

# **NOVAS PERSPECTIVAS EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL: O CONHECIMENTO NA CRIAÇÃO DE UM FUTURO MULTIDISCIPLINAR**

Editores:

Adenilda Cristina Honorio-França

Édson Fredulin Scherer

Direitos de edição da obra adquiridos pela EDITORA VOLANS. Todos os direitos reservados. Nenhuma parte dessa obra pode ser apropriada e estocada em sistema de banco de dados ou similares, em qualquer forma ou meio, seja eletrônico, fotocópia, gravação, ou outros, sem a permissão da editora.

**EDITORA VOLANS**

CNPJ:36.976.134/000190

Cel.:(64)99216-1284

[www.editoravolans.com.br](http://www.editoravolans.com.br)

**Revisão:** Os autores.

**Capa:** Equipe Editora Volans.

**Edição:** Édson Fredulin Scherer, Adenilda Cristina Honorio-França

**Organizadores:** Édson Fredulin Scherer, Adenilda Cristina Honorio-França

**Autores:** Vários Autores

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Honorio-França, Adenilda Cristina  
Novas perspectivas em saúde humana e animal  
[livro eletrônico] : o conhecimento na criação de  
um futuro multidisciplinar / Adenilda Cristina  
Honorio-França, Édson Fredolin Scherer. --  
Aragarças, GO : Editora Volans, 2021.  
PDF

ISBN 978-65-89726-04-3

1. Interdisciplinaridade 2. Medicina I. Scherer,  
Édson Fredolin. II. Título.

21-77910

CDD-610  
NLM-WB-100

**Índices para catálogo sistemático:**

1. Medicina 610

Aline Grazielle Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129



# CONTEÚDO

	<b>Prefácio</b>	<b>vii</b>
	Édson Fredulin Scherer, Adenilda Cristina Honorio-França.	
	<b>Preface</b>	<b>viii</b>
	Édson Fredulin Scherer, Adenilda Cristina Honorio-França.	
<b>Capítulo 1</b>	<b>Expression of Fc<math>\alpha</math>RI (CD 89) receptors and concentration of IgA in human malaria</b>	<b>1</b>
	Renan Siqueira, Deborah Giovanna Cantarini, Édson Fredulin Scherer, Danielle Cristina Honorio França, Adenilda Cristina Honório-França, Eduardo Luzía França.	
<b>Capítulo 2</b>	<b>Modulação da indução de morte das células MCF-7 na presença de extrato de <i>Garcinia brasiliensis</i></b>	<b>12</b>
	Patricia Gelli Feres de Marchi, Aron Carlos de Nelo Cotrim, Rubian Trindade da Silva Fernandes, Lucas Gabriel R. Venturini, Alessandra Lima Deluque, Fabiana C. Borges, Eduardo Luzia França, Adenilda Cristina Honorio-França.	
<b>Capítulo 3</b>	<b>Interleucin-10 as an immunomodulating agent in NK and MCF-7 cell cultures</b>	<b>20</b>
	Gabriel Felype dos Santos Rodrigues, Inês Veloso Brandão, Gabriela Cappellini Dalla Vecchia, Adenilda Cristina Honorio-França, Eduardo Luzía França.	
<b>Capítulo 4</b>	<b>Viscosidade, teor calórico e imunoglobulinas no colostro e leite maduro submetidos à pasteurização</b>	<b>31</b>
	Talita Puttini Blanco Ferres, Claudia Cristina Pereira, Eduardo Luzía França, Adenilda Cristina Honorio-França.	

<b>Capítulo 5</b>	<b>Potencial de ação antifúngica do óleo essencial de melaleuca associado a aplicação da alta frequência no tratamento de onicomicose</b>	<b>39</b>
	Williana Adriane da Silva, Rianiana Cecilia Fratari Queiroz, Carolina Carnicel.	
<b>Capítulo 6</b>	<b>A Importância da Inclusão de Políticas Públicas em Saúde Destinadas à População LGBT</b>	<b>48</b>
	Renata Renó Martins, Renan Renó Martins, Maria Teresa Renó Gonçalves.	
<b>Capítulo 7</b>	<b>Aplicação do teste EAT-26 para triagem de distúrbios alimentares</b>	<b>50</b>
	Hélida Caroline Silva Gomes <sup>1</sup> , Aline do Carmo França Botelho.	
<b>Capítulo 8</b>	<b>O impacto do estresse sobre profissionais e estudantes da área da saúde</b>	<b>62</b>
	Danielle Cristina Honorio França.	
<b>Capítulo 9</b>	<b>Massagem relaxante como prática alternativa de alívio de dores musculares em polícias militares</b>	<b>68</b>
	Maria do Carmo Pascoal, Schirley Almeida Prado, Edson Fredulin Scherer.	
<b>Capítulo 10</b>	<b>The Influence of Environmental Enrichment on Behavior and Stress of Alouatta Caraya in Captivity</b>	<b>77</b>
	Juliana Luzia França, Laura Teodoro de Oliveira Fernandes, Carlos Eduardo Borges, Adenilda Cristina Honório França, Carlos Kusano Bucalem Ferrari, Eduardo Luzia França.	



## PREFÁCIO

Este livro tem por finalidade divulgar novos conhecimentos adquiridos e aperfeiçoados sobre temas inseridos no binômio Saúde-Doença em seres humanos, bem como em outros animais. Os capítulos escritos na língua portuguesa tiveram seus resumos traduzidos para a língua inglesa. Como novidade e visando uma maior abrangência de públicos leitores, o corpo editorial também aceitou artigos totalmente escritos em inglês e que também tiveram seus resumos traduzidos para o português. O presente livro é composto por temas relevantes como Malária, problema de importância mundial. Também traz estudos sobre a ação de plantas com potencial terapêutico, como o Bacupari para tumores de Mama, bem como o papel de Citocinas como a IL-10 nestes processos patológicos. Novas ações para o processamento do leite humano, visando um melhor manejo para garantir qualidade em bancos de Leite humanos. Bem como procedimentos inovadores para tratamento de micoses em unhas, também foram descritos. Temas de cunho social importantes como distúrbios alimentares e estudos em populações menos assistidas como LGBTs, também tiveram espaço para divulgação em capítulos específicos. Para finalizar, mas não menos importante aparece o tema estresse abordados em capítulos de estudos em profissionais de saúde e até uma proposta de anti-estresse proporcionada pela massoterapia em humanos. Também é apresentado um estudo de enriquecimento ambiental visando diminuir o estresse em cativeiro para macacos Bugio. Esperamos com este livro permitir uma leitura agradável e compreensiva a todos os interessados.

**Dr. Édson Fredulin Scherer**  
**Dra. Adenilda Cristina Honorio-França**

## **PREFACE**

This book aims to disseminate new acquired and improved knowledge on themes inserted in the Health-Disease binomial in humans, as well as in other animals. The chapters written in Portuguese had their abstracts translated into English. As a novelty and aiming at a wider range of readers, the editorial board also accepted articles entirely written in English and that also had their abstracts translated into the Portuguese. This book is composed of relevant topics such as Malaria, a problem of worldwide importance. It also brings studies on the action of plants with therapeutic potential, such as Bacupari for Breast tumors, as well as the role of Cytokines such as IL-10 in these pathological processes. New actions for the processing of human milk, aiming at better management to ensure quality in human milk banks. As well as innovative procedures for the treatment of mycoses in nails, they have also been described. Important social issues such as eating disorders and studies in less-assisted populations such as LGBTs also had room for dissemination in specific chapters. Finally, but not least, the theme stress addressed in chapters of studies in health professionals and even an anti-stress proposal provided by massotherapy in humans appears. An environmental enrichment study is also presented to reduce captive stress for Howler monkeys. We hope with this book to allow a pleasant and comprehensive reading to all interested parties.

**Dr. Édson Fredulin Scherer**  
**Dra. Adenilda Cristina Honorio-França**



# **CAPÍTULO 1**

## **EXPRESSION OF FCARI (CD 89) RECEPTORS AND CONCENTRATION OF IGA IN HUMAN MALARIA**

**AUTORES:**

**Renan Siqueira**

**Deborah Giovanna Cantarini**

**Édson Fredulin Scherer**

**Danielle Cristina Honorio França**

**Adenilda Cristina Honório-França**

**Eduardo Luzia França**

# Expressão de receptores FcαRI (CD 89) e concentração de IgA na malária humana

**Autores: Renan Siqueira<sup>1</sup>, Deborah Giovanna Cantarini<sup>1</sup>, Edson Fredulin Scherer<sup>2</sup>, Danielle Cristina Honorio França<sup>1</sup>, Adenilda Cristina Honório-França<sup>1</sup>, Eduardo Luzia França<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia-UFMT

<sup>2</sup>Centro Universitário do Vale do Araguaia-UNIVAR

---

## Resumo

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero plasmodium transmitidas aos seres humanos por mosquitos do gênero Anopheles. Atualmente cinco espécies são reconhecidas por causar doença em humanos. A resposta imunológica é desenvolvida para diversas formas evolutivas do parasito. A imunoglobulina A é o segundo anticorpo em maior abundância no plasma. A ligação da IgA ao receptor FcαRI pode ativar os mecanismos intracelulares de macrófagos. Este trabalho avaliou a expressão de receptor FcαRI na superfície de eritrócitos e a concentração de IgA no soro de indivíduos com *P. vivax* e *P. falciparum*. Os participantes eram pacientes da Amazônia brasileira. A avaliação da parasitemia foi feita como preconizado pelo ministério da saúde. A determinação da concentração de IgA total no soro foi baseado em um método de turbidimetria. A expressão do receptor FcαRI (CD89) foi analisada por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience, USA), através do software Cells Quest. As análises estatísticas foram feitas com o programa BioEstat 5.0. A pesquisa teve um total de 25 pessoas participantes. A concentração de IgA total no soro de pacientes com malária causada por *P. vivax* estava aumentada, porém a expressão de FcαRI estava normal. A expressão de FcαRI em indivíduos estava aumentada, porém a concentração de IgA total estava normal. Nossos resultados sugerem que na malária causada por *P. vivax* como a concentração de IgA pode levar a ativação celular. Enquanto que na malária causada por *P. falciparum* a concentração de IgA pode levar ao desenvolvimento de sinais inibitórios.

**Palavras-chave:** Malária, Anticorpo, Receptor.

## Expression of FcαRI (CD 89) receptors and concentration of IgA in human malaria

---

### ABSTRACT

The protozoa of the genus plasmodium cause Malaria. This protozoa is transmitted to humans by mosquitoes of the genus Anopheles. Currently, five species are recognized for causing disease in humans. The immune response is developed for several evolutionary forms of the parasite. Immunoglobulin A is the second most abundant antibody in plasma. The binding of IgA to the FcαRI receptor may activate the intracellular mechanisms of macrophages. This study evaluated the expression of the FcαRI receptor on the erythrocyte surface and the concentration of IgA in the serum of individuals with *P. vivax* and *P. falciparum*. Participants were patients from the Brazilian Amazon. The parasitemia assessment was carried out as recommended by the Ministry of Health. The determination of the total IgA concentration in the serum was based on a turbidimetry method. The expression of the FcαRI receptor (CD89) was analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience, USA), using the Cells Quest software. Statistical analyzes were performed using the

BioEstat 5.0 program. The survey had a total of 25 people participating. The concentration of total IgA in the serum of patients with Malaria caused by *P.vivax* was increased, but the expression of Fc $\alpha$ RI was normal. Fc $\alpha$ RI expression in individuals was increased, but the total IgA concentration was normal. The results suggest that Malaria caused by *P.vivax* as the concentration of IgA can lead to cell activation. Whereas in Malaria caused by *P. falciparum*, the concentration of IgA can lead to the development of inhibitory signals.

**Keywords:** Malaria, Antibody, Receptor.

---

## 1. INTRODUCTION

Malaria is a disease with wide distribution caused by protozoa of the genus *Plasmodium* transmitted to humans by mosquitoes of *Anopheles*. Classically, four species are known to cause diseases in humans: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* [1,2]. In addition, a new species, *Plasmodium knowlesi*, has been described in Southeast Asian countries. This occurs naturally in monkeys and is now recognized as the fifth plasmodium that causes malaria in humans [3,4].

In Brazil, malaria is caused by three species: *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* (a small portion of the cases). So far, there is no autochthonous transmission of *P. ovale* and *P. knowlesi* [5]. The most pathogenic species is *P. falciparum*. The evolution of infection by this species can lead to a clinical picture with cerebral manifestations known as cerebral malaria. The pathogenesis of cerebral malaria is not fully understood, but the cytoadherence of parasitized cells to the vascular endothelium and the individual's immune response are involved [6]. *P. Vivax* is the most common cause, accounting for more than 80% of reported cases. Although it is common for the literature to address infection caused by *P.vivax* as benign, recent studies have shown a variable increase in severity, showing that it can also lead to severe malaria resulting in significant morbidity and mortality [7-9].

The interaction of plasmodium with the immune system results in the generation of immunity. This immunity can protect the individual from the clinical symptoms of malaria or develop the disease with less consequences. Protection starts with the first contact and disappears a few years later without reinfections [10].

The immune response is developed for various evolutionary forms of the parasite. Antibodies help protect against infections and clinical disease. However, antibody levels change over time if re-exposure does not occur. Specific anti-plasmodium IgA, IgE, IgG and IgM antibodies produced in malaria have already been identified [11-13].

Although the literature has already described the finding of specific IgA antibodies against *Plasmodium spp*, little is known about the role of IgA in protecting against human malaria. Experimental studies report that IgA does not seem to have a relevant role in malaria infection, but they attribute a lower protective capacity for IgA to the experimental model used [14].

Immunoglobulin A is the second antibody in greater abundance in plasma and is present in monomeric form. IgA is in the dimeric form in mucous membranes and constitutes the antibody in greatest concentration at these sites. IgA is involved in several effector functions, such as phagocytosis, antibody-dependent cytotoxicity, production and release of cytokines, all of which depend on the binding of IgA to cellular receptors. Recent studies suggest an important role for IgA against infection by *Plasmodium yoelii*, a mouse plasmodium [15].

Recently, several types of cellular IgA receptors have been discovered. However, some of these have not yet been fully elucidated. For example, the Fc receptor for IgA (Fc $\alpha$ RI or CD89) has been described as present on several blood cells' surface. Furthermore, the binding of IgA to Fc $\alpha$ RI is known to have an ambiguous effect on immunity, being considered both anti-inflammatory and pro-inflammatory [16].

The binding of IgA to the Fc $\alpha$ RI receptor may activate the intracellular mechanisms of macrophages. After binding, macrophage internalization occurs and probably participates in specific immune responses to various antigens [17]. Thus, Fc $\alpha$ RI expression can play an important role in the

defense of various infections [18-20]. However, there is no report in the literature on the role of this receptor and its interactions with IgA in infections by *Plasmodium spp.*

Thus, studies that seek to understand the role of host immunity about released mediators and their interactions with receptors may help elucidate malaria's immunoparasitological mechanisms. serum from individuals with *P.vivax* and *P.falciparum*.

## DEVELOPMENT

---

Blood samples were collected from patients seen at health units in Cruzeiro do Sul in Acre and Porto Velho in Rondônia, after being diagnosed by examining the thick gout and before starting treatment for individuals infected with *Plasmodium spp.* Individuals who agreed to participate in the survey received information about the work's objectives, risks, and benefits and signed the Free and Informed Consent Form. The Research Ethics Committee approved this Federal University of Mato Grosso Campus Araguaia research, opinion nº 479,675.

Positive samples for *Plasmodium vivax* or *Plasmodium falciparum*, confirmed by the thick drop test. The parasitemia estimate was made as recommended by the Ministry of Health through the quantitative method.

Blood samples were collected with volumes of approximately 8ml. The blood was centrifuged for 15 minutes at 160G. Then, the plasma was removed and the cells were separated in a density gradient with Ficoll-Paque (Pharmacia) for 40 minutes at 160 G, under a temperature of 4°C. The ring rich in MN cells was removed and reserved and the rest of the cells will be subjected to sedimentation by Dextran for 1 hour at 37°C to obtain PMN cells and erythrocytes. The cells were counted in a Neubauer chamber, and cell concentrations adjusted to  $2 \times 10^6$  cells / ml.

The total IgA concentrations were determined by the turbidimetry method. Blood samples were diluted 1:12 (v / v) with saline (9 g / L). The levels of total IgA in the blood of individuals positive for *Plasmodium spp* were determined using an serum anti-IgA (Bioclin) diluted 1:12 (v / v). MultiCal (Bioclin) calibrator was used to determine the standard curve. The analysis was performed according to instructions of the manufacturer. Reading was performed on a spectrophotometer at 340 nm.

After separating the blood cells from individuals positive for *Plasmodium spp*, as described in item 3, the cell suspension was washed with Phosphate Buffer (PBS) plus BSA (bovine serum albumin) for 10 minutes at 4°C. Then the cells were pre-incubated with 10 µl with monoclonal antibodies specific for FcαRI - anti-CD89 labeled with PE (IgG1k - 0.1mg / ml) for 30 minutes. Soon after the samples were washed and resuspended with PBS-BSA (5mg / ml) and analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience, USA), using the Cells Quest software.

The analysis of the results obtained on the immunoglobulin A (IgA) concentration in serum and the expression of FcαRI receptor (CD89) in red blood cells was used statistical treatments carried out by the BioEstat 5.0 program. Since the t test was used for IgA concentration, the ANOVA test was used to evaluate the expression of CD89 receptors. Descriptive statistics and the making of the graphs were performed using the Microsoft® Excel version 2013 program.

The research had 25 participants, where: 12 were not infected by plasmodium and 13 infected by parasite. All people positive for plasmodiums are residents of an endemic area, were not receiving treatment for malaria, were in the initial period of symptoms (mean of 2, 46 days) and with low parasitemia (mean of 1976 parasites per µl of blood). Table 1 shows the main characteristics of individuals infected and not infected by plasmodium.

Table 1 Characterization of uninfected and Plasmodium-infected individuals *spp*.

Characteristics		Non-infected	Infected
N° individuals		12	13
Age (Mean±SD)		24±7.8	24.2 ± 5.5
Sex (%)	M	75	8/13 (61.53)
	F	25	5/13 (38.47)
Symptoms (Days) (Mean ± SD)		0	2.5 ± 1.0
Education level (%)	fundamental	0	84.62
	Medium	50	15.38
	Higher	50	0
Treatment (%)	No	100	100
	Yes	0	0
Parasitemia (mean ± SD)		0	1977.± 651
Endemic area (%)	Não	100	0
	Sim	0	100

The measurement of the total serum IgA concentration was made from fifteen samples: five samples from individuals not infected with *Plasmodium spp*, called the control group; five samples from people infected with *Plasmodium vivax* and five samples from people infected with *Plasmodium falciparum*. Figure 1 shows the IgA concentration in the control group and in the malaria group (*P.vivax* and *P.falciparum*). The concentration of IgA in the serum of individuals infected with *Plasmodium spp* was higher when compared to the control group.

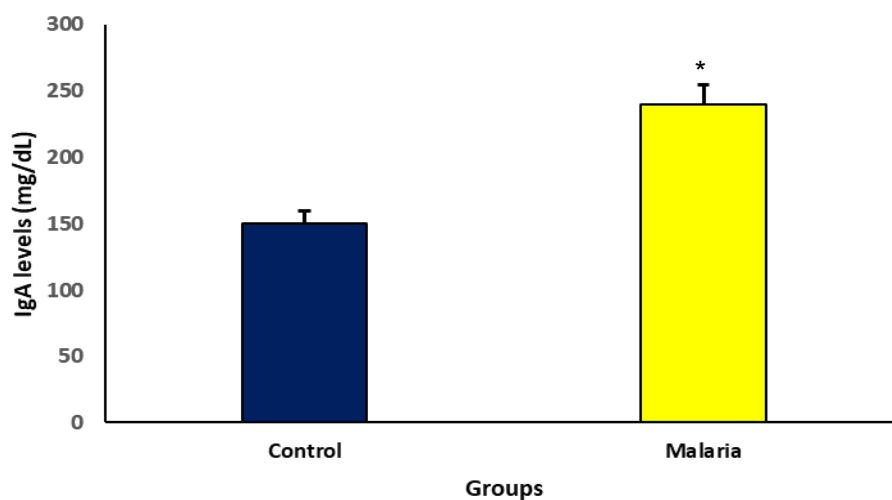


Figure 1. Total IgA concentration in control and malaria groups. IgA concentration in serum from individuals infected and not infected by *Plasmodium spp*. The results were expressed as mean and standard error. \* $p < 0.05$  (Student t test).

When the total IgA concentration in serum of individuals infected with *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* and control was evaluated separately, it was observed that IgA increased significantly in serum of individuals infected with *Plasmodium vivax* in relation to the control. But there was no difference between the levels of IgA present in the serum of individuals infected with *Plasmodium falciparum* when compared to the levels found in the serum of uninfected individuals. Figure 2 represents the results of the measurement of the IgA concentration in the serum of uninfected individuals, infected with *P.vivax* and infected with *P.falciparum*.

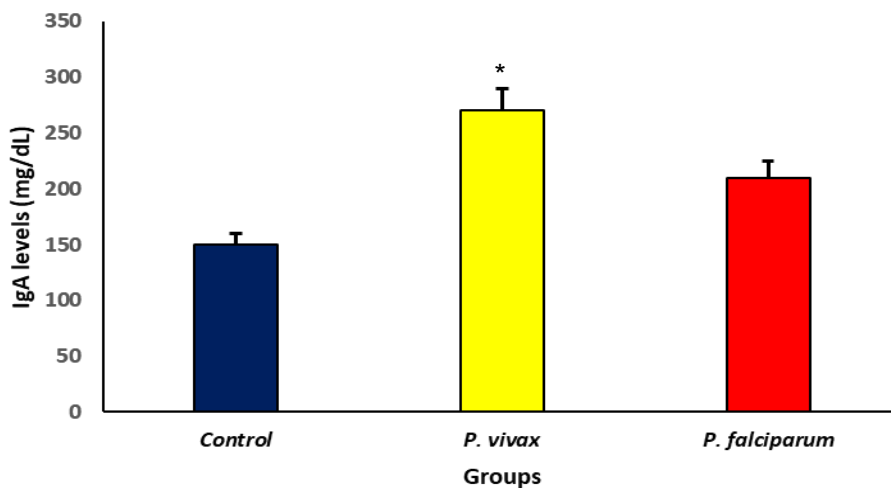


Figure 2. Total IgA concentration in control, *P. vivax* and *P. falciparum* groups. IgA concentration in the serum of uninfected and *Plasmodium vivax* or *Plasmodium falciparum* infected individuals. The results were expressed as mean and standard error. \* $P < 0.05$  (Anova).

To evaluate the expression of CD89 receptors in erythrocytes, fourteen samples were analyzed, seven from individuals infected with *Plasmodium spp* (malaria group) and seven from uninfected individuals (control group). The expression of the Fc $\alpha$ RI receptor in erythrocytes in the control and malaria group are shown in figure 3. It is observed that there was no statistical difference in the expression of the IgA-specific receptor (CD89) in erythrocytes from infected and non-infected individuals with *Plasmodium spp*.

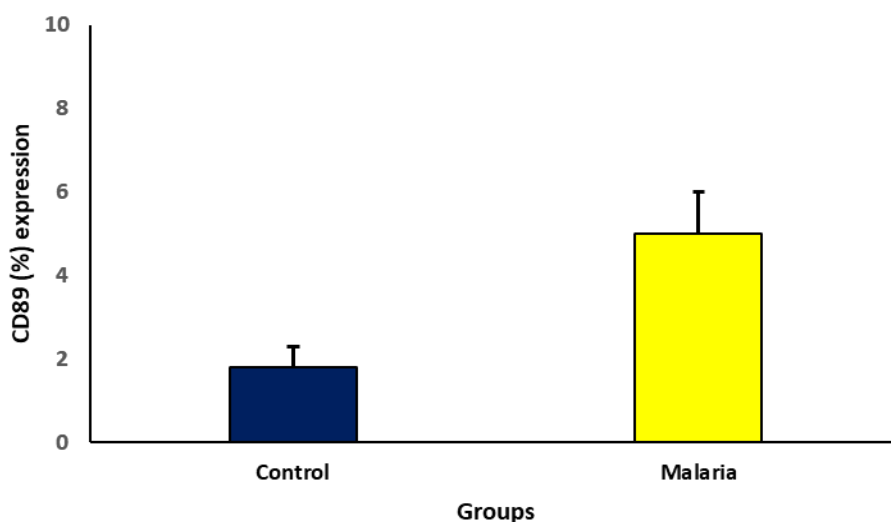


Figure 3. Expression of Fc $\alpha$ RI in red blood cells in the control and malaria group. Percentage of CD89 receptor expression in erythrocytes from uninfected and *Plasmodium spp*. The results were expressed as mean and standard error.  $P > 0.05$  (ANOVA).

When the *Plasmodium* species found (*P. vivax* and *P. falciparum*) were evaluated separately and the control group observed increased expression of the CD89 receptor in erythrocytes from individuals infected with *P. falciparum* compared to the control group and also compared to *P. vivax*, however there was no statistical difference between the control and *P. vivax* groups (Figure 4).

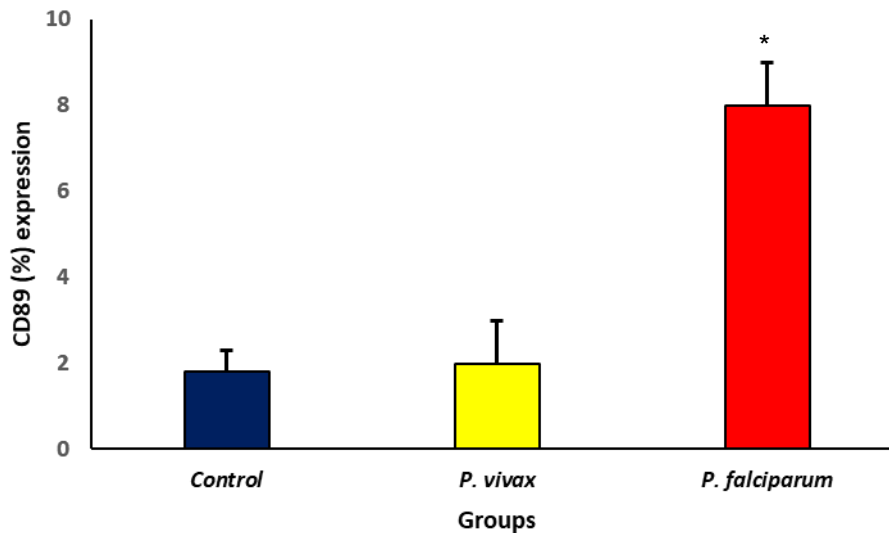


Figure 4. Expression of Fc $\alpha$ RI in red blood cells in the control, *P.falciparum* and *P.vivax* groups. Percentage of CD89 receptor expression in erythrocytes from uninfected and *Plasmodium vivax* or *Plasmodium falciparum*-infected individuals. Results were expressed as mean and standard error. \* $p < 0.05$  (ANOVA).

This study investigated the concentration of total IgA and the expression of Fc $\alpha$ RI receptor in blood cells of individuals with malaria caused by: *P.vivax* or *P.falciparum*. Participants were naturally exposed people living in different endemic locations in the Brazilian Amazon. Exposure-related factors such as age and parasitemia were also analyzed.

In this research, the participants were young adults with an average age of 24.5 years and had low parasitemia (average of 1976 parasites per  $\mu$ l of blood). In a study carried out in Turkey on the concentration of antibodies and their relationship with age and parasitic burden in malaria, demonstrated that age and parasitic burden did not correlate with the concentration of antibodies [21].

The total concentration of IgA antibodies in malaria caused by *P.vivax* was increased in the present study. In another study carried out in Brazil with *P.vivax*, *P.falciparum* and *P. malariae*, the total IgA concentration was normal [13]. However, we emphasize that the total IgA dosage was not separated by species as in the present study, but by clinical picture. And that they also worked with a third species of plasmodium, *P. malariae*, which was not found in this research.

Levels of IgA antibodies have been reported to be increased in other parasitic diseases caused by protozoa. Work carried out on the total IgA concentration in the serum of individuals with giardiasis when compared with individuals who did not have the disease. They found an increase in the total concentration of IgA in the serum of people with giardiasis and concluded that the concentration of IgA may correlate more with giardiasis than the levels of IgE [22]. However, the role of IgA in the immunology of these diseases is still not well understood. However, for other infectious pathologies, a protective role for IgA has been reported. In one study, prophylactic treatment with purified human IgA was performed in mice exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. In which IgA-treated mice had less bacterial load and less granulomas than the untreated group. This suggests that IgA reduced the infectious potential of the pathogen [23].

However, in *P.falciparum*, IgA concentration remained normal in this study. There is growing interest in the relationship between IgA and malaria. Due to recent studies suggesting an association between IgA-mediated nephropathy and malaria caused by *P.falciparum* [24,25]. However, the exact mechanism responsible remains unknown.

IgAs antibodies are recognized for having a dual function in the immune system. They can both have a pro-inflammatory effect and stimulate phagocytosis, antibody-dependent cell

cytotoxicity and neutralization, as well as trigger an anti-inflammatory effect by inhibiting cell activation and inducing synthesis and release of cytokines such as IL-10. For IgA to perform a large part of its functions, it is necessary to interact with its specific receptor, FcαRI / CD89 [26-28]. However, the role played by this antibody in malaria has not yet been elucidated.

The dual role played by IgA in immunity is mediated by binding to FcαRI, so the receptor is a regulator of IgA's anti and pro-inflammatory functions. It can trigger a potent ITAM (Itami) inhibitory signal along the FcRγ chain. Resulting in a signaling cascade that promotes the recruitment of tyrosine phosphatase SHP-1 inducing the inhibition of activation signals in several types of cells. Conversely, cross-linking of FcαRI to IgA induces a high intensity signal that leads to the recruitment of tyrosine kinase Syk and causes cell activation. [15] This is the first work to correlate the expression of FcαRI and IgA in human malaria.

FcαRI is a membrane receptor expressed in different cell types, mainly in cells of the myeloid lineage, such as monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, but it can also be expressed in dendritic cells and platelets [29]. FcαRI has the ability to interact with the two isotypes of immunoglobulin A, being able to bind to both IgA1 and IgA2 [16].

The binding of IgA to the FcαRI receptor can trigger a potent immune response. The response produced is based on the activation of effector cells. The mechanisms that can be activated include: phagocytosis, antibody-dependent cell cytotoxicity, respiratory explosion and production and release of cytokines and chemokines [30].

The binding of monomeric IgA (predominant form in serum) to FcαRI is recognized for generating signals of cellular inhibition. Whereas the binding of immune complexes or the cross-linking of IgA to its receptor leads to signs of activation [15,16].

In vitro studies have shown that FcαRI can trigger the death of tumor cells by activating neutrophils. And that FcαRI-mediated destruction is more efficient than that mediated by other receptors [31]. In another study on the concentration of IgA and expression of FcαRI in diabetic patients it was observed that the binding of IgA to its receptor can trigger phagocytosis of bacteria by the activation of macrophages [20].

In the present study, the expression of FcαRI in blood cells in malaria caused by *P.vivax* was normal, but the total IgA concentration in that malaria was increased. In contrast, the expression of FcαRI in malaria caused by *P.falciparum* was increased, but the concentration of total IgA in malaria caused by this species was normal.

FcαRI expression has already been found altered in other pathologies. A study carried out in individuals infected with the human immunodeficiency virus found a decrease in the expression of that receptor in people in this group and correlated this lower expression with an increase in serum IgA levels [32]. On the other hand, in a survey of patients with bacteremia caused by gram-negative bacteria, an increase in FcαRI expression was observed, but the expression did not correlate with serum IgA levels [33]. However, the role of IgA and its interaction with its specific receptor constitutes an open field for further investigation, more studies are needed to better understand the role of IgA and FcαRI in human malaria.

---

### 3. FINAL CONSIDERATIONS

The results suggest that in malaria caused by *P.vivax* as the concentration of IgA is increased and the expression of FcαRI is decreased, there is a greater chance of cross-linking of IgAs to the receptor, which can lead to cell activation. Whereas in malaria caused by *P.falciparum* the concentration of total IgA is normal, but the expression of the receptor is increased. This increases the chances of monomeric IgA binding to the receptor, which would result in the development of inhibitory signals.



---

#### 4. REFERENCE

- [1] Singh B, Daneshvar C: Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev 2013, 26:165-184.
- [2] Mouatcho JC, Goldring JPD: Malaria rapid diagnostic tests: challenges and perspectives. J Med Microbiol 2013, 62:1.491-1.505.
- [3] Calderaro A, Giovanna P, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, Conto F, Medici MC, Chezzi C, Arcangeletti MC. Accurate identification of the six human *Plasmodium spp.* causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. Malar J 2013, 12:321.
- [4] Sen P, Vial HJ, Radulescu O: Kinetic modelling of phospholipid synthesis in *Plasmodium knowlesi* unravels crucial steps and relative importance of multiple pathways. BMC Syst Biol 2013, 7:123.
- [5] Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, Alecrim MGC: Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis 2010, 16:1611-1614.
- [6] Jain K, Sood S, Gowthamarajan K: Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. Braz J Infect Dis 2013, 17:579-591.
- [7] Mourão LC, Morais CG, Bueno LL, Jimenez MC, Soares IS, Fontes CJ, Guimarães Lacerda MV, Xavier MS, Barnwell JW, Galinski MR, Braga EM: Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-119 and PvMSP-3a359798) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. Microbes Infect 2012, 14:730-739.
- [8] Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT: Malaria in Brazil: an overview. Malar J 2010, 9:115.
- [9] Aatif S, Jamal Q, Altaf A, Salimullah: Is vivax malaria really benign? - a Karachi-based study. J Pak Med Assoc 2013, 63:721-724.
- [10] Keegan LT, Dushoff J: Population-level effects of clinical immunity to Malaria. BMC Infect Dis 2013, 13:428.
- [11] Hill DL, Eriksson EM, Li Wai Suen CS, Chiu CY, Ryg-Cornejo V, Robinson LJ, Siba PM, Mueller I, Hansen DS, Schofield L: Oponising antibodies to *P. falciparum* merozoites related to clinical immunity to malaria. Plos one 2013, 9: e74627.
- [12] Muellenbeck MF, Ueberheide B, Amulic B, Epp A, Fenyó D, Busse CE, Esen M, Theisen M, Mordmüller B, Wardemann H: The memory B cells produce classical and atypical *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. J Exp Med 2013, 210:389-399.
- [13] Leoratti FM1, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, Moraes SL: Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. Malar J 2008, 7:186.

- [14] Shi J, McIntosh RS, Adame-Gallegos J, Dehal PK, van Egmond M, van de Winkel J, Draper SJ, Forbes EK, Corran PH, Holder AA, Woof JM, Pleass RJ: The generation and evaluation of recombinant human IgA specific for *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1-19 (PfMSP119). *BMC Biotechnol* 2011, 11:77.
- [15] Ben Mkaddem S, Rossato E, Heming N, Monteiro RC: Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): From autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun Rev* 2013, 12:666-669.
- [16] Bakema JE, van Egmond M: The human immunoglobulin A Fc receptor Fc $\alpha$ RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2011, 4:612-624.
- [17] van Egmond M, van Garderen E, van Spruiel AB, Damen CA, van Amersfoort ES, van Zandbergen G, van Hattum J, Kuiper J, van de Winkel JG: Fc $\gamma$ RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 2000, 6:680-685.
- [18] Honorio-França AC1, Carvalho MP, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM: Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) opsonized by colostral IgA. *Scand J Immunol* 1997, 46:59-66.
- [19] Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MM, Monteiro RC: Colostral neutrophils express IgA Fc receptors (CD89) lacking  $\gamma$  chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. *J Leukoc Biol* 2001, 69:289-296.
- [20] França EL, Morceli G, Fagundes DL, Rudge MV, Calderon Ide M, Honorio-França AC: Secretory IgA Fc $\alpha$  receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *APMIS* 2011, 119:710-719.
- [21] Zeyrek FY, Babaoglu A, Demirel S, Erdogan DD, Ak M, Korkmaz M, Coban C: Analysis of Naturally Acquired Antibody Responses to the 19-kd C-Terminal Region of Merozoite Surface Protein-1 of *Plasmodium vivax* from Individuals in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 2008, 78:729-732.
- [22] Zarebavani M, Dargahi D, Einollahi N, Dashti N, Mohebali M, Rezaeian M: Serum Levels of Zinc, Copper, Vitamin B12, Folate and Immunoglobulins in Individuals with Giardiasis. *Iran J Public Health* 2012, 41:47-53.
- [23] Alvarez N, Otero O, Camacho F, Borrero R, Tirado Y, Puig A, Aguilar A, Rivas C, Cervantes A, Falero-Díaz G, Cádiz A, Sarmiento ME, Norazmi MN, Hernández-Pando R, Acosta A: Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of progressive pulmonary infection. *BMC Immunol* 2013, 14 (Suppl 1):S3.
- [24] Yoo DE, Kim JH, Kie JH, Park Y, Chang TI, Oh HJ, Kim SJ, Yoo TH, Choi KH, Kang SW, Han SH: Immunoglobulin A Nephropathy Associated with *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Korean Med Sci* 2012, 27:446-449.
- [25] Rafieian-Kopaei M, Nasri H, Alizadeh F, Ataei B, Baradaran A: Immunoglobulin A Nephropathy and Malaria falciparum Infection; a Rare Association. *Iran J Public Health* 2013, 42:529-533.

- [26] Balu S, Reljic R, Lewis MJ, Pleass RJ, McIntosh R, van Kooten C, van Egmond M, Challacombe S, Woof JM, Ivanyi J: A Novel Human IgA Monoclonal Antibody Protects against Tuberculosis. *J Immunol* 2011, 186:3113-3119.
- [27] Lecocq M, Detry B, Guisset A, Pilette C: Fc $\alpha$ RI-Mediated Inhibition of IL-12 Production and Priming by IFN- $\gamma$  of Human Monocytes and Dendritic Cells. *J Immunol* 2013, 190:2362-2371.
- [28] Boross P, Lohse S, Nederend M, Jansen JH, van Tetering G, Dechant M, Peipp M, Royle L, Liew LP, Boon L, van Rooijen N, Bleeker WK, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Leusen JH: IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol Med* 2013, 5:1213-1226.
- [29] Qian K, Xie F, Gibson AW, Edberg JC, Kimberly RP, Wu J: Functional expression of IgA receptor Fc $\alpha$ RI on human platelets. *J Leukoc Biol* 2008, 84:1492-500.
- [30] Wines BD, Ramsland PA, Trist HM, Gardam S, Brink R, Fraser JD, Hogarth PM: Interaction of Human, Rat, and Mouse Immunoglobulin A (IgA) with Staphylococcal Superantigen-like 7 (SSL7) Decoy Protein and Leukocyte IgA Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem* 2011, 286:33118-33124.
- [31] Otten MA, Leusen JH, Rudolph E, van der Linden JA, Beelen RH, van de Winkel JG, van Egmond M: FcR  $\gamma$ -Chain Dependent Signaling in Immature Neutrophils Is Mediated by Fc $\alpha$ RI, but Not by Fc $\gamma$ RI. *J Immunol* 2007, 179:2918-2924.
- [32] Grossetête B, Viard JP, Lehuen A, Bach JF, Monteiro RC: Impaired Fc alpha receptor expression is linked to increased immunoglobulin A levels and disease progression in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1995, 9:229-234.
- [33] Chiamolera M, Launay P, Montenegro V, Rivero MC, Velasco IT, Monteiro RC: Enhanced expression of Fc alpha receptor I on blood phagocytes of patients with gram-negative bacteremia is associated with tyrosine phosphorylation of the FcR-gamma subunit. *Shock* 2001, 16:344-348.

# CAPÍTULO 2

## **MODULAÇÃO DA INDUÇÃO DE MORTE DAS CÉLULAS MCF-7 NA PRESENÇA DE EXTRATO DE *GARCINIA BRASILIENSIS***

**AUTORES:**

**Patricia Gelli Feres de Marchi**

**Aron Carlos de Nelo Cotrim**

**Rubian Trindade da Silva Fernandes**

**Lucas Gabriel R. Venturini**

**Alessandra Lima Deluque**

**Fabiana C. Borges**

**Eduardo Luzia França**

**Adenilda Cristina Honório-França**

## Modulação da indução de morte das células MCF-7 na presença de extrato de *Garcinia brasiliensis*

**Autores:** Patricia Gelli Feres de Marchi, Aron Carlos de Nelo Cotrim, Rubian Trindade da Silva Fernandes, Lucas Gabriel R. Venturini, Alessandra Lima Deluque, Fabiana C. Borges, Eduardo Luzia França, Adenilda Cristina Honorio-França.

*Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia-UFMT*

---

### Resumo

O Brasil é uma importante fonte terapêutica devido a grande diversidade de vegetais. Dentre as plantas com potencial terapêutico se destaca a *Garcinia brasiliensis* (bacupari), que apresenta várias atividades biológicas, inclusive ação anti-tumoral. Estudos de projeção futura estimam que muito indivíduos irão morrer de câncer no Brasil, entre estes, o câncer de mama. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do bacupari sobre morte de células de tumor de mama (MCF-7). O extrato etanólico foi obtido das folhas do bacupari. Foram avaliadas células de sangue e células de adenocarcinoma mamário (MCF-7- ATCC) o índice de apoptose por citometria de fluxo. Observou-se que houve aumento de apoptose em células MCF-7 quando tratadas pelo bacupari. A necrose foi maior tanto em células do sangue como em célula MCF-7 quando tratadas pelo extrato da planta. Esses dados sugerem que o aumento de morte de células tumorais induzido pelo extrato do Bacupari podem ser promissores para terapias no tratamento de tumor de mama. Estudos adicionais devem ser realizados visando elucidar os mecanismos pelos quais ocorrem a indução de morte destas células.

**Palavras-chave:** Bacupari, Morte celular, Apoptose, Necrose.

## Modulation of death induction of MCF-7 cells in the presence of *Garcinia brasiliensis* extract

---

### Abstract

Brazil is an important therapeutic source due to the great diversity of vegetables. Among the plants with therapeutic potential, *Garcinia brasiliensis* (bacupari) stands out, with several biological activities, including anti-tumor action. Future projection studies estimate that many individuals will die of cancer in Brazil, including breast cancer. Therefore, this work aimed to evaluate the effects of bacupari on breast tumor cell death (MCF-7). The ethanol extract was obtained from the leaves of bacupari. Blood cells and mammary adenocarcinoma cells (MCF-7-ATCC) were evaluated for the apoptosis index by flow cytometry. It was observed that there was an increase in apoptosis in MCF-7 cells when treated with bacupari. Furthermore, necrosis was greater in both blood cells and MCF-7 cells when treated with the plant extract. These data suggest that the increase in tumor cell death induced by Bacupari extract may hold promise for therapies in treating breast tumors. However, additional studies must be carried out to elucidate the mechanisms by which the death induction of these cells occurs.

**Keywords:** Bacupari, Cell death, Apoptosis, Necrosis.

---

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande biodiversidade vegetal, com mais de 40.000 espécies diferentes de plantas, representando 20% da flora mundial. Portanto, é uma importante fonte de produtos terapêuticos, mas minimamente explorada (OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2008).

*Garcinia* ou *Rheedia* pertence à família Guttiferae, apresenta uma diversidade de metabólitos, como xantonas, flavonoides, ácidos fenólicos e benzafenonas (NEVES et al., 2007; COELHO et al., 2008; DEROGIS et al., 2008).

A espécie *Garcinia brasiliensis* ou *Rheedia brasiliensis* originária da floresta Amazonica e mata Atlantica, mas atualmente cresce em três grandes biomas brasileiros: na mata Atlantica, no Cerrado e no Amazonas (COELHO et al., 2008). A árvore, com suas folhas verdes lustrosas e formato simétrico e bonita como ornamento. Esta planta é popularmente conhecida como bacuri, bacuripari, bacupari, bacopari ou bacuparé (ALMEIDA et al., 2008; MARTINS et al., 2001). Os seus frutos são amarelos com polpa mucilagínosa branca comestível, usado na medicina popular para o tratamento de úlcera péptica, patologia urinárias e vários tipos de tumores (SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

As atividades biológicas já descritas desta espécie são: propriedade anti-anafilática (NEVES et al., 2007), anti-inflamatória (NALDONE et al., 2009), efeito antiproliferativo em células de câncer humano (MURATA et al., 2010), potente agente anticâncer e antibiofilme (MURATA et al., 2010), atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2010), atividade antitumoral (MARTINS et al., 2009) e propriedade inibitória sobre HIV (MARTINS et al., 2007).

Estudos detalhados sobre a atividade antimicrobiana das gutíferonas e das epiclusianonas isoladas das sementes da *Garcinia brasiliensis* mostram que esses compostos apresentam atividades citotóxicas, inibição da sintase do óxido nítrico, quimioprevenção do câncer, atividades antifúngicas, atividades antitumorais e inibição de *Staphylococcus aureus* (NALDONI et al., 2009).

Análise dos extratos hexânicos das folhas da *Garcinia brasiliensis* revelou a presença de xantonas tetra-oxigenadas que possuem atividade antifúngica, da garciniafenona e da gutíferona (PEREIRA et al., 2010) com atividade anti-aflatoxina. A análise do pericarpo da fruta levou ao isolamento da epiclusianona e da gutíferona, que são antibacterianos (ALMEIDA et al., 2008) e antifúngicos, além da bioatividade contra a Leishmaniose (PEREIRA et al., 2010), a inibição do vírus HIV (MARTINS et al., 2009) e a inibição da protease da *Leishmania*. A moreloflavona, detectada nos extratos etanólicos das folhas, possui atividade hipocolesterolêmica. Outros relatos indicam que as folhas desta planta contêm lupeol e outros triterpenos que têm sido associados com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (MARTINS et al., 2008).

Estima-se que mais de um milhão de indivíduos irão morrer de câncer por ano a partir de 2030 no Brasil (GOSS et al., 2013; SILVA; MAGALHÃES, 2013). Assim, o estudo dos mecanismos imunológicos do uso do extrato de plantas com atividade antitumoral, em especial o bacupari, pode ser uma ferramenta inovadora para o desenvolvimento de drogas capazes de aumentar de restabelecer o organismo frente a essa doença.

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

### Preparação do extrato

Folhas de *Garcinia brasiliensis* (bacupari) foram coletadas para obtenção do extrato vegetal, na cidade de Pontal do Araguaia - MT, Brasil, Lat. 15° 55'08"S Long. 52° 16'44"W, com altitude de 365m. Um exemplar da planta se encontra depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas e Ciências da Saúde – Campus Universitário do Araguaia, Universidade Federal de Mato Grosso. A coleta foi realizada da entrecasca. A seguir foi utilizado um ralador em inox, para obtenção de pó vegetal seco (500mg/mL). O extrato etanólico foi preparado colocando o pó vegetal (500 mg/mL) em 3600mL de etanol P.A.. O material foi mantido por quinze dias em temperatura ambiente, sendo misturado uma vez por dia. Após este períodoo preparado foi filtrado com um funil analítico e algodão vegetal totalizando 1450 ml de extração etanólica. A seguir o extrato vegetal

foi rotaevaporado (RotaevaporadorFisatom 801) 500 ml do extrato etanólico resultando em 13,75 gramas de extrato seco (Estufa Biopar 527).

### **Separação de células sanguíneas**

Foram coletadas seis amostras de sangue, cerca de 10 mL em tubos heparinizados, para obtenção de leucócitos. A separação das populações celulares foi realizada por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) durante 40 minutos sob centrifugação com rotação de 1500rpm. Após esse período obteve um anel enriquecido de fagócitos mononucleares que foi lavado por duas vezes em meio de cultura 199 (Gibco). As células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para  $2 \times 10^6$  células/ml. Após esse período, as células foram incubadas com 50  $\mu$ l de extrato de bacupari. Foi realizado um controle de células mantidas em meio 199. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética local e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **Obtenção de células tumorais**

As células das linhagens de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), suplementado com soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) a 10% em estufa de CO<sub>2</sub>. Após uma semana, quando apresentaram confluência, essas células foram removidas por tripsinização. Para isso, as células aderidas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada e adicionado 1mL de tripsina (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Após a lavagem, as células tumorais foram quantificadas, ajustadas para  $2 \times 10^4$  células. Posteriormente, as células foram incubadas com e sem 50  $\mu$ L de extrato.

### **Ensaio de Apoptose**

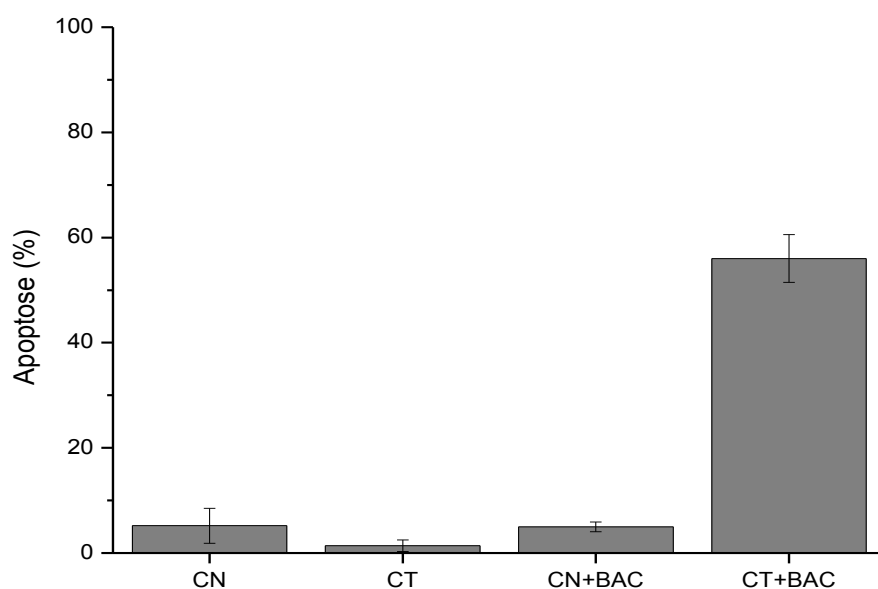
Para o ensaio de apoptose as células foram ressuspendidas com 500  $\mu$ L com binding buffer contendo 5 $\mu$ LofannexinV-FITC (Annexin V-FITC ApoptosisDetection Kit, Alexis<sup>TM</sup>, San Diego, USA) e 5  $\mu$ Lof PE e então incubadas por 10 min a temperatura ambiente. A fluorescência das células foi analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur system; BD, San Jose, USA). Os dados obtidos foram analisados por meio do softwareCellQuest.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos no experimento foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey, considerando diferença estatística quando  $p < 0.05$ .

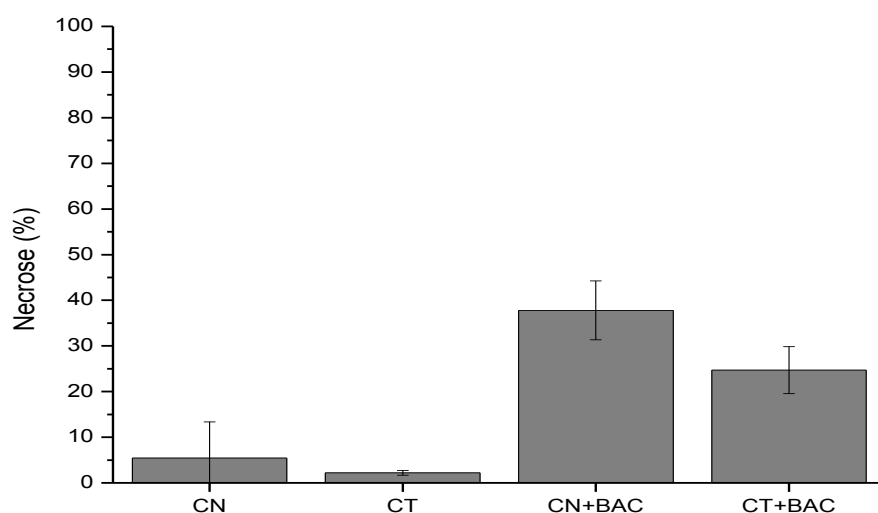
### **Resultados e Discussão**

Observa-se na figura 1 o resultado do avaliação de apoptose realizado com células normais e tumorais com e sem o extrato. Nota-se um aumento significativo no grupo célula tumoral e extrato quando comparado com o grupo controle espontâneo contendo apenas células tumorais.



**Fig. 1: Índice de apoptose (%) em células normais e tumorais com ou sem o estímulo extrato de Bacupari.**

Na figura 2 é observa-se o resultado do teste de necrose realizado com células normais e tumorais com e sem o estímulo. Nota-se um aumento significativo tanto no grupo experimental célula normal e estímulo quanto no grupo célula tumoral e estímulo.



**Fig. 2: Índice de necrose (%) em células normais e tumorais com ou sem o estímulo extrato de Bacupari.**

A morte celular fisiológica é um processo essencial para a manutenção da homeostasia corporal, sendo que uma das principais características adquiridas pela célula tumoral é a evasão da



morte celular programada ou apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Portanto, muito tem se investido em tratamentos para o câncer que visam a indução da morte celular alvejando desde as proteínas da família Bcl-2 até o gene p53 (WONG, 2011).

Na busca por novas formas de tratamentos inclui-se testar a utilização de várias plantas medicinais e seus metabólitos secundários sob a apoptose de células tumorais, plantas essas que comprovaram seu efeito farmacológico (SAFAZARDEH, et al., 2014).

Baseado na ideia destes estudos o extrato do Bacupari demonstrou ser uma forma de induzir a morte celular programada com um pico de apoptose em células das linhagens de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 em mais de 50%. Outras plantas medicinais também obtiveram resultados semelhantes em diferentes linhagens de células tumorais, como o Ipê-Roxo em hepatomas HepG2 (WOO et al., 2006).

Um fungo usado tradicionalmente na medicina chinesa, *A. camphorata*, apresentou resultado semelhante ao observado com o extrato de Bacupari, inibindo o crescimento e induzindo apoptose em linhagem de células MCF-7 associado principalmente aos níveis de proteínas Bax e a geração de espécies reativas de oxigênio (YANG et al., 2006).

Diferentemente da apoptose, a necrose é um processo de morte celular que devido ao extravasamento do conteúdo citoplasmático da célula induz um processo inflamatório ao indivíduo (ROCK & KONO, 2008).

Assim, o aumento no índice de necrose nos grupos experimentais comparados aos grupos espontâneos observado na figura 2, poderia ser observado como algo desfavorável ao paciente, porém o conceito de morte celular desregulado e acidental dado a necrose em comparação com a apoptose vem mudando na última década e apesar das inúmeras nomenclaturas, todas as mortes não apoptóticas podem ser classificadas como necroseregulada (BERGHE et al., 2014).

---

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta de inibidores químicos (DEGTEREV et al., 2005), assim como das vias de ativação da morte celular não-apoptótica sugeriram que a necrose também seja um mecanismo regulado e, dessa forma, sua manipulação poderia ser explorada como fim terapêutico (SUN et al., 2012).

Os conhecimentos atuais acerca dos mecanismos intrínsecos moleculares das células tumorais revelam que estas têm a capacidade de evadir-se da apoptose, mas não de outros métodos de morte celular, assim a indução da necrose por vias farmacológicas vêm sendo amplamente estudadas (MOHAMMAD, 2015 et al.; CONRAD, et al., 2016).

Modelos de necrose regulada como a ferroptosis foram induzidos em tumores mamários triplo negativos (YANG et al., 2014), a indução da ferroptosis farmacologicamente em células tumorais pode estar ligada a regulação do gene p53 e mostra ser bem promissora no tratamento de diversos tipos de câncer (JIANG et al., 2015).

Assim como fim terapêutico para o tratamento do câncer de mama, tanto o aumento na necrose quanto na apoptose de células tumorais induzido pelo extrato do Bacupari demonstraram ser bem promissores e os mecanismos pelos quais ocorre esta indução ainda precisam ser completamente elucidados.

---

### 4. REFERÊNCIAS

[1] ALMEIDA, L. P. et al. Antimicrobial activity of *Rheediabrasiliensis* and 7-epiclusionone against 7-epiclusionone. *Phytomedicine*, v. 5, n. 10, p. 886-891, 2008.

[2] BERGHE, T. V. et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular cell biology*, v. 15, n. 2, p. 135-147, 2014.

- [3] COELHO, L. P. et al. 7- Epiclusianone, a tetraprenylatedbenzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric-cGMP pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 327, n. 1, p. 206-214, 2008.
- [4] CONRAD, M, et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, n. 15, p. 348-366, 2016.
- [5] DEGTEREV, A. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, v. 1, n. 2, p. 112, 2005.
- [6] DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment for prenylatedbenzophenones. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 46, n. 3, p. 278-282, 2008.
- [7] GOSS, P. E. et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *The Lancet Oncology*, v. 14, p. 391-436, 2013.
- [8] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- [9] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- [10] JIANG, L. et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, v. 520, n. 7545, p. 57-62, 2015.
- [11] MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylatedbenzophenones: ketenol, tautomerism and stereochemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1515-1523, 2007.
- [12] MARTINS, F. T. et al. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylatedbenzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, n. 3, p. 451-457, 2011.
- [13] MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylatedbenzophenones inhibiting cystine and serine proteases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, N. 3, p. 1230-1239, 2009.
- [14] MOHAMMAD, R. M. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, p. S78-S103 2015.
- [15] MURATA et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7- epiclusianone and fluoride. *Biofouling*, v. 26, n. 7, p. 865-872, 2010.
- [16] NALDONE, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. *Journal of Medicinal Food*, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.
- [17] NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties benzophenones isolated from *Garcinia brasiliensis*. *Planta Med.*, v. 3, p. 644-649. 2007.
- [18] OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*, v. 48, n. 1, p. 170-179. 2012.
- [19] PEREIRA, I. O. et al. Leshmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. *Phytomedicine*, v. 17, n. 5, p.339-345, 2010.

- [20] ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, v. 3, p. 99-126, 2008.
- [21] SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced pharmaceutical bulletin*, v. 4, n. Suppl 1, p. 421, 2014.
- [22] SANTA-CECILIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. *Journal Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 467-473, 2011.
- [23] SILVA, J. B., MAGALHÃES, H. M. Initiates in cancer control from Brazil's Ministry of Health. *The Lancet Oncology*, v. 14, n. 5, p. 385-386, 2013.
- [24] SOUZA, J. N. S. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chemistry*, v. 106, p. 331-339, 2008.
- [25] SUN, L. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, v. 148, n. 1, p. 213-227, 2012.
- [26] WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.
- [27] WOO, H. J. et al.  $\beta$ -lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. *Journal of medicinal food*, v. 9, n. 2, p. 161-168, 2006.
- [28] YANG, H. L. et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Androdiacamphorata*. *Cancer letters*, v. 231, n. 2, p. 215-227, 2006.
- [29] YANG, W. S. et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, v. 156, n. 1, p. 317-331, 2014.

# **CAPÍTULO 3**

## **INTERLEUCIN-10 AS AN IMMUNOMODULATING AGENT IN NK AND MCF-7 CELL CULTURES**

**AUTORES:**

**Gabriel Fellype dos Santos Rodrigues**

**Inês Veloso Brandão**

**Gabriela Cappellini Dalla Vecchia**

**Adenilda Cristina Honorio-França**

**Eduardo Luzía França**

# Interleucina-10 como agente imunomodulador nas culturas celulares de NK e MCF-7

**Autores: Gabriel Felype dos Santos Rodrigues<sup>1</sup>, Inês Veloso Brandão<sup>1</sup>, Gabriela Cappellini Dalla Vecchia<sup>1</sup>, Adenilda Cristina Honorio-França<sup>1</sup>, Eduardo Luzia França<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia-UFMT

---

## Resumo

A melhoria de métodos alternativos relacionados ao tratamento e combate ao câncer foi fundamental para o desenvolvimento de novas diretrizes de estudo, como a imunoterapia. Vários estudos afirmam que a capacidade de modelar o sistema imunológico e direcioná-lo contra várias patologias, incluindo tumores, tem se mostrado devidamente promissora em relação às formas tradicionais de tratamento. O câncer de mama é a principal patologia que mais afeta as mulheres em todo o mundo. Sinais proteicos que regulam o sistema imunológico, chamados citocinas, são importantes aliados na imunomodulação. No entanto, várias avaliações do IL-10 revelam seu papel conflitante em relação à sua propriedade tumoricida. As células NK fornecem um dos mecanismos de defesa mais importantes contra tumores no corpo, e sua atividade citotóxica pode estar intimamente ligada ao IL-10. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade imunomodulatória do IL-10 e a expressão de células NK em coculturas com linhas de células tumorais mamárias MCF-7. Para isso, foram utilizados métodos de imunofenotipagem e análise por citometria de fluxo de células sanguíneas (MN e NK CD16+) coculturas com células tumorais mamárias MCF-7. Os resultados observados indicaram que a presença de IL-10 não interfere na expressão celular do NK CD16+, mantendo sua expressão diminuída em função do tempo. A expressão celular MN é alta em função do tempo, apesar da presença de IL-10. A expressão celular das células NK CD16+ foi atenuada em função do tempo na cocultura; no entanto, quando a cocultura foi estimulada pelo IL-10, observou-se um aumento na expressão das células NK CD16+ em 72 horas. Por outro lado, a expressão de MN na cocultura estimulada pelo IL-10 mostrou declínio, revelando uma interferência significativa do IL-10 no sistema.

**Palavras-chave:** Células NK, IL-10, MCF-7

## Interleucin-10 as an immunomodulating agent in NK and MCF-7 cell cultures

---

### ABSTRACT

The improvement of alternative methods related to the treatment and fight against cancer was fundamental for developing new study guidelines such as immunotherapy. Several studies maintain that the ability to model the immune system and target it against various pathologies, including tumors, has shown to be duly promising about traditional forms of treatment. Breast cancer is the main pathology that most affects women worldwide. Protein signals regulating the immune system, called cytokines, are important allies in immunomodulation. However, several assessments of IL-10 reveal its conflicting role about its tumoricidal property. NK cells provide one of the most important defense mechanisms against tumors in the body, and their cytotoxic activity may be closely linked to IL-10. Thus, this study aimed to evaluate the immunomodulatory activity of IL-10 and the expression of NK cells in cocultures with MCF-7 breast tumor cell lines. For this, we used methods of

immunophenotyping and analysis by blood cell flow cytometry (MN and NK CD16+) cocultured with MCF-7 breast tumor cells. The observed results indicated that the presence of IL-10 does not interfere with the cellular expression of NK CD16+, maintaining its expression decreased as a function of time. On the other hand, MN cell expression is high as a function of time, despite the presence of IL-10. The cellular expression of NK CD16+ cells was attenuated as a function of time in the coculture; however, when the coculture was stimulated by IL-10, an increase in the expression of NK CD16+ cells was observed in 72 hours. Conversely, the expression of MN in the coculture stimulated by IL-10 showed a decline, revealing a significant interference of IL-10 in the system.

**Keywords:** NK Cells, IL-10, MCF-7

---

## 1. INTRODUCTION

The innovation of alternative methods to fight cancer has been strongly represented by clinically efficient immunotherapeutic procedures when compared to traditional therapeutic methods. In such a way, the ability to model and strengthen the immune system has become allied with the fight against tumors and other infectious diseases (CHENG et al., 2013). Often using inhibitory and cytotoxic resources, such as inflammatory and apoptotic mechanisms, mainly of T and NK cells (natural killer) so that these cells can act directly in the elimination of tumor cells, immunotherapy is based on dynamically performing the positioning and modulation of the immune system against the needs of the immunological microenvironment (TAN; LI; ZHU, 2020; RILEY et al., 2019).

Protein stimulatory signals called cytokines are important molecules in the modulating contribution of the immune system, which make them fundamental resources for the development of immunotherapy (ANGRISH et al., 2016; BERRAONDO et al., 2019). Studies using interleukin-type cytokines as modulating agents have revealed that in addition to several molecular mechanisms influenced by tumor presence, interleukins can also promote an ideal in vitro environment for T cells to act against tumor survival (ANESTAKIS et al., 2015). On the other hand, some mechanisms of tumor evasion to cellular responses of T lymphocytes consist of the expression of suppressors that attenuate the effects of these cells. The pleiotropic and anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10), for example, can ratify this evasive process, normally characterized by the inhibition of the secretion of inflammatory cytokines by CD4+ T lymphocytes and the indirect functional inhibition of APCs (ANESTAKIS et al., 2015; RUTZ and OUYANG, 2016; SHEIKHPOUR et al., 2018). In addition, the relationship between IL-10 and regulatory T and B lymphocytes (Treg and Breg) is described as another possible mechanism of tumor evasion to the immune system, since the immunosuppressive activity of these cells may be favorable to the progression of cancer (SARVARIA, MADRIGAL and SAUDEMONT, 2017; SHITARA and NISHIKAWA, 2018). However, due to its controversial effects related to activity in tumor microenvironments (HOWELL and ROSE-ZERILLI, 2006), IL-10 proves to be a paradox to be unveiled in the scientific community, since, at the same time, reports its favorable contribution to tumor development, also reveal its cancer-suppressing characteristic (WANG et al., 2013; MANNINO et al., 2015).

Among the most common public health problems in the world, cancer is the main pathology with the highest number of incident cases (SIEGEL et al., 2018). Currently, among the most common malignant tumors, breast cancer appears to be the most responsible for the death of women and the second most lethal, behind only lung cancer (BRAY et al., 2018). Several studies have evaluated the effect of natural immunomodulators on blood cell coculture in the presence of MCF-7 breast tumor cell lines to stimulate apoptosis and minimize the cell viability of breast tumor cells (DA SILVA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; DE ARAÚJO et al., 2019). It is understood that NK cells are the main method of attack by the immune system against metastatic tumors. This includes preventing the growth and spread of neoplastic cells by mechanisms that are not always elucidated (CHENG et al., 2013; CHIOSSONE et al., 2018). The activity of NK cells against tumors is deferred by the direct elimination of target cells stimulated by activation signals, normally linked to levels of expression of

MHC class I molecules (MORVAN and LANIER, 2016). However, the possible pro/antitumor relationship between NK and IL-10 cells could be shortened in tests performed on mice, with the finding that IL-10's antimetastatic activity is lost in suppression of NK cells in deficient T cell mice. (KUNDU and FULTON, 1997; ZHENG et al., 1996).

Again, reports indicate IL-10 as a probable positive prognosis for malignant breast tumors, with an increase in the serological level of IL-10 in patients with breast cancer being noted several times (HAMIDULLAH et al., 2011), but possible antitumor effects can also be stimulated through the dosage of IL-10 antagonists (HAMIDULLAH et al., 2011; SHEIKHPOUR et al., 2018).

Thus, further studies should be conducted regarding the elucidation of the true immunomodulatory role of IL-10 in the tumor microenvironment, especially in breast cancer. In this case, the objective of this study was to evaluate the immunomodulatory role of IL-10 in cocultures of NK cells with tumor cell lines of mammary adenocarcinoma (MCF-7).

---

## 2. DEVELOPMENT

### Materials and Methods

#### Sample characterization and collection

Blood samples were donated by 6 clinically healthy nulliparous women aged between 20 and 28 years. None of them had addictions such as smoking or alcoholism or had chronic diseases, such as diabetes, hypertension or neoplasms. The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Mato-Grosso, Campus Araguaia (CAAE - Protocol Number: 1,415,375), and all volunteers signed an informed consent form. Approximately 5 mL of blood was collected from each volunteer, and subsequently, the samples were stored in tubes containing EDTA anticoagulant.

#### Isolation of mononuclear cells (MN)

Blood samples with EDTA were centrifuged for 40 minutes (160 x g) in a density gradient with Ficoll-Paque (Pharmacia, Upsala, Sweden), thus obtaining a monolayer of MN cells. The purified cells were resuspended in PBS medium and subjected to centrifugation for 10 minutes. After the second wash, the cell concentration was adjusted to  $2 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> (Honório et al., 2013).

Once obtained, MN cells were preincubated with or without 50 µL of IL-10 (100 ng / mL) and then subcultured in incubation plates with RPMI 1640 medium supplemented with 10% bovine fetal serum (SFB - Sigma, St. Louis, MO, USA), penicillin (100 µL), and streptomycin (100 µL) for 24 and 72 hours at 27 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, MN cells were washed twice.

#### Cultivation and Preparation of MCF-7 cells

The MCF-7 cell line derived from human breast adenocarcinoma was purchased from ATCC (American Type Culture Collection, USA).

The MCF-7 cell layer was treated in RMPI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) (Sigma, St. Louis, MO, USA), HEPES, penicillin (100 µL), streptomycin (100 µL) and sodium bicarbonate and maintained at a temperature of 37 °C to 5% CO<sub>2</sub> in a humid atmosphere. After trypsinization (Sigma, St. Louis, USA), the cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup> and incubated with or without 50 µL of IL-10 (100 ng / mL) for a period of 24 and 72 hours at temperatures from 37 °C to 5% CO<sub>2</sub>. The preparation of the MCF-7 cell line is similar to the protocol performed by De Araújo et al. (2019).

#### Coculture of MCF-7 and MN cells

The procedure for incorporating MCF-7 and mononuclear blood cells follows the same procedure described above. All samples were incubated in plates for 24 and 72 hours. The coculture was washed twice after incubation, and subsequently, the cells were subjected to gradual flow

cytometry analyses due to suspension in the fluid medium.

### Immunophenotyping and flow cytometry

After incubation of the coculture for 24 and 72 hours, anti-CD16 markers (10  $\mu$ L) were added and washed and resuspended in PBS-BSA after refrigeration for 30 minutes. Flow cytometry analysis (FACSCalibur, BD Bioscience, USA) - CellQuest software (BD Bioscience, USA) evaluated aspects such as size, granularity and fluorescence intensity of at least 5,000 suspended cells.

### Statistical analysis

Statistical calculations of analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test were used to determine the cellular expression of NK and MN cells and in coculture with MCF-7 cells with or without the presence of IL-10. The results were obtained considering the level of significance  $p < 0.05$ .

### Results

Expression of NK cells (CD16 +) in the presence or absence of IL-10

The expression of NK cells, labeled with CD16+, was observed by flow cytometry after 24 and 72 hours (Figure 1). Cell concentration was suppressed, regardless of the presence of IL-10, within 72 hours

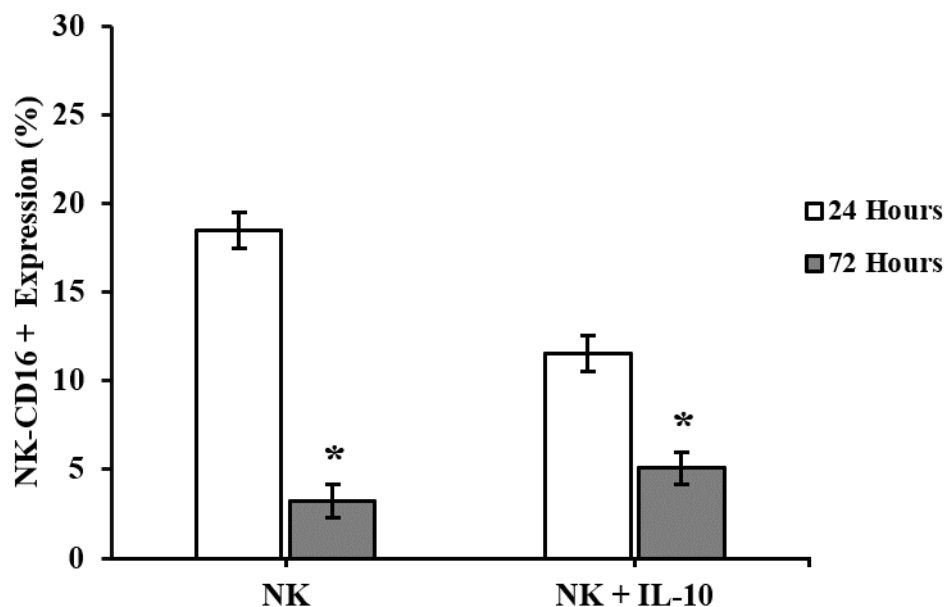


Figure 1: Percentage of NK cells in the blood expressing the CD16 + marker in the presence or not of IL-10 (Control Group). Expression of NK cells (CD16 +) (A). Expression of NK cells (CD16 +) treated by IL-10 (B). \* Statistically significant when compared to 24 hours with  $p = 0.0002$  in (A) and  $0.0458$  in (B) (ANOVA ( $p < 0.05$ )).

Figure 2 compares the expression of MN cells that do not express the CD16+ marker in the presence or absence of IL-10 as a function of time. Unlike NK cells (CD16+), other blood mononuclear cell types showed a high expression tendency, regardless of the presence or absence of IL-10, after a period of 24 hours.



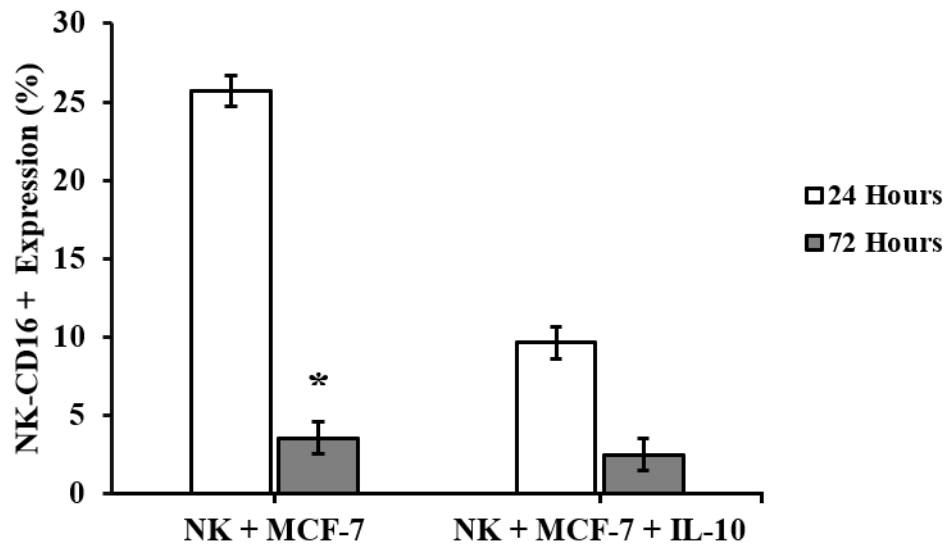


Figure 2. Percentage of blood mononuclear cells not labeled with CD16 + in the presence or not of IL-10 (Control Group). Expression of blood MN cells (A). Expression of blood MN cells treated with IL-10 (B). \* Statistically significant when compared to 24 hours with  $p = 0.0002$  in (A) and  $0.0458$  in (B) (ANOVA ( $p < 0.05$ )).

The results of the expression of blood NK cells that express the CD16+ marker in coculture with MCF-7 cells in the presence or absence of IL-10 are represented as a function of time by figure 3. Even in the presence of MCF-7 tumor cells, the expression of NK (CD16+) was attenuated in a period of 72 hours (Figure 3 A). However, after 72 hours, there was a tendency for IL-10 to prolong the cellular expression of NK (CD16 +) in blood together with MCF-7 cells (Figure 3 B).

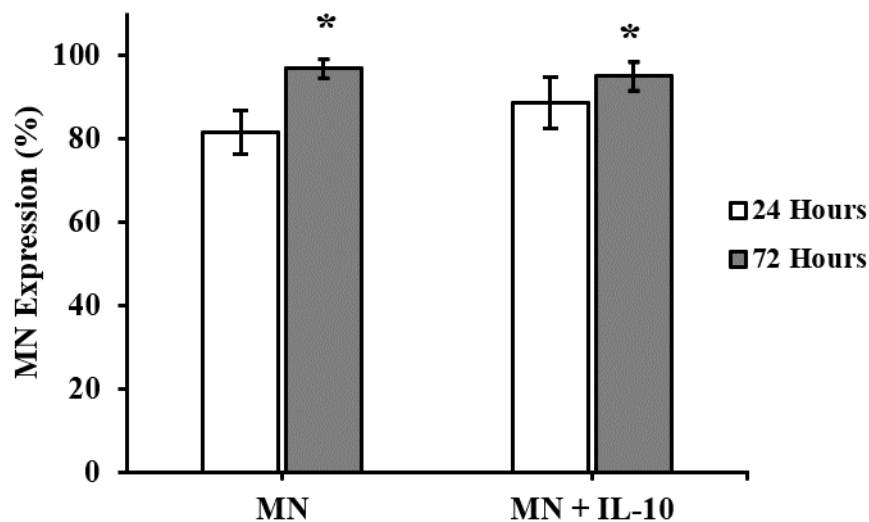


Figure 3. (CD16 +) in co-culture of MCF-7 cells in the presence or not of IL-10. Expression of blood NK (CD16 +) cells (A). Expression of NK cells (CD16 +) treated with IL-10 (B). \*  $p = 0.0377$  in (A) and  $0.0742$  in (B) (ANOVA ( $p < 0.05$ )).

In figure 4, the results of the cellular concentration of MN in the blood that did not express the CD16+ marker in coculture with MCF-7 breast tumor cells in the presence or absence of IL-10 are plotted against time. Even after 72 hours of incubation, the blood MN cells maintained a high expression profile (Figure 4 (A)). However, figure 4 (B) reveals the interference of IL-10 in the system by suppressing, in 72 hours, the expression of mononuclear cells in the presence of MCF-7 tumor cell

coculture.

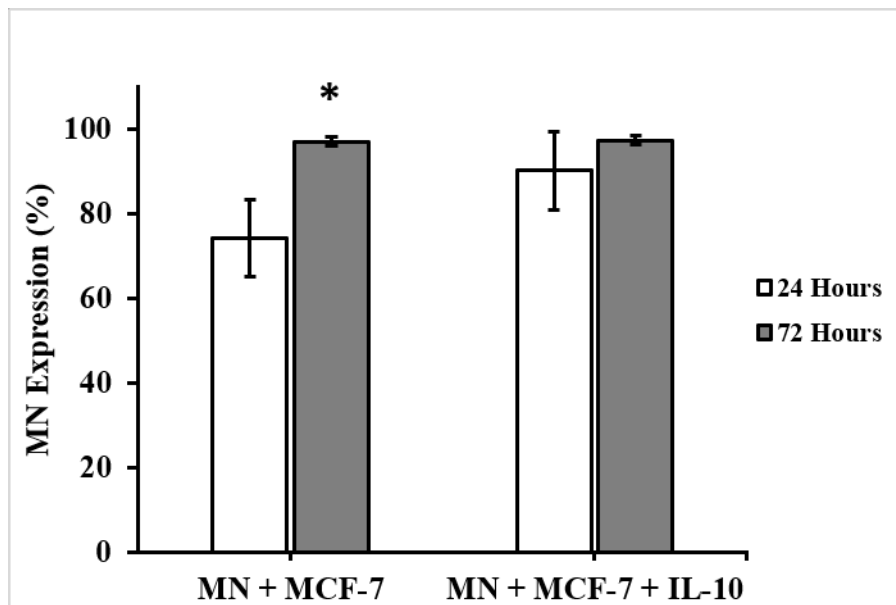


Figure 4. Expression of MN cells not labeled with CD16 + in MCF-7 cell co-culture in the presence or not of IL-10. ). Expression of blood MN cells (A). Expression of blood MN cells treated with IL-10 (B). \*  $p = 0.0377$  in (A) and  $0.0742$  in (B) (ANOVA ( $p < 0.05$ )).

## Discussion

The advancement of immunotherapeutic methods based on cytokine dosages was fundamental for the development of new therapies against cancer (AMEDEI and PRISCO, 2013). In the present study, we tested the effects of interleukin-10 on the expression of NK CD16+ and MN blood cells cocultured with human breast tumor cell lines (MCF-7). IL-10 demonstrated an influence on the expression of NK CD16+ and MN blood cells when cocultured with MCF-7 cells, suggesting possible cooperation between cytokines and tumor cells.

IL-10 is considered an anti-inflammatory cytokine because it is able to suppress the activity of immune responses. Its effects are summarized from the inhibition of the production of pro-inflammatory cytokines to the impairment of stimulatory signals that are fundamental for the regulation of cell-mediated immunity and may act, however, as a factor of growth and cell differentiation (WALTER, 2014). We demonstrate here that the presence of IL-10 does not modify the expression profile of NK CD16+ cells when compared to the control group. Cytotoxicity tests performed with NK cells in vitro in the presence or absence of interleukin-10 reveal the ability of this cytokine to raise the cytotoxic profile of NK cells by stimulating genes involved in regulating the cytotoxicity of these cells. However, IL-10 was unable to stimulate the migration and proliferation activity of NK cells, with positive regulation being verified in genes linked to apoptosis and inhibition of the cell cycle (MOCELLIN et al., 2004). The cellular expression of MN in the control group, unlike NK CD16+ cells, remained high after 72 hours of incubation. Similarly, Patpan et al. (2019), when comparing the viability of blood MN cells treated or not with serum from patients with Transplant Dependent Thalassemia (DTT), found that the viability of untreated cells (control) increased after the 72-hour period, which was inversely evidenced in the cells treated with the serum. As with the control group, there was an increase in MN cell expression as a function of time despite the presence of IL-10 in the culture. The treatment of IL-4 and IL-10 in human peripheral blood mononuclear cell cultures exposed to extracts of *Plasmodium falciparum* was decisive for the survival of these cells, thus preventing the induction of programmed cell death (apoptosis) by mechanisms not involved in cellular activation (BALDE et al., 2000). This makes evident the capacity in which IL-10 can act as a survival factor, since its presence did not interfere negatively with cell

viability. Originating from lymphoid parents, NK cells are the innate part of the immune system and act in the defense of the organism against viral infections and cancer cells (MALE and BRADY, 2014). After the interspersed incubation periods, flow cytometry analyses defined the expression profile of NK CD16+ cells cocultured with MCF-7 cells. Despite the presence of the tumor line, NK CD16+ cells were not stimulated, with a percentage of cell expression retracted after 72 hours of incubation. The performance of NK cell cytotoxic activity is compromised after co-cultivation with different cell types (JOHANN et al., 2010; PELIZZO et al., 2018; ZHAO et al., 2019), indicating that NK cells are liable to suffer immunosuppressive actions, especially in relation to other blood mononuclear cells.

Treatment with IL-10 in the cocultured NK CD16+ and MCF-7 cells promoted a prolongation in the expression of CD16+ NK cells in 72 hours. In a related way, the antimetastatic action of IL-10 in murine breast tumor models was stimulated in a manner dependent on the cellular activity of NK, having this property receded in the absence of these cells (KUNDU et al., 1996). This suggests that the antimetastatic activity of NK-dependent IL-10 may stimulate the survival of NK cells in the presence of tumor cells. Nevertheless, other studies, however, safeguard an inversely proportional relationship regarding the serum level of IL-10 and NK-mediated cytotoxicity in the support of gastric neoplastic cells, which indicates, in this case, a protective effect against stomach cancer promoted by cytokine IL-10 when at high serum levels (SZKARADKIEWICZ et al., 2010).

In this study, we demonstrated that the MCF-7 breast tumor line does not influence the viability of MN cells when cocultured. Similarly, in an attempt to verify the tumoricidal effect of BaCl<sub>2</sub> adsorbed on polyethylene glycol (PEG) carrier biocomposites (MCF-7 tumor cell lines), it was noted that the viability of MN blood cells cocultured with MCF-7 cells was not affected even with the presence of microspheres (DA SILVA et al., 2017)

However, the presence of IL-10 in the coculture has been shown to be effective in retracting MN cell expression from the blood. The comparison between the levels of IL-10 produced in vitro by blood monocytes from healthy women and those with breast cancer indicated higher levels of IL-10 expressed by cells of patients with breast cancer compared to those from healthy patients, suggesting that the tumor presence has a relevant influence on the expressed cytokine profile (MERENDINO et al., 1999). It is extremely important to note that the conditioning of regulatory T and B cells under the effect of IL-10 in tumor microenvironments is capable of promoting immunosuppressive effects and, consequently, attenuating immune responses against tumors (SCHWARTZ, ZHANG and ROSENBLATT, 2016; FUJIO, YAMAMOTO and OKAMURA, 2017). In this sense, cell inhibition mediated by regulatory lymphocytes appears to be an important defense mechanism used by tumors as a means of evading the immune system.

---

### 3. FINAL CONSIDERATIONS

The results suggest the activity of the pleiotropic cytokine IL-10 as an important immunomodulatory agent with regard to the performance of MN cells, specifically NK cells. Thus, a possible contribution to the advancement of new immunomodulatory therapies against cancer is evident. However, further studies and under different conditions and concentrations are required so that their interactions during coculture are revealed and better understood, thus being able to develop greater possibilities for the development of treatments against breast tumor cells (MCF-7).

---

### 4. REFERENCES

- ABBAS AK, Andrew H. Lichtman e Shiv Pillai. *Imunologia Celular e Molecular* - 8ª Ed. p. 23-40, 162-171. 2015.
- ABBAS, AK; LICHTMAN, A. H; POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução Raimundo

Gesteira. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2000.

ALMEIDA-OLIVEIRA, Aline; DIAMOND, Hilda R. A relevância das células natural killer (NK) e killer immunoglobulin-like receptors (KIR) no transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH). Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto, v. 30, n. 4, p. 320-329, Aug. 2008.

ALMEIDA OA, Diamond HR. Atividade Antileucêmica das Células Natural Killer (NK). Ver. Bras. de Cancerologia., Rio de Janeiro, v. 54, n. 3, p. 297-305. 2008.

ASADULLAH K, Sabat R, Friedrich M, Volk HD, Sterry W. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004.

BLOM B, Spits H. Development of human lymphoid cells. Annu Rev Immunol. 2006.

BLUMA G. BRENNER, PHD, \* SAM BENARROSH, BA, \* AND RICHARD G. MARGOLESE, MD\* Peripheral Blood Natural Killer Cell Activity in Human Breast Cancer Patients and Its Modulation by T-cell Growth Factor and Autologous Plasma, Cancer, 1986, v. 58, p. 895-902, 15 August 1986.

CARPI A, Nicolini A, Antonelli A, Ferrari P, Rossi G. Cytokines in the management of high risk or advanced breast cancer: An update and Expectation. Curr Cancer Drug Target. 2009.

COCA, S. et al. Evaluation of the antitumor activity of interleukin-12 in an experimental murine model of colorectal cancer induced by 1,2 dimethylhydrazine (DMH). Rev. esp. enferm. dig., Madrid, v. 97, n. 9, p. 619-628, sept. 2005.

COMANS-BITTER WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. J Pediatr 1997; 130: 388-393.

COOPER MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology of human natural killer cell subsets. Trends Immunol. 2001.

COOPER MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. Blood. 2001.

COSTELLO RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2002.

COUPER KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. J Immunol. 2008.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev. Bras. Reumatol., São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010.

DUARTE, Mariane Queiroz. Ação das células imunitárias natural killer contra células tumorais. 2016.

ELLSWORTH RE, Decewicz DJ, Shriver CD, Ellsworth DL. Breast Cancer in the Personal Genomics Era. Current Genomics., 11, 61-146. 2010.

ENGEL J, Kerr J, Schlesinger-Raab A, Sauer H, Hölzel D. Quality of life following breast-conserving therapy or mastectomy: results of a 5-year prospective study. Breast J. 2004.

FEITEN S, Dünnebacke J, Heymanns J, Köppler H, Thomalla J, Van Roye C, Wey D, Weide R. Breast Cancer Morbidity. Deutsches Arzteblatt. V 112, p. 537-544. 2014.

FITZGERALD KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE. The cytokine facts book (2nd edn), Academic Press, London. 2001.

GOLDSBY, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J. Immunology ed. 5. W. H. Freeman and Company, New York, USA. 2003.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. O que é câncer? Rio de Janeiro. Inca.gov.br. 2016.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, "INCA - CÂNCER - Tipo - Mama". Inca.gov.br. N.p. 2016.

JACOBS R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G et al. CD56 bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*. 2001.

JÄNICKE, RU. "MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3." *Breast cancer research and treatment*. 117(1): 219-221. 2009.

JOBIM, Mariana; JOBIM, Luiz F. J.. Células natural killer e vigilância imunológica. *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre, v. 84, n. 4, supl. p. S58-S67, Aug. 2008.

KESKIN DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD et al. TGF-beta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007.

KITAMURA Y, Kanakura Y, Fujita J, Nakano T. Differentiation and transdifferentiation of mast cells: a unique member of the hemopoietic cell family. *Int J Cell Cloning*. 1987.

KREEGER P.K.; LAUFFENBURGER D.A. Câncer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*. 31 (1), 2-8, 2010.

LEAL VM. Histórico da inserção da psicologia no tratamento oncológico [palestra]. Instituto Nacional de Câncer. Hospital do Cancer III. setembro 2001.

MENGER MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression. *Langenbecks Arch Surg*. 2004.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J.G.; GRAUDENZ, M. et al. Imunologia da gestação. AMRIGS. 2006.

MOFFETT-KING A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002.

NÚÑEZ CAC, Frómata MCI, Rubio GT. Factores ambientales y genéticos asociados al cáncer de mama en féminas del área de salud "28 de Septiembre". *MEDISAN*. 2011.

O'GARRA, A, Vieira, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007.

OLIVEIRA CMB, Rioko KS, Adriana MI, Luis RG, Reynaldo S. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anestesiol.*, Campinas, v. 61, n. 2, p. 260-265, Apr. 2011.

PARKIN J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001.

PEGRAM H. J, Andrews D.M., Smyth M.J., Darcy P.K., Kershaw M. H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology*. 2010.

ROBERTSON MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990.

RODRÍGUEZ GJ, Rodríguez GA, Triana TA, Mendoza TR. Conocimientos de los factores de riesgo sobre cáncer de mama en Puerto La Cruz, estado Anzoátegui, Venezuela. *Rev haban cienc méd*. 2012.

RONCAROLO MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 212, p.28-50, 2006.

SABAT R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21. 2010.

SIACHOQUE H, Milcíades I, Lilian C, Olga G, Angie G, et al. Determinación de interleucina-10 (IL-10) en pacientes con cáncer en estadios III y IV tratados con dexametasona. *Rev. Cienc. Salud, Dic*, vol.3, no.2, p.148-155. 2005.

SIMSTEIN R, BUROW M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system." *Experimental biology and medicine* 228(9): 995-1003. 2003.

- SOMMER C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. - Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010.
- TONEVA M, Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S, Vu-Trien A, Michaylova A, Naumova E, McCluskey J, Charron D. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. Tissue Antigens. 2001.
- VALENTIN QUIROGA, Fernández Casanova L, Génesis Martín I, Nuñez Martín F, Pérez Martínez A.J. Kill the Killers: terapia con células Natural Killer en pacientes pediátricos con cáncer refractario. Sanid. Mil., Madrid, v. 68, n. 3, p. 141-146, sept. 2012.
- VEGA JR, Vilaplana JC, Biro A, Hammond L, Bottazzo GF, et al. IL-10 expression in thyroid glands: protective or harmful role against thyroid autoimmunity? Clin Exp Immunol. 1998.
- VENÂNCIO JL. Importância da atuação do psicólogo no tratamento de mulheres com câncer de mama. Rev Bras Cancerol. 2004.
- WOLK K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? J Immunol. 2002.
- ZHANG JM, An J - Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin 2007.

# **CAPÍTULO 4**

## **VISCOSIDADE, TEOR CALÓRICO E IMUNOGLOBULINAS NO COLOSTRO E LEITE MADURO SUBMETIDOS À PASTEURIZAÇÃO**

**AUTORES:**

**Talita Puttini Blanco Ferres**

**Claudia Cristina Pereira**

**Eduardo Luzía França**

**Adenilda Cristina Honório-França**

# Viscosidade, teor calórico e imunoglobulinas no colostro e leite maduro submetidos à pasteurização

**Autores: Talita Puttini Blanco Ferres, Claudia Cristina Pereira, Eduardo Luzia França, Adenilda Cristina Honorio-França**

*Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia-UFMT*

---

## Resumo

O leite humano é a principal fonte de nutrientes que o recém-nascido necessita nos primeiros seis meses, considerado um alimento completo e suficiente tem como finalidade suprir todas as necessidades nutricionais e imunológicas. A amamentação é um ato biologicamente natural que além de proteger a criança, e trazer benefícios pós-parto para a mãe, cria um vínculo afetivo que vão refletir no desenvolvimento garantindo benefícios futuros. É importante garantir o sucesso da amamentação, que não depende apenas da capacidade da produção de leite da mãe, nem da capacidade da criança sugar. A eficácia relaciona com fatores históricos, psicológicos e sociais, além do apoio familiar, comunitário e profissional. Por isso é preciso fazer a manutenção e conferir a eficácia dos bancos de leite ao disponibilizarem o leite materno para os bebês que nasceram com carência nutricional ou que o leite de sua mãe ainda não é suficiente. Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar a viscosidade, o teor calórico e as imunoglobulinas do leite humano pasteurizado em diferentes estágios de maturação. Foram avaliadas amostras de colostro (1 ao 7º dia) e leite maduro (a partir do 15º dia) de mulheres, maiores de 18 anos clinicamente saudáveis. Avaliou-se nas amostras de colostro leite humanos o teor de gordura e caloriais pelo método do crematócrito, a viscosidade em função da taxa de cisalhamento através do reômetro e a concentração de imunoglobulinas pelo método de turbidimetria. Os resultados foram tabulados e realizados o tratamento estatístico. Conclui-se que o leite oferecido em banco de leite, do ponto de vista nutricional e imunológico em relação à qualidade, os padrões estabelecidos e executados são os mais adequados possíveis até o presente momento. Mas quando tratar-se de crianças recém-nascidas de baixo peso, ou com alta deficiência imunológica, o leite administrado deve ser exclusivamente do tipo colostro armazenado no máximo no banco de leite pelo período de 15 dias, a partir de então, não é que deva ser descartado, mas sim, administrado para outras crianças, as que nasceram saudáveis.

**Palavras-chave:** Colostro, Leite maduro, Pasteurização.

## Viscosity, caloric content and immunoglobulins in colostrum and mature milk submitted to pasteurization

---

### ABSTRACT

Human milk is the first and main source of nutrients that the infant needs for the first six months considered a complete and sufficient food is intended to meet all the nutritional and immunological needs early in life. Unfortunately, it is not assigned due importance, sometimes for very minor issues such as body aesthetic or cultural shame. Breastfeeding is a biologically natural act that in addition to protecting the child, and bring postpartum benefits for the mother, creates an emotional bond that will reflect on the development ensuring future benefits. It is important to ensure the success of breastfeeding, which depends not only on mother's milk production capacity, or the child's sucking ability. Effectiveness relates to historical, psychological and social factors in addition to family,



community and professional support. So we need to maintain and check the effectiveness of milk banks by delivering breast milk for babies born with nutritional deficiency or the milk of his mother is still not enough. Thus, this study aimed to analyze viscosity, calorie and immunoglobulins of pasteurized human milk and unpasteurized at different stages of maturation. This is a qualitative, descriptive study. The target audience were women, 18 years, who were breastfeeding their child from 1st to 7th day colostrum and then from the 15th day mature milk. Seeks to include the objectives of the study used the content analysis by creatatocrit method to know the fat content and calories was made rheological parameters of viscosity, and immunoglobulins by immunoturbidimetric tests. The results were tabulated and performed the statistical analysis. We conclude that milk offered in milk bank, nutritional and immunological point of view regarding the quality, the standards set and implemented are the most appropriate possible until now. But when to treat is newborn underweight children, or high immune deficiency, given milk should be exclusively colostrum type stored for a maximum milk bank for 15-day period, from then, is not that It should be discarded, but, given to other children, who were born healthy.

**Keywords:** Colostrum, Mature milk, Pasteurization.

---

## 1. INTRODUÇÃO

O leite humano é uma secreção da glândula mamária produzido sob o estímulo de vários hormônios. Esta secreção é a principal fonte de nutrientes que o recém-nascido necessita nos primeiros meses de vida. Diferente do leite comercial, o leite materno possui todas as propriedades que garante o desenvolvimento saudável do recém-nascido. Rico em proteína, açúcar, gordura, vitaminas, água e minerais, ele ainda incorpora elementos que o leite adaptado não consegue, estes são os anticorpos e células, que vão garantir o bom desenvolvimento do bebê e protegê-lo de doenças (SILVA & SOUZA, 2005).

O leite humano é considerado um alimento completo e suficiente até os seis meses de vida da criança, não precisando de complemento, a não ser por especificações e prescrições médicas (BRASIL, 2002).

Sua produção tem por finalidade suprir todas as necessidades nutricionais e imunológicas no início da vida. Não existindo leite fraco ou forte, como diz popularmente, ele é suficiente, equilibrado e adequado para seu filho ter um bom desenvolvimento da criança. São inúmeros os benefícios que o aleitamento materno pode trazer ao longo do tempo, a princípio cria uma forte ligação emocional entre mãe e filho, desenvolvendo emocionalmente o bebê, passando segurança e carinho, e até protegendo a mãe de depressões pós-parto. Vínculos afetivos estabelecidos, que trarão benefícios futuros, facilitando relações interpessoais, e desenvolvimento psicomotor deixando a criança mais inteligente (ALMEIDA et al., 2004).

O ato mecânico da amamentação também garante vantagens, como a melhor flexibilidade na articulação das estruturas respiratórias nasais. O leite materno é um alimento facilmente digerido, que está sempre pronto, que não requer cuidados como demanda o manuseio e esterilização de mamadeiras, contribuindo na economia familiar. Amamentar confere segurança à mãe, com queima de calorias, ajuda a retornar ao peso anterior a gestação, facilita a cicatrização e ao retorno do tamanho normal do útero. Protege a criança de inúmeras infecções e alergias, devido a presença de células e de fatores imunológicos, além de diminuir cólicas e estresses (MURAHOVSKI et al., 1987).

Frente à tamanha importância, esse alimento requer obrigatoriamente uma atenção especial. No entanto, para crianças prematuras que apresentam dificuldades em sugar, bem como mães por vários motivos patológicos não conseguem amamentar seus filhos uma alternativa eficaz é recorrer aos bancos de leite.

Os bancos de leite são locais que recebem e processam o leite humano para que seja ofertado de maneira segura aos recém-nascidos. Neste contexto, este leite passa por vários processos que vai desde análises sensoriais, microbiológicas, bem como tratamentos químicos (pasteurização) e físicos

(congelamento). Devido a importância do aleitamento materno, em especial para as crianças usuárias de banco de leite, a manutenção das propriedades imunológicas e nutricionais do leite humano se torna fundamental após os diferentes tratamentos. Assim, avaliar os efeitos destes tratamentos sob a durabilidade e qualidade do leite antes e após o armazenamento, pode ser de fundamental importância para auxiliar os profissionais que trabalham em banco de leite, no sentido de ofertar aos recém-nascidos um produto de melhor qualidade.

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

### Coleta das amostras

Trata-se de um estudo prospectivo tipo corte transversal desenvolvido no Laboratório de Imunologia materno-infantil, da Universidade Federal do Mato Grosso – Campus Universitário do Araguaia. O estudo foi realizado com leite humano doado por mães voluntárias que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. As coletas foram realizadas no período de maio de 2015 a fevereiro de 2016.

Foram coletas 18 amostras de colostro (1<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia) e 18 amostras de leite maduro de (após 15 dias pós-parto) de doadoras clinicamente saudáveis, que não apresentavam doenças como hipertensão, diabetes e sorologia negativa para HIV, sífilis e hepatite. O total de amostras avaliadas neste trabalho foi de 36 amostras.

Para a realização das coletas, inicialmente foi realizado contato com as possíveis doadoras na maternidade. Posteriormente as puérperas foram visitadas em seus domicílios. Antes da coleta as mães concordaram em doar duas amostras, uma de colostro e outra de leite, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A coleta foi realizada manualmente, dentro das normas de biossegurança. Aproximadamente 8 a 10 ml de colostro ou leite maduro foram coletados em tubo falcon estéril e colocados em caixa de isopor com gelo até o transporte ao laboratório, onde foram processados

### Grupos experimentais

As amostras foram divididas de acordo com o estágio de maturação em dois grupos: Colostro (N=18) e Leite maduro (N=18).

A seguir as amostras foram subdivididas em 5 (cinco) subgrupos: Não pasteurizado e Não congelado (in natura), Pasteurizado não congelado (PNC), Congelado 15 dias (C15); Congelado 30 dias (C30), Pasteurizado e Congelado 15 dias (PC15) e Pasteurizado e Congelado 30 dias (PC30).

### Determinação do teor de gordura e calorias

O valor calórico e teor de gordura foram obtidos pelo crematócrito. Uma parte das amostras foram separadas em tubos e foram incubadas em banho-maria a 40°C por 15 minutos. A seguir as amostras foram colocadas em tubo capilares (Figura 2) e centrifugadas em centrífuga de capilares (FANEM®, modelo 250 – Figura 3) por 15 minutos a 10.000 rpm. Para cada amostra de colostro e leite foram feitos dois capilares. A seguir foi realizado a leitura do capilar, sendo medido com uma régua a coluna total e a coluna do creme. Foram obtidos os valores de porcentagem do teor de creme e da coluna total. Através dos resultados obtidos foram calculados o teor de gordura e calorias através das seguintes fórmulas descritas a seguir:

- 1)  $CREME \% = \text{coluna de Creme (mm)} \times 100 / \text{coluna total (mm)}$
- 2)  $TEOR DE GORDURA \% = (\% \text{ de creme} - 0,59) / 1,46$
- 3)  $KCAL/L = (\% \text{ creme} \times 66,8) + 290$

## Pasteurização

A pasteurização das amostras foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido em bancos de leite humano. As amostras coletas em tubos de ensaio falcon, vedadas e colocadas em uma grade foram levadas ao banho-maria a 56 °C por exatos 40 minutos. Após este período as amostras passaram por um rápido resfriamento até 4°C.

## Análise dos parâmetros reológicos do leite

Os parâmetros reológicos foram determinados utilizando o Reômetro MCR 102 (Anton Paar® GmbH, Ostfildern, Germany) acoplado ao Software Rheoplus V3.61, com controle permanente do gap de medição com suporte TruGap™ em 0,099 mm, célula de medição Toolmaster™ CP 50 e controle preciso da temperatura com recurso T-Ready™.

Para os ensaios foram colocados 600 µL da amostra de colostro ou leite processados ou não sobre a superfície da placa de leitura com auxílio de uma seringa de 1 ml, sendo removido o excesso da amostra, com papel toalha e, para uma nova leitura, é removido da placa a amostra com papel toalha, depois higienizada com álcool 70%.

Para as curvas de fluxo e viscosidade a tensão de cisalhamento (T) variou de 0 a 5 Pa.s para curva ascendente e de 5 a 0 Pa.s para a curva descendente, com isso foi possível determinar a área de histerese, que representa os níveis de diferença entre a curva ascendente e a descendente (ida e volta). Estes ensaios foram realizados em condições isotérmicas a 25°C.

Para a curva de viscosidade sob rampa de temperatura, os parâmetros estabelecidos foram o controle fixo da tensão de cisalhamento (T) em 1 Pa.s e a variação de temperatura de 5 ± 0,1 a 45 ± 0,1°C com taxa de aquecimento de 1°C/minuto. Serão registrados parâmetros a cada 0,5 ± 0,1°C.

## Determinação da concentração de imunoglobulinas

A concentração de imunoglobulinas no colostro e leite foram realizadas no sobrenadante. Para obtenção deste sobrenadante as amostras de colostro leite humano foram centrifugadas durante 15 minutos a 1500 rpm, sob refrigeração de 4°C. A centrifugação permite a separação do colostro em três fases nítidas, a gordura, a porção fluída intermediária, e as células mononucleares o “botão”. A camada superior composta de gordura e a camada inferior o “botão” foram desprezadas, a porção intermediária sobrenadante de cada amostra foi armazenado em tubos eppendorf reservado em alíquotas para posteriores análises.

Para a determinação de IgA, IgG e IgM, foi utilizado o método Imunoturbidimétrico adaptado para o leite humano, onde o anti-soro específico forma com a imunoglobulina A, G e M, um complexo insolúvel dando uma turbidez cuja intensidade é proporcional à quantidade de antígeno determinado em espectrofotômetro a 340 nm.

Os reagentes são compostos por anticorpos anti-IgA ou anti-IgG ou anti-IgM, respectivamente dependendo do kit utilizado para dosar IgA, IgG ou IgM; Tampão Tris 20 mM pH 8,2; PEG 8000 e azida sódica 0,095% p/v. As condições de armazenamento e estabilidade devem ser seguidas de acordo com as especificações do kit. Para a determinação da curva padrão foi utilizado o Calibrador Multiparâmetro Biotécnica – CAT BT 21.002.00.

Para o preparo, todas as amostras, calibradores e controles previamente diluídos com solução salina (NaCl 0,9%) na porção de 1:5 na IgA, 1:15 na IgG e 1:11 na IgM. A seguir foram colocados 10 µL de calibrador, 10 µL da amostra e 10 µL dos controles em 1 mL do anti-soro específico (R1) para cada imunoglobulina e incubados em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. Após este período foi realizada a leitura em espectrofotômetro a absorvância de 340 nm.

A concentração de cada imunoglobulina foi obtida utilizando a fórmula descrita abaixo,

$$\text{Ig (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Calibrador}} \times \text{Concentração Calibrador (mg/dL)}$$

## Resultados e discussão

O perfil da curva de viscosidade do CP In-natura teve uma alteração (diminuição) em relação ao de 15 e 30 dias. Diferente do que aconteceu no CNP, houve uma alteração na viscosidade no grupo de 30 dias. Ou seja, isso é um indicativo de que o processo de pasteurização do Colostro contribui para dar mais estabilidade ao seu perfil de viscosidade, já que o grupo de 30 dias no CNP teve uma nítida e alta variação na viscosidade, enquanto isso não se revelou no CP.

O perfil da curva de viscosidade do LMP In-natura teve uma alteração (diminuição) em relação ao de 15 e 30 dias, no entanto foi evidenciado que a curva dos grupos de 15 e 30 dias ficaram semelhantes. O mesmo aconteceu para o LMNP, a curva dos grupos 15 e 30 ficaram bem próximas. Ou seja, para o LM o processo de pasteurização não influenciou, o que causou alteração foi o congelamento.

Além da viscosidade deve ser considerado os componentes imunológicos presentes na secreção. A IgA é uma imunoglobulina presente no leite humano cuja a função é conferir proteção para a criança de infecções bacterianas ou virais nas superfícies das mucosas. Este anticorpo é capaz de inibir a aderência desses agentes patogênicos às células epiteliais. Também é capaz de reduzir a absorção de uma variedade de antígenos ou alérgicos, inalados ou ingeridos, que podem desencadear respostas imunes (Almeida, 1999).

A IgA é a imunoglobulina mais encontrada nas secreções mucosserosas (leite, colostro, saliva, urina, etc.). A associação de duas moléculas de IgA, ligadas por uma cadeia J, a uma proteína chamada componente secretor, sintetizada por células epiteliais, é responsável pelo transporte da IgA para o colostro e ainda protege-as da ação proteolítica quando passam pelo sistema gastrointestinal. É a principal imunoglobulina presente no colostro e pode ser encontrada sob duas subclasses: a IgA1 (mais encontrada no soro) e a IgA2 (encontrada em grandes quantidades nas secreções). A SIgA está presente no colostro, tem a função de inibir a adesão de vírus e bactérias e a exclusão imune (processo não inflamatório para manter fora do organismos toxinas, microorganismos e outros materiais antigênicos perigosos) e pode atuar também como opsonina, ligando-se a superfície de bactérias, sinalizando para os fagócitos a presença de um antígeno, facilitando o englobamento (CARNEIRO, et al., 1996).

A concentração de IgA (mg/dL) no colostro In-natura diminuiu em relação ao de 15 e 30 dias e, não apresentou diferença significativa entre os grupos 15 e 30 dias. Para a concentração de IgA (mg/dL) no Leite Maduro não apresentou diferença significativa entre nenhum grupo, decaindo sua concentração imperceptivelmente. Ou seja, podemos ver que a concentração da imunoglobulina IgA tem sua concentração maior no Colostro, tanto para In-natura que é elevadíssima como para 15 e 30 dias, quando comparado aos grupos do Leite Maduro.

A IgG confere imunidade passiva ao lactente atravessando a barreira transplacentária e através do leite materno, apresentando-se em menor quantidade que a IgA, aproximadamente. As quatro subclasses estão presentes no colostro, e IgG1 e a IgG3 são eficientes na ativação do sistema complemento, apresenta atividade opsonizante (proteína que da susceptibilidade à fagocitose) e atua contra vírus, protozoários, antígenos de salmonela e toxinas bacterianas (REGO, 2004).

A concentração de IgG (mg/dL) no Colostro In-natura diminuiu muito em relação ao de 15 e 30 dias. E para a concentração de IgG (mg/dL) no Leite Maduro In-natura diminuiu pouco em relação ao de 15 e 30 dias, ou seja, essa imunoglobulina se apresentou em maior quantidade no Colostro In-natura quando comparada ao LM In-natura, agora para 15 e 30 dias foram semelhantes.

É a imunoglobulina mais eficiente em ativar o sistema complemento por isso é frequentemente encontrada na resposta a organismos infecciosos antígenicamente complexos.

A IgM é a segunda imunoglobulina mais abundante no colostro, aproximadamente 2,5mg/ml. A afinidade de IgM pelo receptor da imunoglobulina polimérica das células epiteliais, possibilita sua secreção na forma polimérica já ligada ao componente secretor. A IgM, também é resistente a acidez do sistema digestivo, chegando intactas às fezes do neonato. Os anticorpos IgM de alta avidéz reativos com vírus e bactérias podem ter um importante papel na defesa das mucosas no lactente (ROITT, 2002).

A concentração de IgM (mg/dL) no Colostró In-natura não apresentou diferença significativa entre nenhum grupo e, ainda apresentou uma baixa concentração. Para a concentração de IgM (mg/dL) no Leite Maduro In-natura não houve diferença significativa entre nenhum grupo e, apesar da sua baixa concentração, ela ainda foi apresentada em maior quantidade quando comparada com as concentrações do Colostró. Contrariando ROITT (2000), que dizia que a IgM é a segunda imunoglobulina mais abundante no colostró, nessa análise a IgM se apresentou com maior concentração no Leite Maduro.

---

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embasado nessa importância, esse trabalho partiu do princípio de analisar o perfil da viscosidade, o teor calórico e as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, no Colostró e no Leite Maduro, divididos em, aqueles que foram submetidos ao processo de pasteurização e, os que não foram pasteurizados, com a colaboração de mães que estavam amamentando. Com os resultados obtidos nas análises e dosagens foi possível chegar às seguintes considerações finais:

- ⊙ O Teor Calórico analisado no leite materno, Gordura e Kcal/L, obtiveram resultados in-natura sempre maiores do que 15 e 30 dias, independente da pasteurização ou não, ou seja, ao passar do tempo (período de congelamento) o teor calórico é decrescente no Colostró e Leite Maduro. Em alguns casos, houve semelhança/proximidade na Gordura % e na Kcal/L de 15 para 30 dias;

- ⊙ A viscosidade do Colostró in-natura do grupo Pasteurizado apresentou um comportamento alterado, devido ele não ter passado pela pasteurização;

- ⊙ No Colostró Pasteurizado, os grupos 15 e 30 dias apresentou perfil de viscosidade semelhante, indicativo que o processo de pasteurização melhora a estabilidade do perfil da curva de viscosidade ao longo do tempo;

- ⊙ O Colostró Não pasteurizado reafirmou, através do aumento no grupo de 30 dias, o que foi apresentado/indicado no Colostró Pasteurizado, que o processo de pasteurização no colostró confere estabilidade a sua viscosidade;

- ⊙ O Leite Maduro Pasteurizado mostrou que a pasteurização aproxima o perfil de viscosidade dos grupos de 15 dias com o de 30 dias em relação ao in-Natura;

- ⊙ No Leite Maduro Não Pasteurizado, qualquer variação ocorrida no grupo in-natura em relação aos demais se deve ao congelamento, até mesmo porque esse grupo não foi submetido ao tratamento de pasteurização;

- ⊙ Houve alteração no perfil de viscosidade do grupo in-natura em relação aos grupos 15 e 30 dias, tanto para o Colostró quanto para o Leite Maduro. Tal comportamento não está associado ao processo de Pasteurização e sim ao processo de congelamento;

- ⊙ Embora houve redução no teor calórico no Colostró pasteurizado, ela não se revelou na viscosidade e, para o grupo não pasteurizado a redução de gordura se mostrou evidente no perfil da curva de viscosidade;

- ⊙ Comparando a viscosidade com a percentagem de gordura e a quilocaloria/litro no Colostró Pasteurizado e no Colostró Não-Pasteurizado houve uma diminuição gradativa;

- ⊙ Todas as imunoglobulinas diminuíram com o a período de congelamento, ou seja, o tempo interferiu nos antígenos, apesar de já serem apresentados em baixas concentrações;

- ⊙ A imunoglobulina IgA teve sua concentração mais elevada no Colostró, do que a IgG e a IgM;

- ⊙ Destaque para a imunoglobulina IgM no Leite Maduro In-natura que apesar da sua baixa concentração, se apresentou em maior quantidade quando comparada com as concentrações do Colostró.

Em suma, a amamentação é um processo complexo, com muitos fatores envolvidos, de ordem biológica, social, cultural, étnica/racial, econômica e emocional. Devido a sua importância no curto, médio e longo prazo para as pessoas envolvidas, em especial para a criança, torna-se um desafio para o profissional de saúde conduzir adequadamente esse processo, auxiliando a mãe a ter uma

amamentação bem sucedida, mas sempre atento às necessidades da criança, da mãe e da família, e quando esse ato é de algum modo adiado ou impedido, entra a importância do trabalho dos profissionais da área da saúde, que devem sempre estar trazendo novos conhecimentos sobre o leite materno, desse modo, entendendo melhor suas características e a melhor forma de armazenamento nos Bancos de Leite para posteriormente ser ofertado um leite de qualidade a aquelas crianças que necessitam. Ofertando o leite mais adequado aos recém-nascidos de baixo peso.

---

#### 4. REFERÊNCIAS

- [1] SILVA, A.P.; SOUZA, N. Prevalência do aleitamento materno. *Revista de Nutrição*, v. 18, n. 3, p. 301-310, 2005.
- [2] BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana de Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável, guia alimentar para crianças menores de 2 anos. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 45 p.
- [3] ALMEIDA, N.A.M.; FERNANDES, A.G.; ARAÚJO, C.G. Aleitamento materno: uma abordagem sobre o papel do enfermeiro no pós-parto. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 6, n. 3, p. 358-367, 2004.
- [4] MURAHOVSKI J, Teruya KM, Nascimento ET, Bueno LGS, Pinheiro L, Maneta ME, et al. Maneta, Maria Emília; Dizaro, Jane Ellen; Patz, Cláudia C. Costa; Gimenes, Adriano Rubini. Curvas e tabelas de crescimento de lactentes brasileiros de 0-6 meses de idade alimentados exclusivamente com leite materno. *J Pediatr (Rio J)*. 1987; 63:153-75.
- [5] ALMEIDA, J.A.G. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1999.119p.
- [6] CHRISTINE D. WANG, BS; PATRICIA S. CHU, BS; BEVERLY G. MELLEN, PHD; JAYANT P. SHENAI, MD. J. perinatol; (Creatocrit and the nutrient composition of human milk) 1999; 19: 343-346.
- [7] COSTA, M.C.O. et al Estudo do perfil lipídico do colostro de adolescentes mães de recém-nascidos prematuros. *Jornal Pediatria*, Porto Alegre, v.67, n.7, 1991.
- [8] FAGUNDES, D.L.G.; FRANÇA, E. L.; MORCELLI, G.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I. M. P.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. The Role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. *Clinical and Developmental Immunology*. JCR, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- [9] FRANÇA, E. L.; CALDERON, I.M.P.; VIEIRA, E.L.; MORCELLI, G.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; Transfer of Maternal Immunity To Newborns of Diabetic Mothers. *Clinical & Developmental Immunology (Print)* JCR, v.2012, p.928187, 2012.
- [10] GROSS, S.J et al. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. *J. Pediatr*, St. Louis: n.4, p.641-644, 1980.
- [11] HONÓRIO-FRANÇA, A.C.; ISAAC, L.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Atividade Microbida dos Fagócitos Mononucleares do Colostro Humano para Escherichia Coli Enteropatogênica (EPEC) Opsonizada Pela IgA do Próprio Colostro. In: I Encontro de Pesquisa do Departamento de Imunologia do ICB-USP., 1996, São Paulo – SP.
- [12] MÜLLER, H. G. Introducción a la reología de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1973. 174 P.
- [13] PINHATA, M.M.; GONÇALVES, L.G. Alimentação do recém-nascido. *Pediatria Moderna*, São Paulo: v.XXXII, n.1, p.22-32, 1996.
- [14] STEFFE, J. F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*. 2nd ed. East Lansing: Freeman Press, 1996. 418 p. PMCID:PMC1303637.

# **CAPÍTULO 5**

## **POTENCIAL DE AÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA ASSOCIADO A APLICAÇÃO DA ALTA FREQUÊNCIA NO TRATAMENTO DE ONICOMICOSE**

**AUTORES:**

**Williana Adriane da Silva**

**Raniana Cecilia Fratari Queiroz**

**Carolina Carnicel**

## Potencial de ação antifúngica do óleo essencial de melaleuca associado a aplicação da alta frequência no tratamento de onicomicose

**Williana Adriane da Silva<sup>1</sup>, Raniana Cecilia Fratari Queiroz<sup>2</sup>, Carolina Carnicel<sup>3</sup>:**

<sup>1</sup>Egressa Curso de Tecnologia em Estética e Cosmética do Centro Universitário do Vale do Araguaia – UNIVAR, Barra do Garças, MT.

<sup>2</sup>Especialista em Citologia Clínica pela UFG, Pós Graduada em Tópicos em Genética pela UFMT, Farmácia Estética pelo Instituto Nepuga e Docência do Ensino Superior pelo UNIVAR, Docente do Curso de Tecnologia em Estética e Cosmética e Farmácia Centro Universitário do Vale do Araguaia – UNIVAR, Barra do Garças, MT.

<sup>3</sup>Farmacêutica bioquímica, Especialista em Saúde Pública, Farmácia Clínica e Docência no Ensino Superior-Centro Universitário do Vale do Araguaia – UNIVAR, Mestre em Ciência de Materiais -UFMT, Barra do Garças, MT.

---

### Resumo

A onicomicose é uma infecção fúngica, com degradação da queratina e da proteína que constitui a maior parte das unhas. As unhas dos pés são as mais afetadas, pois lidam mais frequentemente com ambientes úmidos, escuros e quentes. O tratamento da onicomicose hoje em dia é visto pela população portadora como algo de difícil acesso quando o assunto é tratamento, pois as baixas taxas de cura são o reflexo da dificuldade que existe no tratamento. Há muitas variedades em medicamentos antifúngicos que muitas das vezes não são tão eficazes devido à pouca permeação na unha, sendo assim o ideal é fazer a remoção da parte comprometida para melhor permeação do ativo. Visando melhorar essa patologia foi pensada em um tratamento com óleo essencial de melaleuca juntamente com a aplicação de alta frequência a fim de potencializar os resultados obtidos pelo óleo de melaleuca, onde foi obtido resultados positivos.

**Palavras-chave:** Alta-frequência. Onicomicose. Óleo de Melaleuca. Micose em unhas.

## Potential for antifungal action of tea tree essential oil associated with high frequency application in the treatment of onychomycosis

---

### ABSTRACT

Onychomycosis is a fungal infection, with keratin degradation and the protein that makes up most of the nails. Toenails are the most affected, as they most often deal with humid, dark, and hot environments. The carrier population sees the treatment of onychomycosis today as something difficult to access when it comes to treatment, as the low cure rates reflect the difficulty that exists in the treatment. Many varieties of antifungal drugs are often not as effective due to little permeation in the nail, so the ideal is to remove the compromised part for better permeation of the active. Aiming at improving this pathology, a treatment with tea tree essential oil was thought of along with the application of high frequency to enhance the results obtained by tea tree oil, where positive results were obtained.

**Keywords:** High Frequency. Onychomycosis. Melaleuca oil. Ringworm on nails.



---

## 1. INTRODUÇÃO

As unhas são formadas por camadas de células queratinizadas que apresentam estruturas córneas resistentes, translúcidas, com brilho e curvatura características e estão localizadas sobre a superfície dorsal das falanges dos dedos das mãos e dos pés, [4]. São constituídas por estruturas epiteliais queratinizadas, sendo elas: as pregas ungueais, o leito ungueal, o hiponíquio e a matriz.

Vários fatores como o sexo, idade, doenças sistêmicas ou locais, uso de medicamentos e cosméticos, e condições ocupacionais e sazonais podem influenciar no crescimento das unhas, o que determina variações significativas na taxa de crescimento entre indivíduos em diferentes etapas da vida [1].

Nas unhas as infecções de origem fúngicas são chamadas de micose, podendo aparecer de forma superficial, cutânea, subcutânea e profunda na pele do indivíduo. Os fungos que ocupam as unhas são nomeados dermatófitos, eles desenvolvem na queratina que apresenta nas lâminas ungueal [11].

As unhas dos pés são as mais afetadas por infecções fúngicas. Esta maior prevalência de infecções em unhas dos pés pode estar associada ao ambiente úmido, escuro e aquecido, proporcionado pelo uso de calçados, o que favorece o crescimento destes microorganismos, que utilizam como principal fonte de nutrientes a queratina [7].

Quando as unhas são infectadas, chama-se unha ungueal ou onicomicose. A transmissão dessas infecções ocorrem por contato direto ou indireto com os fungos, após traumas ou ferimentos, por inalação dos fungos provenientes do meio ambiente e, além disso, podem ser decorrentes de alterações no sistema imunológica, neste caso são chamadas de micoses oportunistas [9].

O tratamento das onicomicoses são difíceis devido à espessura da queratina das unhas e menor vascularização, o que dificulta a penetração de medicamentos por via sistêmica. O tratamento estabelecido das onicomicoses é feito com a combinação de medicamentos tópicos e sistêmicos, sendo os medicamentos de uso tópico, embora menos efetivo, é o mais aceito pelos pacientes. Para facilitar uma melhor distribuição do fármaco pela unha e com menos efeitos colaterais, podem ser utilizado esmaltes antifúngicos de aplicação local [10].

Outra opção viável para o tratamento da onicomicoses é a utilização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. A melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) é uma pequena árvore, suas folhas são parecidas com agulhas e as flores são amarelas ou arroxeadas [11].

Uma das espécies da *Melaleuca* já muito conhecida em variadas regiões é a *Melaleuca alternifolia*, a qual é utilizada decorrente aos diversos estudos realizados comprovando suas bioatividades benéficas como, repelente, inseticida, larvicida antimicrobiana, biocida e antifúngica e também como aromatizante, importante áreas que vem crescendo para terapias. Entre a grande maioria dos estudos a *Melaleuca alternifolia* vem sendo utilizada na forma de óleo essencial, uma forma legítima na medicina em suas eficácias [8] e reconhecida pelo padrão internacional (ISO 4730:2004) o qual o terpinen-4-ol é identificado como o principal ativo responsável pela ação terapêutica do óleo essencial do *Melaleuca* [2].

Este óleo essencial (OE) é extraído das folhas e ramos, e apresenta como principais constituintes químicos terpenos, cineol, pineno, terpinenos, cimeno, sesquiterpenos e álcoois. Dentre as propriedades biológicas possui ação antisséptica, antimicótica, bactericida, fungicida, germicida, cicatrizante [5]. Devido estudos promovidos na composição do óleo essencial de *Melaleuca*, sugere a sua ação antifúngica decorrente ao comprometimento das funções e alteração das propriedades da membrana [12].

O tratamento de onicomicoses nem sempre é efetivo, sendo de suma importância manter os devidos cuidados durante um longo tempo. A persistência do paciente e cuidados de higiene são

essenciais para o sucesso e cura da micose [15].

Além de produtos para utilização tópica como o óleo de melaleuca, também pode-se associar procedimentos estéticos, como a alta frequência. Ondas de alta frequência são utilizadas na podologia e ajudam no tratamento de onicomicoses, uma vez que o ozônio gerado apresenta efeito fungicida e bactericida. Também estimula a circulação do local, além de ter função vasodilatadora e hiperemiante, o que facilita a penetração de medicamentos. Apresenta efeito térmico, cicatrizante, térmico, analgésico e anti-inflamatório, os quais são importantes para o tratamento de lesões da pele. Devido à ação bactericida e antisséptica, vem sendo utilizada em lesões dermatológicas infectadas por bactérias e fungos. Portanto, existem várias indicações quanto ao uso da corrente de alta-frequência, como, acnes, desinfecção de lesões podais, feridas e peles inflamadas, cauterização da pele pós-extração, permeação de princípios ativos e revitalização da pele [6].

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. Metodologia

Trata-se de um estudo clínico onde foram recrutadas 8 pessoas, do gênero feminino, apresentando onicomicose nas unhas, idade superior a 20 anos, que não estivesse fazendo uso de algum medicamento oral ou tópico com finalidade antifúngica.

Como toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve riscos e benefícios, as mulheres que integraram o grupo analisado foram informadas de como seria o processo do tratamento, considerando os cuidados que deveriam ser tomados durante o tratamento para progresso do estudo.

Somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) que o participante foi incluído no estudo. Esta pesquisa quanto a riscos se caracteriza como baixa, mediante sua pequena possibilidade de danos. O tratamento foi realizado na residência da profissional na cidade de Santa Fé de Goiás-GO. Sendo assim, os participantes são livres para recusar participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa.

O estudo teve durabilidade de 4 meses e deu início com uma limpeza nas unhas sendo realizado a cutilagem de todos os dedos e desbastamento das partes comprometidas das unhas. Em casa o tratamento teve continuidade como *home care* todos os dias pelas pacientes aplicando o óleo nas unhas que apresenta a patologia duas vezes ao dia, sendo uma vez de manhã e outra à noite antes de dormir.

Uma vez na semana foi removida a cutilagem da paciente aplicando o óleo e em seguida a alta frequência afim de potencializar os resultados. Na semana seguinte a paciente retornou ao espaço para realizar apenas a aplicação da alta frequência juntamente com o óleo essencial de melaleuca alternifolia LeafOil, da marca RHR 100% puro, fabricado em São Paulo/SP- indústria brasileira. O óleo foi aplicado pura sobre a unha com a patologia. E assim sucessivamente, até o crescimento completo das unhas.

A análise dos resultados foi realizada através de fotos tiradas no final de cada sessão, padronizadas com antes e depois.

### 2.2. Resultados e Discussão

A escolha de tratamento tópico muitas vezes é a forma mais segura para o tratamento de manifestação fúngicas presente na unha, pois desta forma a uma maior segurança em evitar efeitos adversos que ocorre em relação ao tratamento oral. Entretanto o ativo a ser usado topicamente deve apresentar penetração efetiva e altas concentrações na lâmina ungueal. Com este intuito o OE de Melaleuca foi escolhida para o estudo em questão. Das 8 pacientes testadas algumas tiveram resultados

significativos quanto ao controle e cura do fungo onicomicótico presente nas unhas do dedão do pé. Geralmente a manifestação fúngica nesta região é de difícil tratamento, pois o uso de sapato fechado dificulta o tratamento se não tiver uma desinfecção do calçado e além de ser uma local de alta umidade pelo suor dos pés, tornando-se um habitat favorável para o fungo e quando se faz uso de calçados abertos torna-se também desfavorável ao tratamento por estar próximo do solo, local de muita poluição e contaminantes.

Segundo os estudos e ensaios realizados, a paciente 1 (figura 1) apresentava onicomicose há 5 meses e não possuía histórico de nenhum tratamento anterior. A paciente apresentava fungo nas duas unhas maiores dos pés, mas apenas uma foi totalmente comprometida. Foi realizada a remoção de toda unha, pois o fungo já tinha tomado conta da matriz. Cumpriu as orientações de aplicar todos os dias o OE de Melaleuca e realizou a limpeza com a aplicação proposta no tratamento. Sendo este o caso mais crítico e que apresentou melhora de 100%.



**Figura 1** - paciente 1: aspecto das unhas no primeiro dia de tratamento e após 2 meses;



**Figura 2** - paciente 1 após 4 meses de tratamento.

Paciente 2 (figura 3) de 32 anos: apresentava onicomicose na lateral da unha por 3 anos, tentou tratamento com alguns ativos farmacêuticos, mas não obteve resultado. Com o tratamento proposto apresentou melhora com apenas quatro meses de tratamento, confirmada por apresentar a unha colada e com rápido crescimento.



**Figura 3** - Paciente2: antes e depois do tratamento (4 meses) com melaleuca e alta frequência.

Paciente 3 (figura 4) de 40 anos: apresentava onicomicose na lateral da unha por 10 anos, tentou vários tratamentos com ativos adquiridos por conta própria em farmácias, porém durante este período não obteve nenhum resultado. Com o tratamento proposto pode-se observar uma melhora significativa com apenas quatro meses.



**Figura 4**- Paciente 3: aparência da unha no início do tratamento e após 4 meses.

Paciente 4 (figura 5) de 22 anos: adquiriu fungo no trabalho há 6 meses, seguindo normas da empresa a utilização de botas, devido a área ser quente abriu porta para o fungo se alojar. Após 4 meses de tratamento obtemos resultados positivos.



**Figura 5**- Paciente 4: antes do tratamento; após 3 meses de tratamento e após 4 meses.

Paciente 5 (figura6) de 44 anos: relatou diferente aspecto na unha devido ambiente de trabalho úmido, onde adquiriu onicomicose. Com segurança e comprometimento foi possível obter resultados positivos.



**Figura 6** - Paciente 5: aspecto da unha antes e depois do tratamento

Paciente 6 (figura 7) de 47 anos: queixa que adquiriu o fungo há 6 meses através da utilização de materiais não esterilizados, não possui histórico de nenhum tratamento ou medicamento utilizado anteriormente. Pode-se perceber uma melhora significativa através do tratamento proposto.



**Figura 7** - Paciente 6: antes e depois das unhas, após 4 meses de tratamento diários e semanais.



**Figura 8** - resultados inconclusivos do tratamento.

Paciente 7 de 65 anos: os resultados obtidos nesta paciente foram muito pouco satisfatórios devido poucas aplicações, por não comparecer no local. Na imagem podem perceber que não apresenta muita diferença.



**Figura 9-10** - Antes de depois de 4 meses de tratamento.

Paciente 8 de 37 anos: não apresentou melhora no aspecto das unhas nesses 4 meses de tratamento devido a uma alergia que adquiriu em uma de suas viagens afetando os pés, apresentando então resultados inconclusivos.



**Figura 11-** Aplicação da alta frequência, juntamente com OE de melaleuca.

Após análise das pacientes testadas, foi observado que seis delas obtiveram resultados positivos para a evolução da cura e apenas duas pacientes não obtiveram resultados desejado pelo fato de ter ocorrido interferências e as unhas não terem crescido o suficiente para identificar então o resultado.

Estudos tem sugerido que a utilização apenas da alta frequência em pacientes portadores da onicomicose resultam em bons resultados, porém demora muito tempo para se observar a melhora clínica das unhas [10].

---

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao ambiente úmido, escuro e aquecido, encontrado dentro dos calçados, a unha dos pés são as que mais apresentam onicomicose, uma vez que este ambiente favorece o crescimento de fungos, que utilizam a queratina como principal fonte de nutrientes [7]. Este estudo teve importância significativa atuando na saúde das unhas e no autoestima das pacientes recrutadas. Foi observado melhora significativa em seis pacientes, e em duas pacientes os resultados foram inconclusivos devido interferências por parte das pacientes. A eficácia do OE de melaleuca devido sua ação antimicrobiana contra bactérias, fungos e alguns vírus, juntamente com a alta frequência, onde o ozônio gerado

também apresenta efeito fungicida e bactericida, e estimula a circulação local, facilitando a penetração do óleo, parece ser um tratamento alternativo eficaz para a onicomicose .

---

#### 4. REFERÊNCIAS

- [1] Addor FAS. Efeito de suplementação nutricional no fortalecimento e crescimento das lâminas ungueais. *Surg Cosmet Dermatol*. 2016; 8:311-315.
- [2] Baccoli BC, Reis, DA, Sciani MD, Carvalho AA. Os benefícios do óleo de melaleuca na acne grau II E III: uma revisão de literatura. *Rev Univer Vale do Rio Verde*. 2015; 13:536-547.
- [3] Gomes S, Lencastre A, Paiva, MJL. Alterações ungueais em pediatria. *Rev Nascer e Crescer*. 2012; 21:19-24.
- [4] Araujo LA, Campos, PMBGM. Fisiologia e Importância das Unhas (Série Fundamentos da Cosmetologia). *Rev Cosmetics & Toiletries Brasil*. 2013; 25:34-36.
- [5] Maluf S. Principais óleos essenciais. *Aromoterapia*. São Paulo: Editora do Autor. 2008. 78p.
- [6] Martins A, Silva JT, Graciola L, et al. Efeito bactericida do gerador de alta frequência na cultura de *Staphylococcus aureus*. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2012; 19:153-157.
- [7] Silva JLM, Doimo G, Faria DP. Uso de ondas de alta frequência no tratamento de onicomicose-comunicação preliminar de três casos. *An bras dermatol*, 2011; 86:598-600.
- [8] Nepomoceno TAR, Pietrobon AJ. Melaleuca alternifolia: Uma revisão sistemática da literatura brasileira. *Revista UNINGÁ Review*. 2020; 35:eRUR3409.
- [9] Hoy NY, Leung AK, Metelitsa AI, Adams S. New concepts in median nail dystrophy, onychomycosis, and hand, foot, and mouth disease nail pathology. *ISRN Dermatol*. 2012; 2012:680163.
- [10] Paula L, Silva JLM, Faria DP. Tratamentos Alternativos para Onicomicose: Ondas de Alta Frequência e Laser. *RBM*. 2012; 15:68-80.
- [11] Sampaio LTR, Oliveira HMBF, Oliveira-Filho AA. Atividade antimicrobiana da Melaleuca alternifolia e sua aplicação na Odontologia. *Arch Health Invest*, 2020; 10:318-322.
- [12] Siani AC, Sampaio ALF, Souza MC, Henriques MGMO, Ramos MFS. Óleos Essenciais: Potencial antiinflamatório. *Biotecnologia cienc desenvolv*. 2000; 16:38-43.
- [13] Tortora GR. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- [14] Tedesco L, Bufalo AC, Wietzikoski EC, Velasquez PAG, Ciesca GM. Avaliação antibacteriana do extrato de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) frente à cepa de *Staphylococcus aureus*. *Arq Cienc Saúde UNIPAR*. 2014; 18:89-94.
- [15] Nascimento GPV, Oliveira JV. Ação da atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais de *Copaifera officinalis*, *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* e *Thymus vulgaris* ante os agentes causais de onicomicose. *Rev Iberoam Pod*. 2019; 1:56-64.

# **CAPÍTULO 6**

## **A IMPORTÂNCIA DA INCLUSÃO DE POLÍTICAS PÚBLICAS EM SAÚDE DESTINADAS À POPULAÇÃO LGBT**

**AUTORES:**

**Renata Renó Martins**

**Renan Renó Martins**

**Maria Teresa Renó Gonçalves**



# A Importância da Inclusão de Políticas Públicas em Saúde Destinadas à População LGBT

**Autores:** Renata Renó Martins, Renan Renó Martins, Maria Teresa Renó Gonçalves.

*Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil.*

*Faculdade da Amazônia (FAMAZ), Belém, PA, Brasil.*

*Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brasil.*

---

## Resumo

A sigla LGBT representa Lésbicas, Gays, Bissexuais, Travestis, Transexuais e Transgêneros. A falta de assistência à saúde dessas pessoas acontece principalmente pela discriminação e o preconceito da comunidade médica. O trabalho tem como objetivo realizar uma revisão sistemática de literatura para evidenciar a importância da inclusão de políticas públicas em saúde destinadas à população LGBT. Foi utilizado o banco de dados online da Medical Publications (PubMed). De acordo com os critérios definidos, foram selecionados 5 ensaios clínicos, com um total de 1.412 pessoas avaliadas. Apesar do aumento da aceitação e reconhecimento de pessoas LGBT nos últimos anos, a educação sobre as necessidades em saúde dessa população, por parte dos profissionais, ainda é muito atrasada e deficiente. Com isso, gera-se um acesso restrito desses pacientes, devido a precariedade de profissionais da área com competência cultural e clínica para atendê-los. O presente estudo mostrou que as minorias sexuais possuem uma elevada amplitude, complexidade e importância, das quais precisam ser devidamente pesquisadas, ensinadas e disseminadas por meio de políticas públicas em saúde específicas, para então fazer a inclusão dessas pessoas da maneira eficaz e profissional.

**Palavras-chave:** Assistência a saúde, Discriminação, Preconceito, Minorias sexuais

## The Importance of Inclusion of Public Health Policies Aimed at the LGBT Population

---

### ABSTRACT

The acronym LGBT stands for Lesbians, Gays, Bisexuals, Transvestites, Transsexuals and Transgender. The lack of health care for these people is mainly due to discrimination and prejudice from the medical community. The work aims to carry out a systematic literature review to highlight the importance of including public health policies aimed at the LGBT population. The online database of Medical Publications (PubMed) was used. According to the defined criteria, 5 clinical trials were selected, with 1,412 people evaluated. Despite the increased acceptance and recognition of LGBT people in recent years, professionals' education on the health needs of this population is still very backward and deficient. With this, restricted access of these patients is generated due to the precariousness of professionals in the area with cultural and clinical competence to assist them. The present study showed that sexual minorities have a high amplitude, complexity, and importance, which need to be properly researched, taught, and disseminated through specific public health policies so that these people can be effectively and professionally included.

**Keywords:** Health care, Discrimination, Prejudice, Sexual minorities

---

## 1. INTRODUÇÃO

A sigla LGBT representa Lésbicas, Gays, Bissexuais, Transexuais, Transgêneros e Travestis. A abordagem conhecida como LGBT atualmente nos anos 2000, no Brasil, iniciou-se com o movimento gay, sendo o primeiro deles chamado de grupo Somos em 1978 [1]. Foi articulado como uma maneira de resistência contra a ditadura militar, sendo por isso que a homossexualidade é reconhecida recentemente no país, pois antigamente estava associada à doença.

A literatura revela que existe um aumento significativo de problemas físicos e mentais na população LGBT quando comparada às pessoas heterossexuais [2]. Isso acontece porque esse grupo de pessoas tem mais estresses psicológicos, podendo acarretar em maiores taxas de depressão, distúrbio de imagem, transtornos de ansiedade, comportamentos sexuais de risco, ideias suicidas, entre outros. Alguns autores definem esse fato como estresse minoritário, no qual é sofrido de maneira excessiva por indivíduos de classes sociais estigmatizadas.

A falta de assistência à saúde dessas pessoas acontece principalmente pela discriminação e o preconceito da comunidade médica, sendo extremamente necessária a implementação de políticas públicas de saúde destinadas à esse público, para o preparo adequado dos profissionais sobre as reais necessidades e particularidades da saúde LGBT [3]. O Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Saúde Integral de LGBT em 2011, com o intuito de ampla conscientização e valorização de saúde, sobre o direito de todos os cidadãos de receber atendimento livre de discriminação, negação ou restrição em virtude da identidade de gênero ou orientação sexual.

Essa inclusão deve levar em conta aspectos sociais, econômicos, históricos, culturais, biológicos, psicológicos e ambientais. Apesar de ser fundamental o reconhecimento das individualidades da saúde dessa população em todas as áreas da medicina, essa qualificação deve ocorrer principalmente por médicos da família e comunidade, visto que atuam na Estratégia Saúde da Família (ESF), na qual é, na maioria das vezes, o primeiro contato com essas pessoas.

O trabalho tem como objetivo realizar uma revisão sistemática de literatura para evidenciar a importância da inclusão de políticas públicas em saúde destinadas à população LGBT. A partir da utilização de banco de dados online da Medical Publications (PubMed) realizou uma busca de artigos com os seguintes critérios de inclusão: artigos completos publicados nos últimos 5 anos (de 2015 a 2020), com texto completo livre e que tivessem um desenho de estudo epidemiológico (estudo clínico randomizado). Como critérios de exclusão foram incluídos: artigos com acesso restrito ao texto completo, as duplicidades e artigos com conteúdo não correspondente as regras estabelecidas.

De acordo com os critérios definidos, foram selecionados 5 ensaios clínicos, com um total de 1.412 pessoas avaliadas. Foi criado um quadro sinóptico especialmente construído para a avaliação, exemplificação e análise dos dados coletados, que contemplou as características consideradas mais pertinentes: nome dos autores e ano de publicação, amostragem, metodologia e conclusão.

Para o referencial teórico foi utilizado os bancos de dados PubMed e SciELO. Os critérios de inclusão foram artigos publicados nos últimos 5 anos e com texto completo com livre acesso. Não foram selecionados os artigos que não possuíssem o acesso completo disponível, assim como aqueles que não abordavam o assunto estabelecido.

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

Apesar do aumento da aceitação e reconhecimento de pessoas LGBT nos últimos anos, além de igualdade em algumas áreas, a educação sobre as necessidades em saúde dessa população, por parte dos profissionais, ainda é muito atrasada e deficiente. Com isso, gera-se um acesso restrito desses pacientes, devido a precariedade de profissionais da área com competência cultural e clínica para atendê-los, promovendo a disseminação de desigualdades na saúde.

As transformações e inclusões necessitam ser feitas nas grades curriculares dos estudantes da área, por meio do ensino de como abordar e cuidar das particularidades de minorias sociais, bem como nas políticas públicas em promoção de saúde, desde campanhas de vacinação à tratamentos

específicos e direcionados para esse público [4,5]. A tabela a seguir expõe e detalha os pontos pertinentes de cada artigo selecionado, sobre pesquisas envolvendo algumas políticas públicas em saúde direcionadas, bem como a repercussão entre o público alvo após serem estabelecidas. DE acordo com os critérios (inclusão e exclusão) estabelecidos foram incluídos 5 artigos (Tabela 1), totalizando 1.412 pessoas abrangidas na pesquisa.

Tabela 1. Dados dos artigos selecionados considerando autor, ano de publicação, amostragem, metodologia e conclusão.

<b>Autoria/Ano de publicação</b>	<b>Amostra</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Conclusão</b>
MATTHEWS, et al.[6]	345	Ensaio clínico randomizado	O artigo comparou um tratamento de cessação do tabagismo não direcionado em relação à um cognitivo-comportamental direcionado para fumantes LGBT. Os resultados mostraram que houve maiores benefícios do tratamento direcionado e associado à reposição de nicotina, quando comparado ao tratamento padrão. Além disso, houve mais aceitabilidade para iniciar a terapia de cessação do tabagismo nos pacientes que participaram do método direcionado.
BAUERMEISTER, José A et al. [7]	474	Ensaio clínico randomizado	O estudo com homens jovens e negros que fazem sexo com homens, que são a maioria dos novos infectados por HIV nos Estados Unidos, mostrou que as experiências de estigma externalizado e internalizado estão ligadas diretamente ao aumento dos sofrimentos psicológicos nessas pessoas.

MCCREE, Annie Let al. [8]	141	Ensaio clínico randomizado	Foi realizada uma intervenção de vacinação contra HPV na Web para jovens adultos gays e bissexuais, que revelou efeitos positivos na aceitabilidade, nas atitudes e crenças, fazendo com que essa população obtivesse melhorias das construções associadas à vacinação contra HPV. Além disso, o estudo sugere que há melhores resultados quando há uma intervenção com múltiplos componentes do que uma abordagem de visão única
YBARRA, Michele L et al. [9]	302	Ensaio clínico randomizado	Realizou-se uma intervenção por meio de mensagens de texto, desenvolvida para adolescentes bissexuais e gays com o intuito de melhorar suas informações à respeito do HIV. Houve um aumento particularmente maior de informações de prevenção nos jovens sem experiência sexual dentro do grupo de tratamento.
REITER, Paul L et al. [10]	150	Ensaio clínico randomizado	Desenvolveu-se uma intervenção para vacinação contra o HPV especificamente para jovens gays e bissexuais, na qual mostrou-se uma estratégia bastante promissora e eficaz.

Fonte: Próprio autor.

O estudo de MATTHEWS et al., [6] foi um dos primeiros a estudar os resultados de um ensaio clínico randomizado sobre a comparação de uma terapia de cessação do tabagismo cognitivo-comportamental direcionada, em relação à outra não direcionada para fumantes LGBT. O artigo aponta os benefícios alcançados no grupo de tratamento direcionado associado à terapia de reposição de nicotina, que foram maiores em relação ao não direcionado, sendo relevantes e importantes. Ademais, é ratificado também a elevação da aceitabilidade pelos pacientes, quando submetidos à um tratamento específico.

As taxas de finalização do tratamento foram aceitáveis no grupo com terapia cognitivo-comportamental direcionada, na qual estavam inclusas pessoas de níveis socioeconômicos mais baixos, minorias étnicas/raciais e aqueles com barreiras conhecidas à conclusão do tratamento. As duas intervenções apresentaram níveis de cessação do tabagismo semelhantes, porém houve uma preferência de escolha maior, por parte dos participantes, para o grupo com direcionamento do que o grupo com o estabelecido de forma padrão. Com isso, além dos benefícios aos fumantes, essa nova terapia foi altamente viável, eficaz e aceitável.

No trabalho de BAUERMEISTER et al. [7] foi abordado como o estigma diminui o efeito protetor do apoio social, sobre o sofrimento psicológico entre os jovens negros que fazem sexo com homens. Foi apontado que o estigma interseccional expõe essas pessoas a estressores diários, dos quais

aumentam a sua vulnerabilidade a eventos psicológicos e físicos de discriminação e ainda ressaltam a importância e necessidade de políticas contrárias ao ato de discriminar.

A relação entre apoio social e HIV foi diferente de acordo com o status da doença, sendo o menor apoio social associado a maior estigma internalizado e externalizado entre os participantes soronegativos e soropositivos. Os resultados mostraram que a oportunidade de usar o apoio social, em homens negros vivendo com HIV que praticam relação sexual com outros homens, para diminuir o impacto do estigma no transtorno psicológico, é benéfica.

Na pesquisa de MCREE et al. [8] foi analisada a aceitabilidade e efeitos a curto prazo de uma intervenção através da Web para vacinação contra o HPV para jovens adultos gays e bissexuais. O estudo sugere que as intervenções para a vacina contra o HPV são realmente benéficas quando vão além da educação básica, para o aumento do conhecimento, e quando inclui componentes adicionais.

Os autores ainda sugerem que essa inclusão pode ser feita através de múltiplos componentes ao invés de uma abordagem única, como estratégias de desenvolvimento de habilidades, recursos para vacinação, conteúdo personalizado e direcionado, entre outros.

No artigo de YBARRA et al. [9] foi realizado um estudo controlado randomizado, abordando o efeito de um programa de prevenção do HIV através de mensagens de texto em jovens de minorias sexuais. Uma experiência inovadora que incluiu melhora das informações, motivações e habilidade comportamentais em adolescentes gays e bissexuais para prevenção da doença.

O aumento foi mais significativo no quesito motivação e nos jovens que nunca haviam vivenciado relações sexuais, sendo sugerido que as intervenções deveriam ser iniciadas em adolescentes o quanto antes para alcançar um maior impacto.

Em REITER et al. [10] foi desenvolvida uma intervenção para vacinação contra o HPV especificamente para jovens gays e bissexuais, mostrando-se uma estratégia bastante eficaz e promissora. Foi revelado também que homens gays e bissexuais dependem muito da tecnologia para absorver orientações e informações sobre saúde, sendo os resultados positivos quando realizaram a intervenção por meio desse veículo.

---

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há cerca de uma década atrás, ainda não haviam informações e orientações que incluíam o atendimento de pessoas LGBT nos textos padrões disseminados. Atualmente, ainda revela-se a necessidade de desenvolver competências essenciais através de um treinamento em saúde sobre as particularidades de lésbicas, gays, bissexuais e transgêneros, de maneira que os alunos treinados possam utilizar esse aprendizado independente da sua especialidade ou área de atuação. Além disso, com esse ensino é possível criar um ambiente acolhedor e afirmativo para esses pacientes, para a equipe e estudantes.

O presente estudo mostrou que as minorias sexuais possuem uma elevada amplitude, complexidade e importância, das quais precisam ser devidamente pesquisadas, ensinadas e disseminadas por meio de políticas públicas em saúde específicas, para então fazer a inclusão dessas pessoas da maneira eficaz e profissional, para obtenção de maiores benefícios à essa população.

---

### 4. REFERÊNCIAS

- [1] Paniza MDR. Entre a emergência, a submersão e o silêncio: LGBT como categoria de pesquisa em Administração. Cad. EBAPE.BR (Rio de Janeiro). 2020; 18.
- [2] Gomes G, Costa PA, Leal I. Impacto do estigma sexual e coming out na saúde de minorias sexuais. Psic., Saúde & Doenças (Lisboa). 2020; 21.

- [3] Moretti-Pires RO, Guadagnin LI, Tesser-Júnior ZC. Preconceito contra Diversidade Sexual e de Gênero entre Estudantes de Medicina de 1º ao 8º Semestre de um Curso da Região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Educação Médica*. 2019; 43: 557-567.
- [4] Borges PD, Rasera EF, Teixeira FB. Discursos sobre o cuidado em saúde de Lésbicas, Gays, Bissexuais, Travestis, Transexuais (LGBT) entre médicas (os) da Estratégia Saúde da Família. *Interface (Botucatu)*. 2019; 23: e180279.
- [5] Sekoni AO, Gale NK, Manga-Atangana B, Bhadhuri A. Os efeitos dos currículos educacionais e do treinamento em questões de saúde específicas para LGBT para estudantes e profissionais de saúde: uma revisão sistemática de método misto. *J Int AIDS Soc*. 2017; 20 (1): 21624.
- [6] Matthews AK, Steffen AD, Kuhns LM, Ruiz RA. Avaliação de um ensaio clínico randomizado comparando a eficácia de uma intervenção de cessação do tabagismo culturalmente direcionada e não direcionada para fumantes lésbicas, gays, bissexuais e transgêneros. *Nicotina Tob Res*. 2019; 21 (11): 1506-1516.
- [7] Bauermeister JA, Muessig KE, Flores DD. O estigma diminui o efeito protetor do apoio social sobre o sofrimento psicológico entre jovens negros que fazem sexo com homens. *Educ. SIDA Prev*. 2018; 30: 406-418.
- [8] McRee AL, Shoben A, Bauermeister JA. Supere o HPV: aceitabilidade e efeitos a curto prazo de uma intervenção de vacinação contra o HPV baseada na Web para jovens adultos gays e bissexuais. *Vacina*. 2018; 36 (52): 8158-8164.
- [9] Ybarra ML, Liu W, Prescott TL. O efeito de um programa de prevenção de HIV baseado em mensagens de texto em jovens de minorias sexuais: uma avaliação nacional de informações, motivação e habilidades comportamentais em um estudo controlado randomizado de Guy2Guy. *AIDS Behav*. 2018; 22 (10): 3335-3344.
- [10] Reiter PL, Katz MG, Bauermeister JA. Aumento da vacinação contra o papilomavírus humano entre jovens gays e bissexuais: um estudo piloto randomizado da intervenção Outsmart HPV. *Saúde LGBT*. 2018; 5 (5): 325-329.
- [11] Pinto IV, Andrade SSA, Rodrigues LL. Perfil das notificações de violências em lésbicas, gays, bissexuais, travestis e transexuais registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Brasil, 2015 a 2017. *Rev. bras. Epidemiol*. 2020; 23: e200006.
- [12] Silva ACA, Alcântara AM, Oliveira DC et al. Implementação da Política Nacional de Saúde Integral de Lésbicas, Gays, Bissexuais, Travestis e Transexuais (PNSI LGBT) no Paraná, Brasil. *Interface*. 2020; 24: e190568.
- [13] Batista R L, Verduguez ER, Inácio M, et al. Impacto da escolaridade na prevalência de HIV / Aids entre mulheres brasileiras transgêneros. *Arco. Endocrinol. Metab*. 2020.
- [14] Lima FLCF, Barros AC, Pacheco MS, et al. Ansiedade em minorias sexuais e de gênero: uma revisão integrativa. *J. bras. psiquiatr*. 2020; 69( 1 ): 48-56.
- [15] Valenzuela AV, Cartes-Velásquez R. Ausencia de perspectiva de género en la educación médica. Implicaciones en pacientes mujeres y LGBT+, estudiantes y profesores. *Iatreia*. 2020; 33(1): 59-67.

- [16] Santos JS, Silva RN, Ferreira MA. Saúde da População LGBTI + na Atenção Primária à Saúde e Inserção de Enfermagem. Esc. Anna Nery. 2019; 23 (4): e20190162.
- [17] Luvuno ZP, Mchunu G, Ncama B, et al. Evidências de intervenções para melhorar o acesso à saúde de lésbicas, gays, bissexuais e transgêneros na África do Sul: Uma revisão do escopo. Afr. j. prim. cuidados de saúde fam. med. 2019; 11 (1): 1-10.
- [18] Popadiuk GS, Oliveira DC, Signorelli MC. A Política Nacional de Saúde Integral de Lésbicas, Gays, Bissexuais e Transgêneros (LGBT) e o acesso ao Processo Transexualizador no Sistema Único de Saúde (SUS): avanços e desafios. Ciênc. saúde colet. 2017; 22.
- [19] Negreiros FRN, Ferreira BO, Freitas DN, et al. Saúde de Lésbicas, Gays, Bissexuais, Travestis e Transexuais: da Formação Médica à Atuação Profissional. Rev. bras. educ. med. 2019; 43.
- [20] Dullius WR, Martins LB, Cesnik VM. Revisão sistemática das competências dos profissionais de saúde no atendimento a indivíduos LGBT +. Estud. psicol. (Campinas). 2019; 36.

# **CAPÍTULO 7**

## **APLICAÇÃO DO TESTE EAT-26 PARA TRIAGEM DE DISTÚRBIOS ALIMENTARES**

**AUTORES:**

**Hélida Caroline Silva Gomes  
Aline do Carmo França Botelho**



# Aplicação do teste EAT-26 para triagem de distúrbios alimentares

Hélida Caroline Silva Gomes<sup>1</sup>, Aline do Carmo França Botelho<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Educadora Física egressa do Centro Universitário do Planalto de Araxá - UNIARAXÁ.

<sup>2</sup>Professora orientadora. Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais.

---

## Resumo

Distúrbios alimentares são distúrbios psiquiátricos caracterizados por alterações nos comportamentos alimentares, que levam a uma alta taxa de morbidade e mortalidade. Considerando que a detecção precoce de predisposição a transtornos alimentares é muito importante, o presente estudo teve como objetivo detectar o risco entre acadêmicos ingressantes e concluintes de um curso de Educação Física. A pesquisa foi realizada em 2019 em uma instituição de ensino superior privada do interior de Minas Gerais - Brasil. A amostra foi de 28 acadêmicos sendo 10 ingressantes e 18 concluintes. O risco de distúrbios alimentares foi avaliado, nesse estudo, utilizando o Teste de Atitudes Alimentares (EAT-26). De acordo com os resultados a prevalência de alto risco para transtornos alimentares foi de 46%, um resultado muito alarmante por estar significativamente acima da média mundial. Através da detecção de populações de risco é possível realizar ações preventivas para reduzir o risco de transtornos alimentares e seus agravos.

**Palavras-chave:** Distúrbios alimentares. Educação nutricional. Anorexia. Bulimia.

---

## Application of the EAT-26 test to screen for eating disorders

### ABSTRACT

Eating disorders are psychiatric disorders characterized by changes in eating behaviors, leading to a high morbidity and mortality rate. Considering that the early detection of predisposition to eating disorders is very important, the present study aimed to detect the risk among undergraduate and graduate students of a Physical Education course. The research was conducted in 2019 in a private higher education institution in the interior of Minas Gerais - Brazil. The sample consisted of 28 students, 10 incomings, and 18 graduates. The risk of eating disorders was evaluated in this study using the Eating Attitudes Test (EAT-26). According to the results, the prevalence of high risk for eating disorders was 46%, a very alarming result because it was significantly above the world average. By detecting at-risk populations, it is possible to carry out preventive actions to reduce the risk of eating disorders and their injuries.

**Keywords:** Eating disorders. Nutritional education. Anorexia. Bulimia.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A imagem corporal e sua percepção é descrita como a imagem que um indivíduo tem sobre o seu tamanho e sua forma corpórea, estando ligada a diversos fatores biopsicossociais [1].

Uma insatisfação com a imagem pessoal, principalmente relacionada ao ganho excessivo de peso, é relatada como uma das mais importantes variáveis ligadas ao risco de desenvolvimento de

transtornos alimentares [2]. As características pessoais, como a autoestima e o humor, além de presença de sintomas depressivos ou relacionados ao perfeccionismo, e também a própria morfologia corporal são relatados como fatores relacionados aos comportamentos presentes em transtornos alimentares [3].

Vômitos autoprovocados, restrições alimentares e dietas restritivas criadas pelos próprios pacientes, o uso excessivo de laxantes e diuréticos são alguns exemplos de comportamentos de risco para transtornos alimentares. Estes são prejudiciais à saúde e evidências indicam prevalência desses comportamentos para transtornos alimentares de até 25% em toda população mundial [4].

A anorexia é caracterizada pela recusa alimentar e a tentativa do paciente em manter em uma faixa mínima o peso corporal, o que nas mulheres pode levar a problemas como queda de cabelo, amenorréia, unhas fracas, entre outros. A bulimia, por sua vez, está presente nos casos repetidos de compulsões alimentares, seguidos por tentativa de comportamentos compensatórios inadequados, como vômitos auto-provocados, bem como o uso de laxantes e diuréticos, promoção de jejuns intermitentes ou um excesso de exercícios físicos tendendo à exaustão. A perda de peso é mais evidenciada nos casos de anorexia em comparação com os casos de bulimia. Além disso, é comum em ambos distúrbios psicológicos o um temor ao ganhar peso, assim como alterações na percepção da forma e do próprio peso corporal [5].

A ausência de ovulação é um problema frequentemente presente nesses distúrbios alimentares, constituindo-se de uma reação adaptativa do organismo à condição extrema de inanição e resultando em alterações hormonais no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal feminino. Semelhantemente, em homens, ocorre uma redução de testosterona, gerando um quadro de hipogonadismo levando à perda de libido e à disfunções sexuais. O aumento da secreção de cortisol e a diminuição da função tireoidiana também estarão presentes nos quadros de distúrbios alimentares, sendo essa última ativada pelo próprio organismo em uma tentativa de redução de gasto energético e tentativa compensatória aos poucos recursos nutricionais disponíveis [6, 7].

Um quadro de má nutrição, somado ao elevado cortisol e a deficiência de esteróides sexuais promovem uma maior queda dos níveis de cálcio, fósforo e magnésio presentes no sangue, o que pode levar a outras consequências, como a perda de massa óssea, a diminuição do crescimento ósseo e, por fim, quadros clínicos de osteoporose [8].

Em geral, o graduando de Educação Física preocupa-se muito com sua imagem corporal, exercícios físicos e alimentação, o que, na maioria das vezes é algo positivo. Entretanto, quando isso se torna uma preocupação excessiva pode levar a transtornos psicológicos e alimentares. Neste contexto, o presente estudo torna-se relevante, pois ao identificar possíveis riscos de transtornos alimentares entre os graduandos de Educação Física, medidas educativas e preventivas podem ser desenvolvidas, contribuindo para a saúde e bem estar desses alunos. O presente estudo buscou avaliar as atitudes alimentares de alunos do curso de Educação Física de uma instituição de ensino do interior de Minas Gerais pelo EAT-26.

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. Materiais e Métodos

A pesquisa foi quantitativa, exploratória e transversal. A amostra foi composta pelos alunos ingressantes e concluintes do curso de Educação Física, no ano de 2019, em instituição de ensino superior de um município do interior de Minas Gerais, Brasil. Para divulgação da pesquisa foram realizados contatos pessoalmente nos horários de intervalos de aula e por e-mail com os estudantes informando os objetivos da pesquisa e o link de acesso online ao formulário. Foram incluídos todos os graduandos que concordaram em participar da pesquisa, mas foram excluídos os que não estavam presentes nas ocasiões de divulgação e tentativa de coleta de dados.

Utilizou-se do Teste Atitudes Alimentares (EAT-26) online aplicado na amostra durante os meses de setembro e outubro de 2019, após a aprovação ética do projeto pelo Centro Universitário do

Planalto de Araxá (Protocolo 002563/62). O teste foi desenvolvido por Garner e Garfinkel (1979) [9] para fins de diagnosticar, inicialmente, quadros clínicos de anorexia nervosa. Entretanto, tornou-se o teste mais aplicado à todas disfunções alimentares. Os resultados obtidos mostraram não ser possível fazer o diagnóstico de distúrbios alimentares, mas foi verificado que com o teste é possível a detecção de casos clínicos em populações de alto risco e identificação de indivíduos com preocupações excessivas sobre alimentação e peso corpóreo, ou seja, indivíduos em situação de risco e maior predisposição aos distúrbios alimentares. A escala adaptada (EAT-26) possui apenas 26 dos 40 originais parâmetros avaliados, sendo importante destacar que 14 desses parâmetros foram excluídos por fins de redundância, logo formando uma escala mais simples e rápida no quesito de aplicação, embora haja muita correlação com a escala original de 40 parâmetros.

A versão em português [10] está validada e amplamente referenciada. Segue a pontuação:

- Sempre = 3;
- Muitas vezes = 2;
- Às vezes = 1;
- Poucas vezes, quase nunca e nunca = 0.

A questão 25 possui uma pontuação dita invertida, pois as alternativas “sempre”, “muitas vezes” e “às vezes” são apresentadas com o peso 0, a resposta “poucas vezes” apresenta peso 1, além de “quase nunca” apresentar peso 2 e “nunca” apresentar o valor 3. A partir da soma das respostas é possível o cálculo do escore. Resultados de risco para transtorno alimentar: Escore 20 ou mais: risco alto; Escore de 10 a 19: baixo risco; Escore de 0 a 9: fora de risco [10].

A opção foi por uma coleta de dados online (Google Docs Forms). A busca por métodos e instrumentos práticos e confiáveis para coletar informações, é constante na área da epidemiologia. O avanço das tecnologias e meios de comunicação tem sido uma importante contribuição, a internet nos últimos tempos tornou-se também uma ferramenta de levantamento de dados [11].

A tabulação inicial dos dados se deu automaticamente pelo Google Docs Form, em seguida foi realizada estatística descritiva, com números e percentuais para cada parâmetro avaliado.

## 2.2. Resultados e Discussão

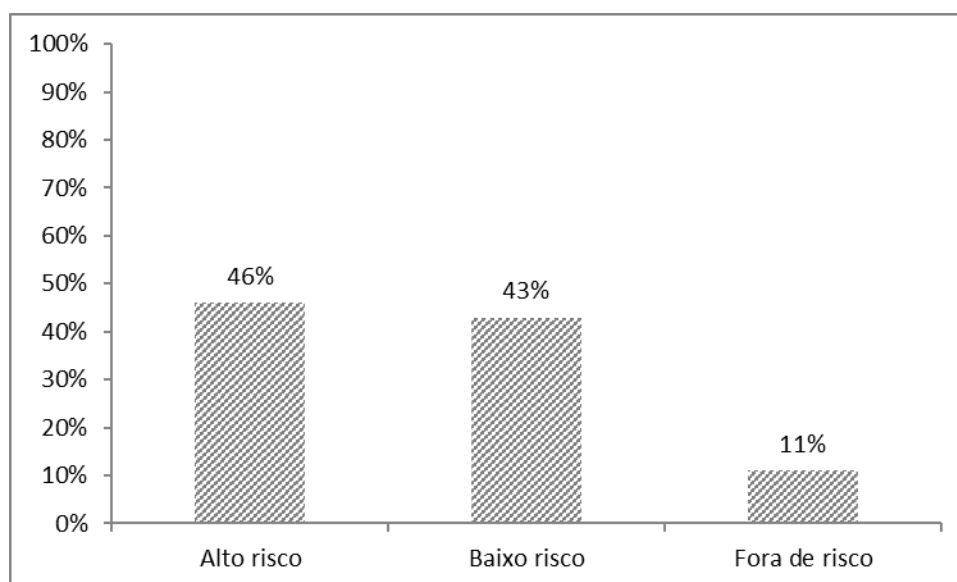
Os transtornos alimentares apresentam severidade significativa em vários aspectos, podendo ser destacados: risco considerável de comprometimento emocional, psicossocial e sexual. Acrescenta-se ainda o alto risco de morbidade e mesmo mortalidade [12].

O presente estudo buscou conhecer o risco de transtornos alimentares entre alunos ingressantes e concluintes de um curso de Educação Física, cujos profissionais, em geral, intrinsecamente, apresentam significativa preocupação com a imagem corporal.

De acordo com a figura 1 quase metade da amostra (46%) tem alto risco, 43% tem baixo risco e apenas 11% está livre de risco. Esses dados corroboram com outro estudo brasileiro recente que também encontrou alto risco em 49,9% da amostra [13].

Estudos de Fiattes e Salles (2001) [14] mostraram que 25,4% dos estudantes do curso de nutrição apresentavam risco. Além disso, um outro estudo [15] identificou que 26,1% dos universitários da área da saúde no Brasil correm o risco de desenvolver transtornos alimentares em algum momento da vida, principalmente por causa de preocupações anormais sobre dieta e peso corpóreo.

Esses resultados encontrados são alarmantes, considerando que a prevalência de EAT-26 de alto risco foi bem acima da média mundial. Sendo em geral até 8% considerados baixos e acima de 20% requerem atenção [16].



**Figura 1.** Distribuição da amostra quanto ao risco de desordens alimentares segundo o EAT-26.

Quando os dados são analisados separadamente para ingressantes e concluintes (Tabela 1), nota-se que houve similaridades, indicando que o nível acadêmico não proporcionou interferências relevantes, reforçando que, entre os acadêmicos, o risco para transtornos alimentares foi alto para toda a amostra.

**Tabela 1.** Distribuição dos acadêmicos ingressantes e concluintes quanto ao risco de desordens alimentares.

	Ingressantes		Concluintes	
	N	%	N	%
<b>Alto risco</b>	4	40	9	50
<b>Baixo risco</b>	4	40	8	44
<b>Fora de risco</b>	2	20	1	6
	10	100	18	100

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da detecção de populações de risco é possível programar e intensificar ações educativas voltadas para a nutrição, bem-estar e qualidade de vida das pessoas, reduzindo os riscos para os transtornos alimentares.

Diante dos resultados é possível concluir que a amostra tem risco para desordens alimentares e seus impactos. É necessário adotar estratégias efetivas para a modificação de comportamentos restritivos da dieta e a insatisfação corporal, especialmente entre jovens, e, mais ainda, entre acadêmicos e profissionais da Educação Física.

---

#### 4. REFERÊNCIAS

- [1] Leal GVS. Fatores associados ao comportamento de risco para transtornos alimentares em adolescentes na cidade de São Paulo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6138/tde-08042013-094507/pt-br.php>>.
- [2] Fortes LS, Filgueiras JF, Oliveira FC, Almeida SS, Ferreira MEC. Etiological model of disordered eating behaviors in Brazilian adolescent girls. *Cad Saúde Pública*. 2016; 32:e000024015.
- [3] Rodgers R, Chabrol H, Paxton SJ. An exploration of the tripartite influence model of body dissatisfaction and disordered eating among Australian and French college women. *Body Image*. 2011; 8:208-215.
- [4] Fortes LS, Filgueiras JF, Ferreira MEC. Comportamentos de risco para transtornos alimentares e sintomas depressivos: um estudo com jovens do sexo feminino de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2014; 30:2443-2450.
- [5] Fernandes MH. *Transtornos Alimentares*. São Paulo, Casa do Psicólogo, 2006. 303p.
- [6] Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
- [7] Westmoreland P, Krantz MJ, Mehler PS. Medical Complications of Anorexia Nervosa and Bulimia. *Am J Med*. 2016; 129:30-37.
- [8] Jagielska GW, Przedlacki J, Bartoszewicz Z, Racicka E. Bone mineralization disorders as a complication of anorexia nervosa - etiology, prevalence, course and treatment. *Psychiatr Pol*. 2016; 50:509-520.
- [9] Garner DM, Garfinkel PE. The Eating Attitudes Test: an index of the symptoms of anorexia nervosa. *Psychol Med*. 1979; 9:273-279.
- [10] Nunes MA, Bagatini L, Abuchaim AL. Considerações sobre o Teste de Atitudes Alimentares (EAT-26). *Rev ABP-APAL*. 1994; 16:7-10.
- [11] Dillman DA, Smyth JD. Design effects in the transition to web-based surveys. *Am J Prev Med*. 2007; 32:S90-96.
- [12] Carmo CC, Pereira PML, Cândido APC. Transtornos alimentares: uma revisão etiológica e das principais complicações clínicas. *Hu Revista*. 2014; 40:173-181.
- [13] França-Botelho AC, Silva ADS, Mesquita JLF. High risk of eating disorders in adults shows the need for more nutritional education actions. *IJIER [Internet]*. 2018; 6:103-108.
- [14] Fiattes GMR, Salles RK. Fatores de risco para o desenvolvimento de distúrbios alimentares: um estudo em universitárias. *Rev Nutr*. 2001; 14:3-6.
- [15] Alvarenga MS, Scagliusi FB, Philippi ST. Comportamento de risco para transtorno alimentar em universitárias brasileiras. *Rev Psiq Clin*, 2011; 38:3-7.
- [16] Alves E, Vasconcelos FAG, Calvo MCM, Neves J. Prevalência de sintomas de anorexia nervosa e insatisfação com a imagem corporal em adolescentes do sexo feminino do Município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24:503-512.

# CAPÍTULO 8

## **O IMPACTO DO ESTRESSE SOBRE PROFISSIONAIS E ESTUDANTES DA ÁREA DA SAÚDE**

**AUTOR:**

**Danielle Cristina Honorio França**

# O impacto do estresse sobre profissionais e estudantes da área da saúde

**Autores: Danielle Cristina Honorio França**

*Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia-UFMT*

---

## Resumo

O estresse é um conjunto de alterações no mecanismo fisiológico, promovendo modificações químicas, biológicas e físicas no corpo humano. Profissionais da saúde podem possuir níveis maiores de estresse, bem como acadêmicos da área da saúde, principalmente pelo fato de possuírem rotina laboral voltada para muitos atendimentos em pouca quantidade de tempo, que culminam em exaustão, maus hábitos alimentares, diminuição do lazer, privação de sono, entre outros. Além disso, é possível perceber que nessa área outro fator estressor presente é a constante necessidade dos profissionais e acadêmicos lidarem com a morte de pacientes, cuidados paliativos, rotinas de urgência e emergência. Por fim, a correta qualidade de vida e o controle do estresse devem ser promovidos e incentivados desde a rotina acadêmica dos cursos da área de saúde até mesmo nos âmbitos hospitalares de trabalho dos profissionais da saúde.

**Palavras-chave:** Estresse. Profissionais da saúde. Estudantes da saúde.

## The impact of stress on health professionals and students

---

### ABSTRACT

Stress is a set of changes in the physiological mechanism, promoting chemical, biological and physical changes in the human body. Health professionals can have higher levels of stress and academics in the health area, mainly because they have a work routine focused on many visits in a small amount of time, which culminate in exhaustion, poor eating habits, decreased leisure, sleep deprivation, among others. In addition, it is possible to notice that, another stressing factor present in this area is the constant need for professionals and academics to deal with the death of patients, palliative care, and urgent and emergency routines. Finally, the correct quality of life and stress control should be promoted and encouraged from the academic routine of health courses to even in the hospital areas of work of health professionals.

**Keywords:** Stress. Health professionals. Health students.

---

### 1. INTRODUÇÃO

O estresse é um elemento presente em patologias, sendo fator relacionado à mudanças na estrutura química corpórea. Biologicamente, o estresse consiste em uma ameaça real ou potencial à homeostase, levando à perda de equilíbrio. O estresse apresenta a característica de se manifestar através da Síndrome Geral de Adaptação (SGA), promovendo alterações. Desse modo, a Síndrome Geral de Adaptação é o conjunto de respostas não especificadas capazes de ocorrerem em três fases: a primeira denominada fase de alarme, onde há manifestações agudas sintomáticas, a segunda denominada fase de resistência, quando as manifestações agudas desaparecem e a terceira, chamada fase de exaustão, quando há a volta das reações da primeira fase e pode haver o colapso do

organismo. Dessa forma, o estresse apresenta manifestações fisiológicas diferentes dependendo da fase. Também é importante ressaltar que o estresse mais grave leva à fase de exaustão, podendo ou não ter passado anteriormente pelas outras fases [1].

O trabalho na área da saúde apresenta um caráter descrito muitas vezes como estressante, fazendo com que a saúde mental dos profissionais envolvidos seja motivo de preocupação. A natureza do exercício da profissão médica e da organização desse trabalho podem gerar distúrbios emocionais, não só em profissionais da área da saúde, mas também em estudantes dos cursos relacionados [2].

A literatura descreve vários momentos considerados potenciais estressores na vida do acadêmico da área de saúde [3, 4]. Como exemplos de fatores estressores nesse público destacam-se o vestibular que exige extremo esforço e competitividade, a metodologia de ensino atualmente pautada no modelo Problem Based Learning (PBL) que é diferente da usada durante o período de ensino fundamental e médio, além do ritmo dos rodízios do internato e a escolha da futura possível especialidade [5].

O primeiro contato dos estudantes da área da saúde com pacientes e o término da faculdade, também podem ser considerados momentos críticos, onde o receio de atuar profissionalmente pode eventualmente surgir [5].

O estresse no trabalho influencia diretamente a qualidade de vida [6]. Na área da saúde, um ambiente saudável de trabalho, proporciona melhores atuações desses profissionais no ambiente de trabalho e também sobre suas relações familiares, bem como melhora o aspecto de realizações relacionadas à anseios, vontades pessoais e demais compromissos [7,8], agindo também como mecanismos de prevenção do estresse.

O elevado nível de estresse promove queda na qualidade de vida, tendo resultados negativos que impactam na forma como os estudantes e profissionais da saúde interagem nas diversas áreas da sua vida [9].

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

Os níveis de estresse na área da saúde pode ser alto [10]. Logo, entender o processo fisiopatológico do estresse, bem como suas causas e consequências é importante [11,12].

O estresse é uma resposta adaptativa à uma série de processos de tentativa de mantimento da homeostase [13]. Durante esse mecanismo ocorrem alterações em órgãos e sistemas, de modo que promova ações diretas em diversas estruturas do sistema neuroimunoendócrino [14,15].

Tanto profissionais de saúde, quanto estudantes estão sujeitos à reações de estresse frequentes, sendo que pesquisas demonstram principalmente a presença dos chamados “fatores estressantes/estressores” desde a época da faculdade, bem como as consequências desses fatores para a saúde dos futuros profissionais [16,17].

O estresse nos estudantes e profissionais da saúde é preocupante, pois além de afetá-los fisicamente, também afeta os âmbitos psicológico e cognitivo. Desse modo, ocorre prejuízo na qualidade de vida, no aprendizado e pode alterar o cuidado ao paciente, tornando o bem-estar desses profissionais e estudantes, uma questão de saúde individual e um problema de saúde pública, pois os fatores estressores quando presentes geram malefícios que podem recair também sobre pacientes [11, 18, 19].

Como fatores estressores nesse público, têm-se o estilo de vida e suas mudanças, as exigências quanto à aprendizagem, o tempo insuficiente para realização de atividades domésticas e para o lazer, o ambiente de competição na academia e também em alguns aspectos no ambiente científico, além de aspectos pessoais, financeiros e familiares que podem promover alterações [20-22].

Também é relevante que o contato com doenças graves, com a morte e o cuidado clínico



paliativo contribuem como fatores estressores nesse meio [23].

Estudos enfatizam que menores níveis de estresse e melhor qualidade de vida de estudantes e profissionais da saúde são meios para promoção da criatividade e iniciativa, tornando principalmente os estudantes capazes de lidar de modo integral com os pacientes e suas demandas [24,25]. Além disso, o médico capaz de manter um maior quociente emocional é capaz de controlar emoções no trabalho e ensinar o paciente a agir da mesma maneira [26]. Também é importante ressaltar que profissionais e estudantes saudáveis são, geralmente, exemplos de estilos de vida saudáveis para seus pacientes [27].

O sono é um importante parâmetro da qualidade de vida e a privação de sono em estudantes e profissionais da saúde pode afetar diretamente na saúde biopsicossocial dessa população, sendo caracterizada pela constante mudança no horário de dormir e de acordar, principalmente durante estágios profissionalizantes ou plantões noturnos. Isso pode afetar de forma negativa a saúde destes e comprometer a memorização, a atenção, a capacidade de resolução de problemas e o desempenho acadêmico-profissional [28,29].

Por fim, a qualidade de vida desse grupo também é afetada pela alimentação desregulada em horários e muitas vezes caracterizada como não saudável, justificada pela considerável falta de tempo e a busca por uma alimentação mais imediata, mais rápida, que tende a ser mais industrializada, ou ainda também é justificada pela quantidade de refeições que acabam não ocorrendo devido à pressa [30].

---

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa maneira, qualidade de vida em profissionais da saúde e em estudantes de cursos da área da saúde é um fator importante para o bem-estar próprio do profissional ou aluno e para um bom desempenho destes em relação aos pacientes.

O controle do estresse é algo que deve ser promovido e incentivado desde o início da jornada acadêmica na área da saúde, bem como constantemente lembrado diante do meio hospitalar-profissional, de modo que cada vez mais esses profissionais e acadêmicos busquem maior equilíbrio entre as atividades laborais e uma adequada qualidade de vida.

---

### 4. REFERÊNCIAS

- [1] Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936;138:32.
- [2] Nogueira-Martins LA. A saúde do profissional de saúde. In: De Marco MA (ed.). *A face humana da medicina: do modelo biomédico ao modelo biopsicossocial*. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2003
- [3] Castro FC. Os temores na formação e prática da medicina: aspectos psicológicos. *Rev Bras Educ Méd.* 2004;28(1):38-45.
- [4] Millan LR, Souza EN, Marco OLN, Rossi E, Arruda PCV. O I encontro paulista dos serviços de assistência psicológica ao estudante universitário. *Rev Hosp Clin Fac S Paulo.* 1998;53(3):156-61.
- [5] Ramos-Cerqueira AT, Lima MC. A formação da identidade do médico: implicações para o ensino de graduação em Medicina. *Interface – Comunic, Saúde, Educ.* 2002;6(11):107-16.
- [6] Silva AA, Souza JMP, Borges FNS, Fischer FM. Health-related quality of life and working conditions among nursing providers. *Rev Saúde Públ.* 2010; 44 (4):718-725.

- [7] Mende SS, Ferreira LRC, De Martino MMF. Identificação dos níveis de stress em equipe de atendimento pré-hospitalar móvel. *Estud Psicol.* 2011; 28(2):199-208.
- [8] Vasconcelos AF. Qualidade de vida no trabalho: Origem, Evolução e Perspectiva. *Cad Pesq em Adm.* 2001; 8(1):23- 34.
- [9] Sadir MA, Bignotto MM, Lipp MEN. Stress e qualidade de vida: influência de algumas variáveis pessoais. *Paidéia.* Ribeirão Preto. 2010; 20(45):73-81.
- [10] Bassols AMS, Carneiro BB, Guimarães GC, Okabayashi LMS, Carvalho FG, Silva AB, Cortes GN, Rohde LAP, Eizirik CL. Stress and coping in a sample of medical students in Brazil. *Arch Clin Psychiatry.* 2015;42(1):1-5.
- [11] Lima MCP, Domingues MS, Cerqueira ATAR. Prevalência e fatores de risco para transtornos mentais comuns entre estudantes de medicina. *Rev Saúde Pública* 2006;40(6):1035-41.
- [12] Guimarães KBS. Incidência de estresse e formação médica. *Revista de Psicologia da UNESP.* 2006;5(1):41-57.
- [13] Sinha R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1141:105-30.
- [14] Sinha R, Jastreboff AM. Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biol Psychiatry.* 2013;73(9):827-35.
- [15] Figueira J. Fisiopatologia do Stress. In: Mota Pinto A, editor. *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações.* 2. Coimbra: Lidel; 2007. p. 285-92.
- [16] Villanueva T, Haivas I. Studying medicine and quality of life. *Student BMJ* 2006;14:170-1.
- [17] Supe AN. A study of stress in medical students at Seth G.S.Medical College. *Journal of Postgraduate Medicine.* 1998;44(1): 1-6.
- [18] Zonta R, Robles ACC, Grosseman S. Estratégias de enfrentamento do estresse desenvolvidas por estudantes de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina. *Rev Bras Educ Med* 2006; 30(3):147-153.
- [19] Fazendeiro MP, Percepções dos Estudantes de Medicina acerca do Ambiente Educativo na Faculdade de Ciências da Saúde. Covilhã; 2011. Mestrado [Dissertação] - Faculdade de Ciências da Saúde da Beira Interior (UBI).
- [20] Aguiar S, Vieira A, Vieira K, Nóbrega J. Prevalência de sintomas de estresse nos estudantes de medicina. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria.* 2009;58(1).
- [21] Notman M, Salt P, Nadelson C. Stress and adaptation in medical students: who is most vulnerable? *Comprehensive Psychiatry.* 1984;25.
- [22] Vitaliano P, Russo J, Carr J, Heerwagen J. Medical school pressures and their relationship to anxiety. *Journal of Nervous and Mental Disease.* 1984;172.

- [23] Enns MW, Cox BJ, Sareen J, Freeman P. Adaptive and maladaptive perfectionism in medical students: a longitudinal investigation. *Med Educ.* 2001; 35(11):1034-42.
- [24] Grosseman S. Satisfação com o trabalho: do desejo à realidade de ser médico [Tese]. Florianópolis: UFSC; 2001.
- [25] Grosseman S, Patrício ZM. Do desejo à realidade de ser médico: a educação e a prática médica como um processo contínuo de construção individual e coletiva. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004. 203 p.
- [26] Jung CG. Memórias, sonhos e reflexões. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1975.
- [27] Wolf TM. Stress, coping and health: enhancing well-being during medical school. *Med Educ.* 1994; 28(1):8-17.
- [28] Gomes ACA. Sono, sucesso acadêmico e bemestar em estudantes universitários [Tese]. Aveiro (PT): Universidade de Aveiro. Programa de PósGraduação em Ciências da Educação. 2005.
- [29] Schneider MLM, Vasconcellos DC, Dantas G, Levandovski R, Caumo W, Allebrandt KV, et al. Morningness-eveningness, use of stimulants, and minor psychiatric disorders among undergraduate students. *Int J Psychol.* 2010 Feb; 46(1):18-23.
- [30] MARCONDELLI, P.; COSTA, T. H. M.; SCHMITZ, B. A. S. Nível de atividade física e hábitos alimentares de universitários do 3º ao 5º semestres da área da saúde. *Rev. Nutr., Campinas*, v. 21, n. 1, p. 39-47, jan./fev. 2008.

# CAPÍTULO 9

## **MASSAGEM RELAXANTE COMO PRÁTICA ALTERNATIVA DE ALIVIO DE DORES MUSCULARES EM POLÍCIAS MILITARES**

**AUTORES:**

**Maria do Carmo Pascoal**

**Schirley Almeida Prado**

**Édson Fredulin Scherer**

# Massagem relaxante como prática alternativa de alívio de dores musculares em polícias militares

**Maria do Carmo Pascoal, Schirley Almeida Prado, Edson Fredulin Scherer**

*Curso de Tecnologia em Estética Estética do Centro Universitário do Vale do Araguaia – UNIVAR. Barra do Garças, MT, Brasil.*

---

## Resumo

O trabalho teve como objetivo geral analisar os benefícios da massagem relaxante em policiais militares na melhoria da saúde. O tipo de pesquisa que foi realizada foi exploratória experimental onde foram analisadas as variantes para compreender os procedimentos técnicos e benefícios da massagem relaxante, para melhoria da saúde em polícias militares do gênero feminino das corporações de Barra do Garças-MT e Aragarças-GO. Os resultados encontrados foi que a técnica da massagem relaxante melhorou o funcionamento de todo o corpo após uma rotina estressante na corporação militar, propiciando condições necessárias à recuperação e a melhoria nas condições de saúde. Ressalta-se no estudo a importância dessa técnica que associe, entre outras possibilidades, práticas integrativas e complementares de saúde, como a massagem relaxante no tratamento convencional indicado pelo profissional esteticista na área de saúde após rotina exaustiva de trabalho na corporação militar.

**Palavras-chave:** Massagem. Relaxante. Polícia. Terapia.

---

## Relaxing massage as an alternative practice to relieve muscle pain in military police

### ABSTRACT

The work aims to analyze the benefits of relaxing massage in the military police in improving health. The type of research that was carried out was exploratory experimental. The variants were analyzed to understand the technical procedures and benefits of relaxing massage to improve health in female police officers from the military corporations of Barra do Garças-MT and Aragarças-GO. The results found were that the relaxing massage technique heard an improvement in the functioning of the whole body, providing the necessary conditions for recovery and improvement in health conditions. The study emphasizes the importance of this technique that combines, among other possibilities, integrative and complementary health practices, such as relaxing massage, in the conventional treatment indicated by the esthetician professional in the health area after exhaustive work routine in the military Corporation.

**Keywords:** Massage. Relaxing. Police. Therapy.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A massagem relaxante de acordo com Galeno (131-201ac) era indicada antes e depois dos grandes combates, pois a crença era de que o procedimento de massagem preparava os músculos dos atletas para o exercício limpando o corpo dos fluidos aumentando a capacidade física dos atletas [1].

A aplicação terapêutica, desde a antiguidade, da massagem relaxante é utilizada como método alternativo no tratamento para alívio das dores ou cura de ferimentos [2].

Esse procedimento é um excelente auxiliar na promoção do bem-estar, para o tratamento das lesões e disfunções, como as entorses, luxações, no alívio de cansaço e os desconfortos esqueléticos musculares [3]. Sua origem vem em regiões européias e asiáticas (China, Índia, Japão, Grécia e Roma), tendo como sua referência mais antiga um texto médico chinês chamado Nei Ching, escrito em meados de 2500 a.C [4].

De forma geral, os benefícios da massagem relaxante utilizando as técnicas ocidentais e oriental são a melhoria da percepção e sensibilidade de seu corpo, ampliando a consciência corporal e o cuidado ofertado durante a sessão de massagem, gerando uma maior confiança e sensação de acolhimento e bem-estar. Outros benefícios dessa técnica é diminuição da ansiedade, da carência emocional, como também amenização no uso de drogas como álcool, tabaco e acelerando o processo de cura nos casos de dores nas contusões, como também o efeito calmante [5].

No entanto, a terapia da massagem manual facilita a circulação sanguínea há relatos científicos que também promove a reabsorção de diversas toxinas e reativa a circulação de proteínas do meio intersticial celular [6].

Outros estudos, como o de Dougans [7] evidenciam que essa abordagem terapêutica ajuda a aliviar os efeitos do estresse, como a hipertensão, úlceras, doenças infecciosas, distúrbios gastrointestinais, insônia, dores de cabeça, ansiedade e depressão. Além disso, a massagem libera endorfinas (peptídeos com propriedade analgésica) estimulando a atividade cerebral com a produção de diversas substâncias que atuam no Sistema nervoso central.

A massagem relaxante pode ser bastante efetiva no manejo de condições musculoesqueléticas, pois ela visa estimular o metabolismo muscular e excitar a sensibilidade dos nociceptores celulares, preparando o sistema neuromuscular para os esforços bruscos e rápidos. E após o esforço físico, permite que o organismo ajude na eliminação dos detritos metabólicos e na facilitação do retorno do relaxamento, gerando bem estar, favorecendo na recuperação e reparação das lesões musculares

A justificativa pela pesquisa do tema se deu durante a minha formação acadêmica onde interessei pela área de massagem relaxante. A alternativa terapêutica é importante para profissionais esteticistas na saúde, principalmente durante a sua formação acadêmica, para adquirir conhecimentos sobre os recursos complementares na estética. Os pacientes, deve-se orientando e a indicação como métodos preventivos na terapia no tratamento da saúde. O uso da massagem relaxante como uma terapia alternativa por profissionais da estética tem muitos benefícios fisiológicos ajudando o relaxamento do sistema nervoso, aumentando a circulação sanguínea e linfática, beneficiando a distribuição de oxigênio fortalecendo energia para células o que ocasiona um maior fortalecimento muscular das fibras elásticas. Além disso, aumenta a produção de colágeno e também reduzindo a ansiedade e o estresse. É importante salientar que a técnica de massagem após um trauma é feita através do toque em um dos sete segmentos de couraça espalhados no corpo (olhos, boca, pescoço, alto do tórax e diafragma, abdômen e pélvis). Por isso, a massagem psíquica de conscientização (massagem focalizando o indivíduo para suas sensações corporais através de uma breve indução), ou através da própria expressão de fala do paciente, pode fazê-lo tomar consciência do tipo de defesa que guarda naquela região e relaxar. Por isso, a importância desse estudo realizado utilizando a massagem relaxante como recurso adicional complementar na saúde dos policiais militares após longa jornada de trabalho.

O trabalho tem como objetivo geral analisar os benefícios da massagem relaxante em

policiais militares na melhoria da saúde. Como objetivo específico averiguar as aplicações da massagem na melhoria das dores musculares. Avaliar o uso da massagem relaxante no tratamento da ansiedade e stress, relatar a importância da massagem relaxante como prática preventiva de doenças, divulgar a massagem relaxante como prática terapêutica na estética corporal.

---

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. Materiais e Métodos

O tipo de pesquisa que foi feita foi exploratória com base experimental, onde foram analisadas as variantes para compreender os procedimentos técnicos e benefícios da massagem relaxante para melhora na saúde em policiais do gênero feminino das corporações militares de Barra do Garças-MT e Aragarças - GO.

Os critérios de inclusão utilizados foram ser policial militar feminino, encontrar-se na faixa etária de 26 a 40 anos ser residente nos municípios de Barra do Garças-MT e Aragarças-GO. Foram excluídos do estudo pacientes portadores de neoplasias malignas, processos inflamatórios agudos infecciosos e doenças malignas. Ao todo participaram do estudo cinco (5) policiais.

Todas as participantes incluídas no estudo preencheram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando e concordando com a sua participação na pesquisa.

Além disso, no período que foi feito o experimento foi aplicado um questionário antes do procedimento de massagem relaxante onde foi analisado os parâmetros do controle da dor muscular, níveis de insônia, diminuição do alívio da tensão e da ansiedade, nível de estresse cansaço físico e mental, insônia, irritabilidade o nervosismo e fadiga

O local onde foi realizado a parte experimental de estudo foi na sala de estética localizado na Rua Ricardo Pereira Dos Santos, Quadra.11, Lote.5, s/ n com esquina do Hospital Municipal Getúlio Vargas na Vila Ceará em Aragarças-Go.

A técnica da massagem relaxantes foi aplicada nessas 5 voluntárias policiais femininas da corporação de Barra do Garças-MT e Aragarças - GO. O experimento foi realizado em dias alternadas por um período de 15 dias duas vezes por semana em cada uma das voluntárias. Além disso, foram analisados e comparados os resultados através de uma ficha de anamnese fazendo comparações ao longo de seção dos pacientes relatados nas fichas de evolução de sua evolução clínica. Em relação a terapia manual foi observado se houve alguma melhora nos indicadores de saúde muscular nas jornadas de trabalho antes e depois do término de suas escalas de plantão na corporação militar.

A técnica utilizada é massagem manual relaxante baseada nos manuscritos de texto do médico Nei Ching escrito 2800 A.C. A prática dessa técnica manual de massagem relaxante foi feita com as etapas começando primeiramente com a ficha de anamnésia.

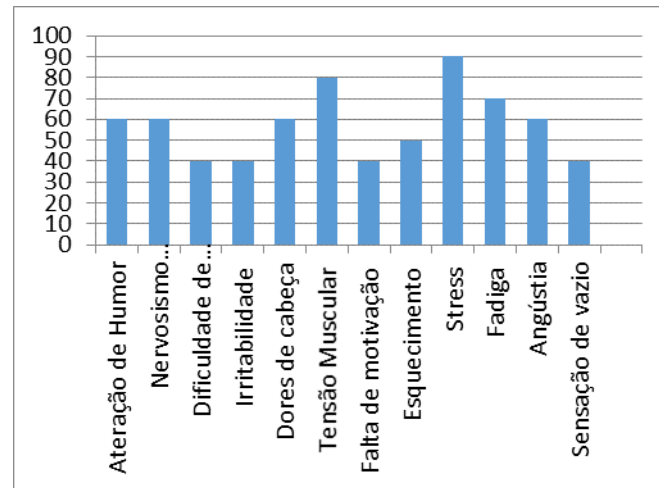
A técnica foi iniciada com procedimento de massagem pelos pés com manobra de deslizamento suave e com flexões nos membros inferiores e superiores (cervical, dorsal e lombar). O tempo de cada massagem foi de 40 minutos a 60 minutos. A finalização da massagem ocorreu com deslizamento suave em todos os membros superiores e inferiores das costas e pés do paciente.

Os dados obtidos foram tabulados e analisados com auxílio do Programa Microsoft Excel, posteriormente apresentados no corpo do trabalho na forma de tabelas e gráficos.

### 2.2. Resultados e Discussão

A média de tempo das policiais militares da corporação militar da polícia foi de 15 anos, sendo que uma das policiais tinha 11 anos de corporação e duas 17 anos, outras duas 15 anos de corporação.

Os resultados obtidos demonstram que as participantes da pesquisa relataram antes do procedimento de aplicação da massagem relaxante. Percebe-se através dos resultados relatados que são apresentados na figura 1, onde a grande maioria das policias militares apresentam valores em porcentagem altos de tensão muscular (80%), angustia (60%), stress (90%), fadiga (70%), nervosismo (60%), dores de cabeça (60%) e fadiga (70%). O trabalho árduo dessas policiais na sua rotina, muitas vezes, em escala de plantão causa sintomas acima relacionado. Todas as cinco (5) participantes relataram antes de a massagem ser aplicada ter alteração de humor, tensão muscular, nível de stress, fadiga, irritabilidade e insônia e três (3) delas sentem também dores de cabeça e outros sinais e sintomas como: nostalgia, sentimento de derrota e fraqueza, angustia e dificuldade de concentração antes da realização das cinco secções de massagem terapêutica.



**Figura 1.** Representação da sintomatologia apresentada pelas policiais antes da aplicação da massagem relaxante. Fonte: Pascoal, 2020.

A “massoterapia”, em um contexto latino, vem da união do termo “masso” que significa “massagem” e “therapia”, cujo significado é “tratamento”. A massagem desde o princípio, tem como base funcional na clínica os benefícios no relaxamento, ao passo que essa técnica melhora a mecânica do organismo físico, juntamente com sistema neural, a fisiologia do funcionamento neuromuscular e a química que se relaciona aos diversos fatores emocionais no organismo [8].

A massagem relaxante é um procedimento de uso terapêutico não invasivo apresentando-se como uma alternativa para manter a saúde, prevenindo desequilíbrios, promovendo o bem estar e melhoria na qualidade de vida dos pacientes que a utilizam. Além disso, sua ação associada a outras terapias na medicina, proporciona uma maior eficácia nos tratamentos de saúde e bem estar físico e mental [7]. Por isso, a massagem relaxante é aplicada com movimentos firmes e suaves sobre a pele proporcionando principalmente o relaxamento muscular e sensação e bem-estar no organismo humano [9].

Estudos de Marques, fala que os sintomas com humor deprimido, redução do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades de trabalho humano podem provocar perda ou ganho de peso, insônia ou excesso de sono, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de desvalia ou culpa nas pessoas o que ocasiona a redução da concentração e ideias de morte ou suicídio [10]. Os resultados obtidos antes da realização da massagem relaxante corroboram com o que foi dito apresentado neste trabalho pois os policiais militares após longa jornada de trabalho exaustivo percebe-se o seu visível estresse do dia a dia na rotina da corporação, aumentando sua sobrecarga e o estresse emocional.

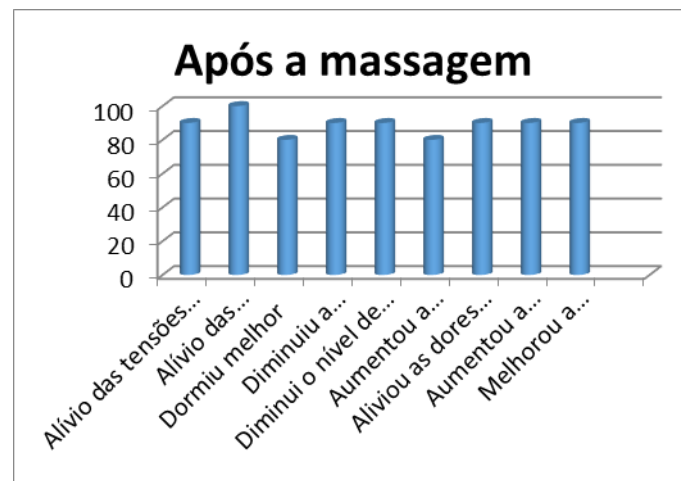
De acordo com estudos de Carvalho e Almeida [11], a massagem relaxante libera vários processos químicos no organismo, que são capazes de restabelecer a imunidade natural inata, restaurando o humor, reequilibrando funções vitais, que podem levar a desencadeamento de estágios de dores físicas e mental no nosso organismo.



Pode-se destacar no momento do estresse uma situação de pressão, o corpo passa por alguns ajustes fisiológicos e musculares. Nesse sentido, os batimentos cardíacos modificam-se acelerando, devido ao coração ter que bombear mais sangue para os músculos que precisam receber mais sobrecarga de energia. Por isso, observa-se um aumento da frequência respiratória e da pressão arterial, entre outros fatores fisiológicos que vão modificar o funcionamento normal do corpo humano. Quando nosso corpo passa por esses ajustes fisiológicos não há liberação de adrenalina que se acumula no organismo que acaba gerando o estresse. A resposta a isso quando acontece, o corpo dá alguns sinais de que está com estresse entre eles é possível destacar: a alteração de sono, tensão muscular, problemas na pele, hipertensão, alterações de humor, ansiedade, entre outros sinais [12].

No presente estudo foi também observado os resultados encontrados após as 5 sessões que se encontram representados na figura 2, verifica-se uma a melhora significativa nos quesitos analisados como as tensões e dores musculares e o nível de estresse.

Esses resultados são semelhantes ao encontrados por Cançado [13] que diz que a massagem terapêutica produz inúmeros benefícios, sendo capaz de proporcionar bem-estar físico e mental aos pacientes que a utilizam frequentemente essa técnica. São inúmeros os benefícios da massagem, logo, além do relaxamento do corpo e de uma sensação de bem-estar, incluem também o controle do estresse; a diminuição da ansiedade; o alívio da tensão e das dores musculares; uma significativa melhora da circulação sanguínea; o aumento da elasticidade da pele e da imunidade; a diminuição da pressão arterial, no caso de pacientes hipertensos; o alívio de dores de cabeça; a redução do cansaço; a estimulação e o equilíbrio físico e mental.



**Figura 2.** Resultados encontrado após a realização da técnica da massagem relaxante em 5 sessões nos policiais militares femininos. Fonte: Pascoal, 2020.

Os resultados em estudo de massagem relaxante relatam que segundo a teoria Cezimbra [14], as fibras musculares promotoras de movimento têm suas funções mecânicas danificadas pela tensão em excesso provocada pela dor, mas o estímulo neurológico promovido pela massagem descontra a tensão e possibilita a recuperação natural dos movimentos perdidos. Os resultados após a massagem relaxante como demonstrado no presente estudo foi verificado a melhoria em vários quesitos relatados pelos policiais militares como alívio de tensão e dores musculares, como sensação de descanso e bem estar físico e mental proporcionado por essa técnica de massagem relaxante. Além disso, todos as cinco policiais militares apresentaram índice de melhora em mais de 80% em vários quesitos, como diminuição do estresse, alívio das dores de cabeça e um aumento da motivação após fazer o uso dessa técnica. Este estudo vem colaborar com outros estudos realizados utilizando essa terapia complementar na saúde para o benefício do trabalhador.

A massagem relaxante cura o paciente como um todo, não só no processo apenas de doença, mas também os motivos causadores da doença, que na grande maioria das vezes pode ser o estresse emocional, físico e mental. Por isso, outros fatores podem desencadear doenças como também

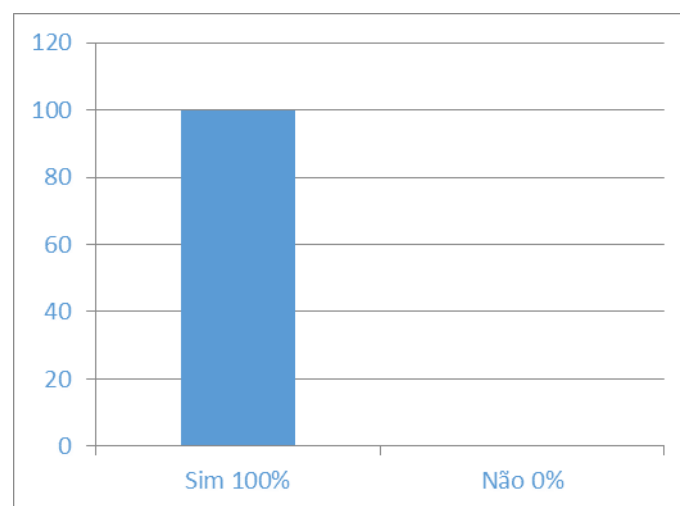
bloquear o tratamento medicamentoso nesses casos, por isso o uso de tratamento complementares como da massagem relaxante podem ser propostos como novas alternativas na terapêutica da saúde [15].

O resultado verificado no trabalho percebe-se uma nítida melhora com o uso da massagem relaxante na prática na saúde do trabalhador. Nesse sentido, a técnica da massagem após longa escala de plantão desses policiais é muito importante a sua utilização, para alívio de suas tensões e stress no trabalho. A rotina em que estes trabalhadores da segurança ficam expostos fica muito evidente em termos de saúde a importância do estudo na qualidade de vida dos policiais militares femininos no dia a dia da corporação.

Por outro lado, um estudo relatou que cada indivíduo possui um desenvolvimento físico e mental diferente do outro [16], por isso em relação aos parâmetros de dores, algumas pessoas são mais sensíveis a dores do que outras. Nesse sentido, quando um indivíduo passa por um período prolongado de dor seu humor muda muito drasticamente podendo tornar-se uma pessoa mal-humorada ou uma pessoa muito em baixa estima tendo muita tristeza podendo até em casos mais graves entrar em depressão após jornadas de trabalho excessiva. Para que indivíduos possam ter uma qualidade de vida, não é apenas um emprego bom com um salário excelente, mas também com uma rotina no seu dia a dia de trabalho junto a sua família que façam bem a essa pessoa.

Esses resultados encontrados nesse estudo também foram evidenciados nas policias militares em nosso estudo, pois todos os cinco apresentavam altos níveis de tensão muscular antes da massagem e após as cinco seções muito desses fatores diminuíram o que comprova a eficácia da técnica de massagem relaxante como uma das alternativas complementares no tratamento do stress e dores musculares em trabalhos exaustivos como realizado pela corporação militar feminino no seu dia a dia de trabalho.

Outro resultado importante que foi obtido nos experimentos foi de que todas as cinco policiais militares após a realização das 5 seções de terapia com a técnica da massagem relaxante, relatam que por unanimidade em afirmar que a técnica foi útil para tratamento do stress do trabalho e melhoria na qualidade de vida dentro da corporação militar.



**Figura 3.** Indicação da massagem relaxante como técnica de alívio das dores musculares decorrente das tensões e stress no dia a dia no trabalho de policiais militares. Fonte: Pascoal, 2020.

No entanto, o toque na massagem relaxante apazigua os sentimentos e afetos, pois ele é um tipo de cuidado onde se libera substâncias neuroquímicas como endorfina e serotonina, desencadeando numa profunda sensação de prazer e bem estar em quem recebe tal procedimento. Neste sentido, o profissional que realiza massagem deve ter uma visão de saúde ampla sobre o indivíduo a ser tratado, usando de todos os artifícios e técnicas disponíveis na área de saúde para tratar o seu paciente em níveis emocional como também corporal, mental e espiritual.

Diante do resultado exposto no presente estudo, observa-se ainda que os benefícios físicos e mentais propiciados pela massagem relaxante também estão associados à melhora do efeito calmante e o nível de stress, como também diminui a ansiedade e as dores musculares, como foi relatado no presente experimento nos policiais militares feminino.

---

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, percebe-se que as origens da massoterapia, nos primórdios da civilização, que a sua prática é muita antiga e era utilizada para promover bem-estar físico e mental. Nesse sentido a massagem relaxante pode ser utilizada como uma técnica na melhoria da qualidade de vida das policias militares femininos. Pois, os benefícios dessa técnica vão além do relaxamento, na melhorando o funcionamento fisiológico de todo o corpo, reequilibrando-o e propiciando condições necessárias à recuperação e a melhoria nas condições de saúde.

Ressalta-se no estudo a importância dessa técnica que associe, entre outras possibilidades, práticas integrativas e complementares de saúde, como a massagem relaxante, no tratamento convencional indicado pelo profissional esteticista na área de saúde. Os resultados do estudo podem colaborar para aumento da qualidade de vida em processos patológicos agudos e crônicos na melhoria na sensação de relaxamento, bem como a diminuição do estresse, melhor produtividade no trabalho e em atividades do cotidiano e aplicada a rotina dos policiais militares.

---

### 4. REFERÊNCIAS

- [1] Almeida DM, Lopes LFD, Costa VMF, dos Santos RCT, Corrêa JS. Avaliação do estresse ocupacional no cotidiano de policiais militares do Rio Grande do Sul. ROC. 2017; 13:215-238.
- [2] Fritz S. Fundamentos da massagem terapêutica. São Paulo: Manole, 2002.
- [3] Davis CM. Massagem Terapêutica e reabilitação. In: Fisioterapia e reabilitação: terapias complementares. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
- [4] Cassar MP. Manual de massagem terapêutica: um guia completo de massoterapia para o estudante e para o terapeuta. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466/12. 2012. São Paulo: Manole, 2001.
- [5] Montagu A. Tocar o significado humano da pele. 5. ed. São Paulo: Summus, 1988.
- [6] Jacquemay DA. Drenagem-vitalidade. A drenagem linfática associada à energética chinesa. São Paulo: Manole, 2000.
- [7] Donatelli S. A linguagem do toque: massoterapia oriental e ocidental. Rio de Janeiro: Roca, 2015.
- [8] Costa FRB, Souza LC. Efeitos da hidroterapia associado a massoterapia em pacientes portadores da fibromialgia. Rev Visão Univer. 2017; 2: 1-16.
- [9] Lima MM. Massoterapia, ações que maximizam a qualidade de vida no trabalho. 2011. Disponível em: <<https://bdm.unb.br/handle/10483/3037>>.
- [10] Marques JFS, Sá SC, Freitas Fo WD, Santo LRE, Prince KA, Oliveira MVM. Transtorno depressivo maior em idosos não institucionalizados atendidos em um centro de referência. Montes Claros-MG-Brasil. Arq Ciênc Saúde. 2017; 24:20-24.
- [11] Carvalho RDJ, Antonieta M, Tigre P. Artigo Efeitos da Massoterapia sobre o Sistema Imunológico. Id Line Rev Mult Psic. 2015; 12:353-366.
- [12] Bordin S. Tudo Sobre Estresse. Disponível em: <<https://www.einstein.br/noticias/noticia/tudo-sobre-estresse>>.
- [13] Cançado J. Do-in: a milenar arte chinesa de acupuntura com os dedos. 50 ed. Ground, 2017. 320 p.
- [14] Cezimbra M. Bem-Estar na Palma das Mãos: a cultura da massagem do oriente ao ocidente. Rio de Janeiro: Senac Nacional, 2009. 160 p.

- [15] Braz ACAR, Salvagioni DAJ, Siraichi JTG, Fernandes JG, Pereira RM, Roecker S, Pinto RR. Quickmassage como tratamento complementar de hipertensão arterial sistêmica em mulheres. Rev Saúde e Pesq. 2014; 7:287-293.
- [16] Dufour M. Massagem e esporte. Massagens e massoterapia, efeitos, técnicas e aplicações. São Paulo: Manole, 2001.

# CAPÍTULO 10

## **THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ON BEHAVIOR AND STRESS OF *ALOUATTA CARAYA* IN CAPTIVITY**

**AUTORES:**

**Juliana Luzia França**

**Laura Teodoro de Oliveira Fernandes**

**Carlos Eduardo Borges**

**Adenilda Cristina Honório França**

**Carlos Kusano Bucalem Ferrari**

**Eduardo Luzía França**

# A Influência do Enriquecimento Ambiental no Comportamento e Estresse de Macaco Bugio (*Alouatta Caraya*) em Cativo

**Autores:** Juliana Luzia França<sup>1,2</sup>, Laura Teodoro de Oliveira Fernandes<sup>3</sup>, Carlos Eduardo Borges<sup>1</sup>, Adenilda Cristina Honório França<sup>3</sup>, Carlos Kusano Bucalem Ferrari<sup>3</sup>, Eduardo Luzia França<sup>3</sup>.

1. Instituto de Ciências da Saúde – Centro Universitário do Planalto de Araxá, Av. Amazonas, 777 – São Geraldo, CEP 38.600.000, Araxá–MG, Brazil.

2. Centro de Desenvolvimento Ambiental da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração, Córrego da Mata, s/no, Caixa Postal 08, CEP 38.183.970, Araxá, MG, Brasil. Fone 55-34-3669-3511. Fax 55-34-3669-3500.

3. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia-UFMT

---

## Resumo

Primates do gênero *Alouatta* são encontrados em toda a América neotropical. A criação de primatas em cativeiro representa um ambiente não natural e, o sucesso depende de procedimentos de manejo que devem considerar as necessidades comportamentais dos animais em cativeiro. O objetivo deste estudo foi verificar a influência do enriquecimento ambiental no comportamento de macacos *Alouatta caraya* em cativeiro e seu impacto no estresse em cativeiro. Na fase de enriquecimento ambiental do estudo, foram introduzidos vários tipos de alterações ambientais: alimentares, estruturais, sociais, ocupacionais e sensoriais. A observação comportamental foi realizada usando a técnica de amostragem de varredura e, em seguida, as medidas de cortisol foram analisadas para determinar o estresse. Observou-se que as classes de comportamento apresentam alterações ao longo do processo de enriquecimento ambiental. As classes de manutenção e interação social foram as mais influenciadas pelo enriquecimento ambiental. O enriquecimento ambiental não influenciou as concentrações de superóxido dismutase e a liberação de ânion superóxido. Houve redução nos níveis de cortisol no sangue dos macacos em cativeiro. Estes dados reforçam a ideia de que o enriquecimento ambiental diminui os agentes estressores em animais em cativeiro e, interfere nas respostas comportamentais ou fisiológicas.

**Palavras-chave:** Ambiental, Enriquecimento, Comportamento, *Alouatta caraya*, Estresse, Cativeiro

## The Influence of Environmental Enrichment on Behavior and Stress of *Alouatta Caraya* in Captivity

---

### ABSTRACT

Primates of the *Alouatta* genus are found throughout neotropical America. The creation of primates in captivity represents an extreme non-natural environment and success depends on management procedures that should consider the behavioral needs of captive animals. The aim of this study was to verify the influence of environmental enrichment on the behavior of *Alouatta caraya* monkeys in captivity and its impact on stress in captivity. In the environmental enrichment phase of the study, various types of environmental alterations were introduced: food, structural, social, occupational and

sensory. Behavioral observation was carried out using the scan sampling technique, and then cortisol measurements were analyzed to determine stress. In this work, we verified that behavior classes presented changes through the process of environmental enrichment. The classes of maintenance and social interaction were those that were most influenced by environmental enrichment. Environmental enrichment did not influence the superoxide dismutase concentrations and the superoxide anion release. The cortisol levels in the blood of the captive monkeys decreased. This research supports the idea that environmental enrichment decreases stressor agents for captive animals and interference in the behavioral or physiological responses.

**Keywords:** Environmental, Enrichment, Behavior, *Alouatta caraya*, Stress, Captivity

---

## 1. INTRODUCTION

Primates of the *Alouatta* genus are found throughout neotropical America. They are arboreal species and largely folivores, eating leaves, flowers and occasional fruits and spend much of the day feeding and resting (Prist et al., 2005).

*Alouatta caraya* primates present variable height of 30 to 75 cm and weigh up to 9 kg. Males are black-brown with a few reflections on the feet, hands and tail. When naked the skin is black. The female is light brown, tending to straw with darker reflections and naked parts are black. They live in flocks of three to twelve individuals of both sexes and various ages, headed by an adult male. Their habitat is arboreal, they are not very active and their slow movement is aided by a prehensile tail (Auricchio, 1995).

This animal is classified in an international agreement between governments in Appendix II of CITES (Convention on International Trade in Species) of Wild Fauna and Flora in Danger of Extinction, ensuring that international trade does not threaten the survival of specimens of wild animals and plants. Appendix II lists species that are not necessarily threatened now with extinction but may become so unless trade is closely controlled (Cites, 2008) The

creation of primates in captivity represents an extreme non-natural environment and success depends on management procedures that should consider the behavioral needs of captive animals (Boere, 2001). It is known that behavioral changes in animals are reflected in physiological parameters as with the hormone cortisol (Cavigelli, 1999), in oxidative cellular processes through the release of active metabolites of oxygen and its product enzymes, among them, the superoxide dismutase (SOD) enzyme, which is responsible for the metabolism of anion (Jiménez, et al., 2000). Thus, knowledge of behavioral categories in species of *Alouatta* in captivity may be important in minimizing the effects of stress in captivity.

Neotropical primates are characterized by complex neural structures and sophisticated ways to deal with the environment. Enrichment can reduce stress and improve welfare, increasing the quality of life and bringing management to acceptable ethical standards, stimulating the standard repertoire of behavior, reducing mortality and increasing the reproductive rate, since environmental enrichment is a set of techniques that modify the environment, resulting in an improvement in quality of life of animals to satisfy their behavioral needs (Boere, 2001).

Lack of an explicit theoretical framework for environmental enrichment is a current problem in applied ethology. In the literature works are often vague, the choice of assessment parameters perplexing and the results difficult to interpret. Promoting natural behavior and improving animal welfare are two commonly stated, overlapping goals of environmental enrichment research (Newberry, 1995).

Although there are several studies in the literature about environmental enrichment (Boinski et al., 1994; Kerl et al., 1996), there is still a need to better understand captivity and environmental enrichment among species of primates (Boere, 2001).

The aim of this study was to verify the influence of environmental enrichment on the behavior of

## 2. DEVELOPMENT

### Materials and methods

This work was developed in the Conservation Breeding Center of Companhia Brasileira de Mineração and Metalurgia (CBMM), latitude 19°40'23", longitude 46°54'13.5", altitude 1,095.00 m, located in the city of Araxá, Minas Gerais, Brazil.

The Conservation Breeding Center is regulated by the Brazilian Institute for the Environment and Natural Renewable Resources (IBAMA) based on decree 139N/93. The Center is the only one of its kind in Brazil specialized in scrubland fauna and is a pioneer in maned wolf reproduction.

The study was carried out from July to November 2004 with a group of monkeys composed of 4 adult males and 3 adult females of the *Alouatta caraya* species, aged between 3 and 12 years and divided into 4 groups. The study was conducted in two phases, pre-enrichment and during enrichment.

Prior to enrichment, groups were composed of a pair of monkeys and by 3 adult single males, distributed in 4 areas. The animals were distributed in 4 enclosures that were 6.8m wide, 6.6m long and 4.7m high that included a covered area in the rear and a maintenance area. The side and back walls were of masonry and the front was screened. The enclosures contained vegetation and *Bambusa* sp, ropes, platforms for resting, food baskets, water and shelter. The eating area was made of PVC.

During the pre-enrichment phase, 16 h of observations were performed using the ad libitum technique, at times random, for 15 d to collect the relevant behavioral events of the species, and also to draw an ethogram (Cullen et al., 1997). The terms and structure of ethology followed existing models of ethograms (Porto et al., 2005) with appropriate adaptations made for the characteristics of the species observed in captivity.

The first behavioral observation phase used the scan sampling technique, in which all individuals in the group were observed and recorded separately on individual behavior ethograms (Bateson et al., 1993). We performed 57 h of scan sampling observations during the pre-enrichment phase, for 60 d. The comments consisted of 30 m duration, at intervals of 60 s, each animal was observed once a day, 4 d a week. At this stage, all the handling procedures previously implemented at the Conservation Breeding Center were maintained. The animals were fed with a daily diet of fruit, cooked vegetables, boiled eggs, vegetables, leaves and a diet with 18% protein (Lester-Scalon). Once a week ground beef, French bread and cow's milk were served. Four times a week multi-colored *Hibiscus cooperi* leaves and flowers, cabbage leaves (*Brassica oleracea* L.) and blackberry leaves (*Morus nigra*) were given. The food was offered at the same time, at 10:00 am, within the management area.

At this stage, approximately 8 ml of blood samples were collected from 5 animals to obtain serum to determine levels of the superoxide dismutase enzyme and the cortisol hormone. Also 8 ml of blood samples were collected with heparinized tubes for phagocytes analysis. The cells were fractioned by centrifugation (160 xg, 30 min.) through gradient density (density 1,077 g/l) using Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). This procedure resulted in 95% purity for the mononuclear (NM) and 92% purity for the polymorphonuclear (PMN), examined by optical microscope. Purified MN and PMN phagocytes were re-suspended independently in serum-free medium 199 (Gibco, MD, USA) and washed twice. The resulting MN and PMN phagocyte suspensions were adjusted at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml (Honório-França et al., 2001).

During the environmental enrichment phase, 52 h of scan sampling observations were performed over 60 d. The comments were similar to the pre-enrichment phase. Various types of environmental enrichment including food, structural, social, occupational and sensory were introduced in the second phase of the study.



Food enrichment consisted of dividing the Conservation Breeding Center recommended diet over different times and locations in the enclosure. In addition, surprise boxes containing hidden food, food hidden in baskets previously lined with grass, and food distributed in places and hidden among branches of vegetation were also used. Structural enrichment consisted of distributing a greater number of ropes of different length and thickness around the entire enclosure. Social enrichment consisted of releasing 2 female monkeys among 2 single males. The introduction of essences (lavender, roses) with nature sounds (waterfall, birds) and classical music were used as sensory enrichment. Rubber balls were employed as occupational enrichment. The environmental enrichment activities were carried out with a frequency of 2 to 3 times per week.

In the second phase, approximately 8 ml of blood samples were collected from 7 animals to obtain serum for determining levels of the superoxide dismutase enzyme and the hormone cortisol. Also 8 ml of blood samples were collected with heparinized tubes for phagocytes analysis. The procedures for obtaining phagocytes followed the same protocol as described in the first phase.

The behavioral records obtained by scan sampling were analyzed in terms of the absolute and relative frequencies of the actions or behavioral events involved. Absolute frequency was measured by noting the number of records of actions or behavioral events by each individual during the sampling period. Relative frequency was measured using the following formula (Cullen, 1997):

$$RF (\%) = \frac{AF \times 100}{TE} \quad \text{where:}$$

*RF* = relative frequency

*AF* = absolute frequency

*TE* = total number of events recorded during sampling period

Records were used to prepare a behavioral repertoire for the species in captivity in accordance with Del-Claro (2004).

Cortisol levels were determined at the TECSA laboratory (PET Diagnostics - Belo Horizonte, Minas Gerais - BRAZIL). Cortisol values were determined using specific tests of chemiluminescent used routinely in that laboratory.

The release of superoxide was measured by determining cytochrome C (Sigma) reduction according to the technique described by Pick et.al (1981) and adapted by Honorio-França et al (1997). The MN and PMN phagocytes were centrifuged twice at 160 x g, for 10 min at 4°C and 500 ml of de phagocytes was re-suspended in phosphate buffered saline (PBS with 2.6 mM CaCl<sub>2</sub> and 2.0mM MgCl<sub>2</sub>) containing cytochrome C (2 mg/ml). The MN and PMN phagocytes were stimulated with melatonin hormone (100 ng/ml) was simultaneously carried out (França et al., 2005). The suspensions (100 µl) were incubated for 60 min at 37°C on culture plates. The reaction rates were measured by absorbance at 630 nm and the results were expressed as nmol/O<sub>2</sub><sup>-</sup>. All experiments were performed in duplicate or triplicate.

The SOD enzyme analysis was made from the plasma using the method of reducing the Nitro Blue Tetrazolium (NBT-Sigma) and reading was detected in spectrophotometer to 560 nm (Novelli et al., 1993, Endo, 2007).

The analyzed superoxide dismutase was calculated by the following relationship: calculation = (Ab standard - Ab sample / Ab standard) x 100 = % reduction of NBT / SOD. The results were expressed in international units (IU) of SOD.

The quantitative data for the behavioral categories were analyzed using the BioEstat program, version 2.0 and non-parametric test (Wilcoxon) for two related samples. The data determining cortisol and SOD enzyme were evaluated using the BioEstat program, version 2.0 and the Student t-test related to two samples. The statistics were significant when the p-value was less than 0.05 (p <0.05).

## Results

There were 13,035 events registered in 218 sessions of behavioral scanning, totaling 125 h of observations. In the first phase, there were 6,668 records in 114 sessions of scanning; totaling 57 h of scan sampling. In the second stage, 6,108 records were obtained in 104 sessions of scanning, totaling 52 h of scan sampling.

Twenty-one behavioral categories were observed, identified and described based on 16 h of ad libitum observations. The behaviors were grouped into the following: food, locomotion, maintenance or rest, social interaction, stereotyped behavior and location.

Food - When the individual pursues, manipulates or eats any food, also includes the act of drinking water involving the use of hands or just the mouth; Search for the food: the animal pursues and selects that which seems most attractive.

Eating: animal takes food items to its mouth and chews. Drinking: the animal usually drinks sitting up using the hands or just the mouth.

Locomotion - when the individual moves, may be individually or in groups. Moves individually: uses the four members to support itself and moves slowly, with the tail slightly raised. This movement occurs on platforms, branches and ground. Includes races with small jumps.

Moves in groups: move next to each other and start small displacements, one following the other.

Maintenance/Rest - when the individual remains stopped or still, may be sitting, lying down, hanging by the tail, sleeping or not. It also includes the act of defecation and urination.

Defecate: seated, the body forming an angle of about 45°, the tail rolled in a branch parallel or slightly sideways with the tip rolled in the same branch that offers support.

Urinate: usually happens during defecation, or after, and uses the same body posture.

Stand/Sit: supported by a branch, or ramp, members are close to the chest, the tail remains in the branch or coiled around the body.

At rest: the animal is lying on the platform in the fetal position. At rest -- tensioned: the animal supports its back on the platform and extends the four members.

Social Interaction: interaction with individuals of other species or among the same species.

Vocalization: the vocal repertoire consists of continuous noise and rhythms such as hiccups and snoring.

Playing: interacting with other individuals in a friendly manner, consists of races to pick up objects, struggles with simulated bites and stresses of the tail. Playing hanging vertically, the branch arrested by the tail, swinging the body, sometimes breaking the foliage. Playing hanging horizontally, tail and one or two members on the same side of the animal, reaching to opposing branches.

Attack: interacting with other animals in an antagonistic way, act of investing, fighting or attacking the other animal.

Copula: the female lays on the stomach with ventral region or with the four members supported by the platform. The male takes the position to mount from behind, stomach supported on the back of the female. The male performs movements with the pelvic region.

Qatar: the animal manipulates itself or is manipulated by another animal with the eyes, head, face, back, side and lumbar region.

Stereotyped Behavior

Pacing: walking from one side to another. Characterized by at least one trip around the same track. Pacing always presents in the same place. It is the most common stereotyped behavior.

Masturbation: the animal secures the genital organ, making repeated movements with the hand.

Location: Nest: bottom of the enclosure, rings platform near the nest, on top of and inside the nest. Maneuver: bottom of the enclosure, on top of the maneuver. Ring branches: central area of the enclosure, rings and ropes. Vegetation: front of the enclosure, vegetation and screen.

## Quantitative Analysis

The average absolute frequencies (AF) and relative frequencies (RF) for behavior classes, recorded before enrichment and during enrichment, are described in Table 1. There was a significant difference for the class maintenance / rest and social interaction ( $p < 0.05$ ). The behavioral class food and location tended toward significance ( $0.05 < p < 0.10$ ).

Table 1. Mean of absolute frequency (AF) and relative frequency (RF) of monkey behavior (*Alouatta caraya*), registered before enrichment and during enrichment. (Wilcoxon Test  $p < 0.05$ ).

CLASS	FREQUENCY					
	Before Enrichment		Environmental Enrichment		Statistical	
	AF	RF	AF	RF	z	p
Maintenance	2696	39.24	1958	31.76	2.02	0.043
Food	201	2.92	293	4.75	1.75	0.079
Locomotion	328	4.77	6.17	10.01	1.48	0.13
Social Interaction	89	1.29	162	2.63	2.03	0.042
Stereotyped behavior	147	2.14	24	0.40	1.60	0.108
Location	3409	49.62	3111	50.46	1.82	0.067

Table 2 lists the mean absolute frequencies (AF) and relative frequencies (RF) for the behavioral categories recorded before enrichment and during enrichment. The categories maintenance / free sitting, maintenance / at rest tensioned and social interaction / vocalization showed significant differences ( $p < 0.05$ ). The categories food / eating, locomotion / group and social interaction / mating tended toward significance ( $0.05 < p < 0.10$ ). There was an increase in mating, food, interaction in the group and vocalization.

Table 2. Mean of absolute frequency (AF) and relative frequency (RF) of categories of behavior in monkeys (*Alouatta caraya*) registered before enrichment and during enrichment with significant differences (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ) or trends toward significance (Wilcoxon test,  $0.05 < p < 0.10$ ).

CLASS/CATEGORY	FREQUENCY					
	Before Enrichment		Environmental Enrichment		Statistical	
	AF	RF	AF	RF	z	P
Maintenance / Stand Sitting	1393	20.28	882	14.31	2.02	0.043
Maintenance / At Rest -- Tensioned	106	1.54	53	0.86	2.03	0.042
Food / Eating	185	2.69	272	4.41	1.75	0.079
Locomotion / Group	64	0.93	271	4.40	1.82	0.067
Social Interaction / Vocalization	2	0.03	8	0.13	2.80	0.041
Social Interaction / Copula	0	0	23	0.37	1.83	0.067

Table 3 represents the averages and standard deviations of superoxide anion released by phagocytes in peripheral blood of monkeys (*Alouatta caraya*) before and during environmental enrichment. It appears that there was no significant difference as to the production of superoxide anion.

Table 3. Mean superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) concentration by mononuclear phagocytes (NM) and polymorphonuclear (PMN) from peripheral blood of monkeys (*Alouatta caraya*) before and during environmental enrichment. The statistical differences were observed using analysis of variance (ANOVA) with the statistical calculation of F and a p-value lower than 0.05 (p <0.05) considered significant.

	Before Enrichment		Environmental Enrichment		Statistical	
	MN	PMN	MN	PMN	t	p
<b>Phagocytes</b>						
<b>Spontaneous</b>	17.1 ± 2.59	15.4 ± 3.6	18.1 ± 2.3	17.8 ± 0.6	0.83	0.51
<b>Melatonin</b>	16.2 ± 2.5	16.5 ± 4.8	17.3 ± 1.5	16.3 ± 2.5	0.72	0.55
<b>F</b>	0.39	0.22	0.09	0.65		
<b>P</b>	0.54	0.64	0.77	0.54		

In Table 4 the results of quantitative analyses of the concentration of the cortisol hormone and SOD enzyme are presented. Environmental enrichment decreased levels of the cortisol hormone. There were no significant changes regarding concentrations of the superoxide dismutase enzyme.

Table 4. Mean serum concentrations of cortisol hormone and superoxide dismutase (SOD) enzyme in monkeys (*Alouatta caraya*) before and during environmental enrichment. Statistical differences were observed using the student's t-test, being considered significant when the p-value was lower than 0.05 (p <0.05).

	Before Enrichment	Environmental Enrichment	Statistical	
			t	p
<b>Cortisol (mcg/dL)</b>	68.3 ± 23.1	46.3 ± 5.8	3.19	0.049
<b>Superoxide Dismutase – SOD (UI)</b>	41.9 ± 19.1	39.7 ± 19.0	1.00	0.99

The success of the creation of primates in captivity depends on management and procedures capable of addressing the behavioral needs of captive animals. In this study, environmental enrichment influenced the physiological and ethological parameters of monkeys (*Alouatta caraya*). The main factors considered in enrichment programs include hygiene, space, complexity, diet, social composition, and involved personnel.

In this work, we verified that behavioral classes present changes in the frequency of execution of category components through environmental enrichment. Furthermore, the classes of maintenance and social interaction were those that were most influenced by environmental enrichment. Environmental enrichment can improve the biological functions of animals in captivity, promoting changes in their environment (Newberry, 1995), increasing lifelong reproductive success, fitness (Grafen, 1991), and improving health.

One way to provide better living conditions for animals in captivity is through environmental enrichment (Hohendorff, 2003). In this study, environmental enrichment led to improvement in the feeding of captive animals.

The postures adopted by monkeys during feeding indicate an attempt to reduce energy costs (Albuquerque et al., 2006). Although animals in captivity do not need to search for food, the division of the diet over different times and locations of the enclosure and boxes of food containing hidden surprises helped stimulate the animals to increase the frequency of the eating behavior.

On the other hand, we observed a decrease in the category rest at bedtime. The literature reports that studies involving primates show the animals' increase in locomotion or activity, an increase in antagonistic behavior, and a decrease in grooming and/or affiliated behaviors (Hosey, 2008). This is the suite of behavioral changes that were first suggested by Chamove et al. (1988) to indicate stressful excitement in animals.

Animals housed in artificial habitats are confronted by a wide range of potentially provocative environmental challenges. Confinement-specific stressors such as restricted movement, reduced retreat space, forced proximity to humans, reduced feeding opportunities, maintenance in abnormal social groups, and other restrictions of behavioral opportunity are considered (Morgan et al., 2006).

Studies about stereotypic behavior and stress are not consistent. This could be since stereotypes are rather heterogeneous (Mason, 1991a, 1991b). However, it is also possible that developing stereotypes are more successful in reducing stress than established ones. Therefore, a profitable approach would be to follow individuals and measure stress before, during, and after the development of stereotypes (Wechsler, 1995).

On the other hand, the literature shows that enrichment techniques positively influence the behavioral repertoire and welfare of captive lion-tailed macaques by decreasing levels of abnormal behaviors and increasing the levels of natural behaviors exhibited (Mallapur et al., 2007).

In the research, the stimulus provided by environmental enrichment, specifically the introduction of females into the enclosure, boosted social interaction between these animals. Furthermore, studies about social interaction in primates showed that groups with a lower proportion of adult females and a more uniform distribution in the number of individuals across matriline exhibited higher social power and lower fragmentation. Thus, by manipulating group composition and matriline configuration of social groups to promote social cohesion and stability, behavioral managers may reduce the level of aggression (MacCovan et al., 2008).

The behaviors of vocalization and mating between the animals increase during environmental enrichment. Thus, vocalizations are an important communication mechanism in the group (Albuquerque et al., 2006) and can be associated with the increased stimuli provided by environmental enrichment.

Ethological indicators are more easily accessible and detect inadequate individual needs in captivity. Some behaviors are particularly disturbed by stress. Social environment, group interactions, quantity, and quality of food present are important mechanisms in the stress-reduction process. They decrease behavioral disorders, reduce mortality and increase reproductive rates (Carlstead et al., 2000). The absence of play in captivity can indicate little stimulation, inadequate

social surroundings, or sickness (Poole, 1991).

According to Shepherdson (1998), environmental enrichment is a principle in animal manipulation that seeks to expand the quality of life of animals in captivity through the identification and provision of the environmental stimuli needed to achieve physiological and psychological welfare, stimulating behaviors typical of the species, reducing stress and making the captive environment more complex and diverse.

Structural aspects of the environment can influence physiological and immunological parameters and animal behavior (Belz, 2003). Captivity is a limiting factor, with some species unable to adapt to life in captivity (Fedullo, 2001).

In this study, it was observed that environmental enrichment did not alter the functional activity of phagocytes, as evidenced by the release of superoxide anion. The phagocytes in monkeys' blood can produce the superoxide anion and showed no change when stimulated by the melatonin hormone. The functions of the melatonin hormone are still only partially understood. It may be linked to phagocytes and has been linked to several cases of the oxidative body (França, 2005). Depending on the dose, melatonin can be an effective anti-oxidative, including the "scavenging" of the radicals derived from oxygen (Finocchiaro, 1991; Osseni et al., 2000). On the other hand, it has been reported that the pro-oxidative action of this hormone is dose-dependent (Ianãs et al., 1991).

Some studies try to explain the possible mechanisms of regulation of free radicals in animals, having been granted a protective effect of the SOD. However, this study did not demonstrate a change in the concentration of the SOD enzyme in the blood of monkeys in captivity. The action of the SOD to reduce free radicals can associate itself with the immune system since there is the involvement of cytokines, in particular the TGF- $\beta$  (Asaba et al., 2007). Also, there are reports in the literature that the action of the melatonin hormone may be influenced by the cortisol hormone (Maestroni, 1986).

The increased levels of cortisol influence the immune response, inhibit the inflammatory response, change T cells' function, and decrease the chemotaxis of leukocytes. In addition, if stress is experienced, cortisol damages tissues, inhibiting growth and bone marrow somatic cells.

Various potential stressors may adversely affect animals living in captivity. These include abiotic, environmental sources of stress such as artificial lighting, loud sound or aversive exposure, arousing odors, and uncomfortable temperatures or substrates.

In this work, environmental enrichment reduced levels of cortisol in the blood of the monkeys. The strength of corticosterone in primates may be a parameter in the validation of welfare in enrichment programs, as primates in captivity often reduce or even eliminate their natural behavior, which leads to the elimination of reproduction and sometimes death (Hohendorff, 2003).

Studies of the behavior of animals in captivity contribute to the welfare of these animals and assist in the formulation of more effective methods for the development of environments and management techniques as well as for reproduction in captivity and reintroducing the animals into the wild (Carlstead et al., 2000).

The provision of a better quality of life for animals in captivity should seek better reproduction rates and animal well-being. The norm for appropriate environmental design should thus be the animal's active role, not economic cost. A successful environment will enhance this role, measured by exploration, play, social interaction, and general liveliness. The related literature does not describe exactly what makes such an environment a good one but indicates when an acceptable standard of welfare has been achieved (Wemelsfelder, 1997)

---

### 3. FINAL CONSIDERATIONS

This research supports the idea that environmental enrichment decreases stressors in captive animals and interferences in behavioral or physiological responses. Practices to improve the environment may be an alternative for adjusted captivity and promote better quality of life and health for these animals.

---

#### 4. REFERENCE

- 1] Albuquerque VJ, Codenotti TL. Etograma de um grupo de bugios-pretos *Alouatta caraya* [Humboldt, 1812] [Primates, Atelidae] em um habitat fragmentado. *Rev. Etologia*. 2006; 8, 97-107.
- 2] Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Fujita T. Double-Edged Action of SOD Mimetic in Diabetic Nephropathy. *J Card. Pharmacol.* 2007; 49, 13-19.
- 3] Auricchio P. *Primatas do Brasil*. Terra Brasilis Comércio de Material Didático e Editora, São Paulo, BR, pp 168.1995.
- 4] Belz EE. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior*. 2003; 76, 481-486.
- 5] Boere V. Environmental enrichment for neotropical primates in captivity: a review. *Ciência Rural*. 2001; 31, 451-460.
- 6] Boinski S, Noon C, Stans S, Samudio R., Sammarco P, Hayes A. The behavioral profile and environmental enrichment of a squirrel monkey colony. *Laborat. Primate Newsletter*. 1994; 33, 1-4.
- 7] Carlstead K, Shepherdson D. Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In: Moberg, G.P.; Mench, J.A. *The Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. [S.1.]: CAB International, 337-354, 2000.
- 8] Cavigelli AS. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-rangig female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Anim. Behaviour*. 1999; 57, 935-944.
- 9] Chamove AS, Hosey J, Schaetzel P. Visitors excite primates in zoos. *Zoo. Anim*. 1988; 7, 359-369.
- 10] CITES, 2007, CITES species database [On line]. Available at: <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>.
- 11] Cullen L Jr., Pádua CV. Métodos para estudos de ecologia, manejo e conservação de primatas na natureza, In: Pádua, C.V., Bodmer, R.E. [Ed], *Manejo e Conservação de Vida Silvestres no Brasil*, Sociedade Civil Mamirauá, Belém. pp. 239-269, 1997.
- 12] Del-Claro K. *Comportamento animal - uma introdução à ecologia comportamental*. Livraria Conceito. São Paulo, pp 132, 2004.
- 13] Endo H, Nito C, Kamada H, Yu F, Chan PH. Reduction in oxidative stress by superoxide dismutase overexpression attenuates acute brain injury after subarachnoid hemorrhage via activation of Akt/glycogen synthase kinase-3beta survival signaling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27, 975-82.
- 14] Fedullo W, Auger R, Channick K, Kerr L, Rubin. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med*. 2002; 22, 561 – 581.
- 15] Finocchiaro LME, Nahmod VE, Launay JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem. J*. 1991; 280, 727.
- 16] França EL. Activation of phagocytes from peripheral human blood by *Paracoccidioides brasiliensis* and enteropathogenic *Escherichia coli*. Production of superoxide anion and modulation by melatonin hormone. *J. Venom. Anim. Toxins. incl. Trop. Dis.* 2005; 11, 615.
- 17] Grafen A. Modelling in behavioural ecology. Chapter 1 of *Behavioural Ecology*, 3rd edition [eds J.R. Krebs & N.B. Davies]. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 5-31, 1991.
- 18] Hohendorff RV. Aplicação e avaliação de enriquecimento ambiental na manutenção de bugio [*Alouatta* spp LACÉPEDE, 1799] no Parque Zoológico de Sapucaia do Sul-RS. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul [in Portuguese with de English abstract], 2003.
- 19] Honorio-França AC, Carvalho MPSM, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM.S. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* [EPEC] opsonized by colostral IgA. *Scand. J. Immunol*. 1997; 46, 59-66.
- 20] Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MMS, Monteiro RC. Colostral neutrophils express IgA Fc receptors [CD89] lacking y chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. *J. Leuk. Biol*. 2001; 69, 289-296.

- 21] Hosey, G.R., Melfi, V.A., Pankhurst, S., 2008. Zoo Animals: their Behaviour, Management and Welfare. Oxford University Press. In press.
- 22] Ianãs O, Olinescu R., Bădescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. Rom. J. Endocrinol. 1991; 29, 174-53.
- 23] Jiménez IT, Speisky HC. Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades: II, mecanismos de defensa antioxidante / Free radicals and antioxidants in disease prevention: II, antioxidant defense mechanisms. Rev. Chil. Nutr. 2000; 27, 210-9.
- 24] Kerl J, Rothe H. Influence of cage size and cage equipment on physiology and behavior of common marmosets [*Callithrix jacchus*]. Lab. Prim. News. 1996; 35, 10-15.
- 25] Ledig MM, Paria JR., Mandel P. Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication. Neurochem Res. 1981; 6, 385-90.
- 26] MacCovan B, Anderson H, Heagarty A, Cameron A. Utility of social network analysis for primates behaviors management and well being. Applid. Anim. Behavior Sci. 2008; 109, 396-405.
- 27] Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effects of corticosterone. J Neuroimmunol. 1986;13, 19-30.
- 28] Mallapur A, Sinha A, Waran NA. World survey of husbandry practices for Lion-tailed macaques macaca silenus in captivity. Internat. Zoo Yearbook. 2007;41, 166-175.
- 29] Mason GJ. Sterotypies: a critical review. Anim. Behav. 1999a;41, 1015-1037.
- 30] Mason WA. Effects of social interaction on well-being: development aspects. Lab. Anim. Sci. 1999b; 41, 323-328.
- 31] Morgan KN, Tromborg CT. Sources of stress in captivity. Applid. Anim. Behavior Sci. 2007; 102, 163-188.
- 32] Newberry RC. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. Applid. Anim. Behavior Sci. 1995; 44, 229-243.
- 33] Novelli EL, Rodríguez NL, França EL, Gebra LMN, Ribas BO. High Dietary Carbohydrate and Pancreatic lesion. Braz. J. Med. Biol. Res. 1993; 26, 31-36.
- 34] Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. Life Sci. 2000; 68, 387-99.
- 35] Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. J. Immunol. Methods. 1981; 130, 1910-17.
- 36] Poole T. Criteria for the provision of captive environments. In: Box, H. Primate responses to environmental change. London: Chapman Hall, 357-374, 1991.
- 37] Porto R, Piratelli A. Etograma da mariapreta, *Molothrus bonariensis* [Gmelin] [Aves, Emberizidae, Icterinae]. Rev. Bras. Zoo. 2005; 22, 306-312.
- 38] Prist P, Pizzutto CS, Hashimoto C. Woven vine balls and baskets as feeding enrichment for howler monkeys. Shape Enrichment. 2005; 14, 1-2.
- 39] Shepherdson DJ. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In Shepherdson, D.J.; Mellen, J.D.; Hutchins, M. Second Nature: environmental enrichment for captive animals. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press. pp 1-12, 1998.
- 40] Wechsler B. Coping and coping strategies: a behavioural view. Appl. Anim. Behav. Sci. 1995; 43, 123-134.
- 41] Wemelsfelder F. Qualitative assessment of social behaviour of dairy cows housed in loose housing systems. Appl. Anim. Behav. Sci. 1997;101, 40 – 53.