore da questão 8 passa a ser o seguinte: Se a resposta for (1), a pontuação será (6) Se a resposta for (2), a pontuação será (4,75) Se a resposta for (3), a pontuação será (3,5) Se a resposta for (4), a pontuação será (2,25) Se a resposta for (5), a pontuação será (1,0)	
09	Nesta questão, a pontuação para os itens a, d, e, h, deverá seguir a seguinte orientação: Se a resposta for 1, o valor será (6) Se a resposta for 2, o valor será (5) Se a resposta for 3, o valor será (4) Se a resposta for 4, o valor será (3) Se a resposta for 5, o valor será (2) Se a resposta for 6, o valor será (1) Para os demais itens (b, c, f, g, i), o valor será mantido o mesmo	
10	Considerar o mesmo valor.	
11	Nesta questão os itens deverão ser somados, porém os itens b e d deverão seguir a seguinte pontuação: Se a resposta for 1, o valor será (5) Se a resposta for 2, o valor será (4) Se a resposta for 3, o valor será (3) Se a resposta for 4, o valor será (2) Se a resposta for 5, o valor será (1)	

Fase 2: Cálculo do Raw Scale

Nesta fase você irá transformar o valor das questões anteriores em notas de **8 domínios** que variam de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio. É chamado de *Raw Scale* porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

Domínio:

- Capacidade funcional
- Limitação por aspectos físicos
- Dor
- Estado geral de saúde
- Vitalidade
- Aspectos sociais
- Aspectos emocionais
- Saúde mental

Para isso você deverá aplicar a seguinte fórmula para o cálculo de cada domínio:

Domínio:

$$\frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{Limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

Na fórmula, os valores de limite inferior e variação (Score Range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo:

Domínio:

$$\frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{Limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

Na fórmula, os valores de limite inferior e variação (Score Range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo:

Domínio	Pontuação das questões correspondidas	Limite inferior	Variação
Capacidade funcional	03	10	20
Limitação por aspectos físicos	04	4	4
Dor	07 + 08	2	10
Estado geral de saúde	01 + 11	5	20
Vitalidade	09 (somente os itens a + e + g + i)	4	20
Aspectos sociais	06 + 10	2	8
Limitação por aspectos emocionais	05	3	3
Saúde mental	09 (somente os itens b + c + d + f + h)	5	25