

**CENTRO UNIVERSITÁRIO FMABC**

**ANDREA STERMAN HEIMANN**

**DAVI VANTINI**

**FERNANDO LUIZ AFFONSO FONSECA**

**FERNANDO VALENTE**

**JOÃO ROBERTO DE SÁ**

**ROSELI OSELKA SACCARDO SARNI**

**SONIA HIX**

**PROJETO DE PESQUISA:**

**ASSOCIAÇÃO DO CONSUMO ORAL DE WATACAP E O PESO CORPORAL  
EM PESSOAS COM OBESIDADE.**

**SANTO ANDRÉ**

**2024**

**CENTRO UNIVERSITÁRIO FMABC**

**ANDREA STERMAN HEIMANN  
DAVI VANTINI  
FERNANDO LUIZ AFFONSO FONSECA  
FERNANDO VALENTE  
JOÃO ROBERTO DE SÁ  
ROSELI OSELKA SACCARDO SARNI  
SONIA HIX**

**PROJETO DE PESQUISA:  
ASSOCIAÇÃO DO CONSUMO ORAL DE WATACAP E O PESO CORPORAL  
EM PESSOAS COM OBESIDADE.**

**SANTO ANDRÉ  
2024**

## **RESUMO**

O peptídeo ativador de tecido adiposo branco ciclofilina A (WATACAP - Pep19<sup>TM</sup> - número de registro CAS 1536481-46-5) causa perda de gordura corporal em ratos e camundongos. Dado que o WATACAP atua por meio de um sistema de sinalização celular evolutivamente conservado, levantamos a hipótese de que também pode causar perda de gordura corporal em humanos. Este estudo piloto foi projetado para coletar dados humanos preliminares com o objetivo de desenhar um futuro ensaio clínico para testar esta hipótese. Sessenta adultos residentes no estado de São Paulo receberão uma dose noturna (antes de ir dormir) diária fixa, podendo ser de cinco ou duas miligramas de WATACAP formulado em capsulas veganas contendo microesferas de celulose como excipiente, e serão acompanhados por 90 dias.

## **ABSTRACT**

The white adipose tissue activator peptide cyclophilin A (WATACAP - Pep19™ - CAS registration number 1536481-46-5) causes body fat loss in rats and mice. Given that WATACAP acts through an evolutionarily conserved cell signaling system, we hypothesize that it may also cause body fat loss in humans. This pilot study was designed to collect preliminary human data to design a future clinical trial to test this hypothesis. Sixty adults residing in the state of São Paulo will receive a fixed daily nighttime dose (before going to bed), which may be five or two milligrams of WATACAP formulated in vegan capsules containing cellulose microspheres as an excipient, and will be followed for 90 days.

## Sumário

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                          | <b>6</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                          | <b>9</b>  |
| <b>3. RELEVÂNCIA SOCIAL.....</b>                                                                   | <b>10</b> |
| <b>4. LOCAL DE REALIZAÇÃO E POPULAÇÃO A SER ESTUDADA .....</b>                                     | <b>11</b> |
| <b>5. GARANTIAS ÉTICAS AOS PARTICIPANTES DE PESQUISA .....</b>                                     | <b>12</b> |
| <b>6. MÉTODOS.....</b>                                                                             | <b>13</b> |
| <b>6.1 MANUSEIO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO<br/>    ISOTÓPICA DOS PEPTÍDEOS .....</b> | <b>16</b> |
| <b>7. ANÁLISE DE DADOS.....</b>                                                                    | <b>20</b> |
| <b>8. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA.....</b>                      | <b>21</b> |
| <b>9. CIENCIA DA POLÍTICA DE PRIVACIDADE .....</b>                                                 | <b>22</b> |
| <b>10. CRONOGRAMA .....</b>                                                                        | <b>23</b> |
| <b>11. ORÇAMENTO DETALHADO .....</b>                                                               | <b>25</b> |
| <b>12. OBTENÇÃO DO CONSENTIMENTO .....</b>                                                         | <b>26</b> |
| <b>12.1 FORMATO DE REGISTRO .....</b>                                                              | <b>26</b> |
| <b>13. DESCRIÇÃO DE RISCOS E BENEFÍCIOS .....</b>                                                  | <b>27</b> |
| <b>14. CRITÉRIOS PARA ENCERRAMENTO OU SUSPENSÃO DA PESQUISA .....</b>                              | <b>28</b> |
| <b>15. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS.....</b>                                                          | <b>29</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                            | <b>30</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade continua sendo uma epidemia global desafiadora. As estratégias de manejo convencionais, como dieta e exercícios, são frequentemente inconvenientes e geralmente oferecem apenas benefícios de curto prazo; a cirurgia bariátrica, por sua vez, envolve dor e risco (GREGG & SHAW, 2017; HEYMSFIELD & WADDEN, 2012). Da mesma forma, as abordagens farmacológicas para suprimir o apetite, como anfetaminas e antagonistas de canabinóides, apresentam efeitos adversos significativos, incluindo hipertensão, depressão e dependência química. Recentemente, surgiram medicamentos com Semaglutida (DCB) ou semaglutido (DCPt), comercializados sob as marcas Ozempic, Wegovy e Rybelsus. Esses fármacos atuam como agonistas do GLP-1, aumentando a liberação de insulina e diminuindo a liberação de glucagon de maneira dependente da glicose, além de retardar o esvaziamento gástrico. No entanto, essa nova classe de medicamentos causa diversos efeitos colaterais, como náusea, vômito, diarreia, dor abdominal e constipação. Estudos clínicos indicam que cerca de 20% dos indivíduos abandonam os ensaios devido a esses efeitos adversos, e uma parte significativa dos pacientes desenvolve taquifilaxia em relação à perda de peso. (FORNES et al, 2022; MECHOULAM, 2022).

Uma nova abordagem proposta por nossa equipe sugere o uso do peptídeo ativador do tecido adiposo branco da ciclofilina A (WATACAP - Pep19TM). Originalmente descoberto em adipócitos de camundongos, este peptídeo demonstrou eficácia na redução da adiposidade em ratos e camundongos (RECKZIEGEL et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2022).

O peptídeo WATACAP atua, pelo menos em parte, através dos mesmos mecanismos desencadeados pela termogênese sem tremores — uma resposta normal do organismo ao frio que converte gordura branca em marrom, levando à remodelação e perda de gordura. Ao contrário dos fármacos anorexígenos, o WATACAP não apresenta efeitos colaterais relacionados ao sistema nervoso central nem afeta o consumo alimentar. Os efeitos associados ao WATACAP incluem a atenuação da glicemia pós-prandial e a redução dos triglicerídeos séricos, além da melhora na função hepática. Todos esses efeitos podem ser vistos como reversões dos fenótipos associados à resistência à insulina, frequentemente resultantes do consumo excessivo crônico de carboidratos em humanos. Assim, o WATACAP parece aumentar a sensibilidade à insulina e impactar diversos

parâmetros morfométricos e metabólicos ao agir diretamente no tecido adiposo branco (CANNON & NEDERGAARD, 2004; RECKZIEGEL et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2022).

Sugere-se que o WATACAP desencadeie sua ação terapêutica em adipócitos ao atuar como agonista inverso dos receptores canabinóides tipo 1. Este sistema de sinalização é bem conservado ao longo da evolução dos mamíferos e sugere que os possíveis efeitos benéficos do WATACAP também seriam preservados entre as espécies. Especificamente, isso implica que o WATACAP pode reverter certos fenótipos de resistência à insulina observados em outras espécies além de ratos e camundongos, incluindo humanos, cães, gatos e cavalos. Os efeitos farmacológicos do WATACAP na expressão da proteína UCP1 foram investigados em células adiposas 3T3-L1 para avaliar se o Pep19 poderia regular o metabolismo energético conforme descrito para os endocanabinóides (Reckziegel et al., 2017). O modelo celular 3T3-L1 é amplamente utilizado para estudar o metabolismo do tecido adiposo. A rosiglitazona (RSG), usada como controle positivo para a ativação da UCP1, é um agonista do receptor- $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ), um receptor nuclear altamente expresso em tecidos adiposos marrons e brancos que atua como um regulador transcricional mestre na diferenciação dos adipócitos marrons. (CANNON & NEDERGAARD, 2004; MECHOULAM, 2022 RECKZIEGEL et al., 2017; SILVÉRIO et al., 2022).

Os resultados mostram que o WATACAP aumenta a expressão de UCP1 após 24 horas de tratamento nas células 3T3-L1. O antagonista CB1R AM251 inibiu a ativação da UCP1 pelo WATACAP; no entanto, o agonista WIN55,212-2 não teve esse efeito. Observou-se que o WATACAP ativa temporariamente a fosforilação de pERK1/2 e AKT nas células 3T3-L1. Esses dados sugerem que o WATACAP poderia induzir um aumento na expressão da UCP1 através da ativação das vias AKT e pERK1/2, conhecidas por induzirem a expressão do coativador PPAR $\gamma$  1 $\alpha$  (RECKZIEGEL et al., 2017).

Portanto, o WATACAP abre a possibilidade para uma nova estratégia no manejo das condições relacionadas à resistência à insulina, incluindo a obesidade. Em 2022, o WATACAP foi certificado como um ingrediente seguro para alimentos e bebidas destinados ao consumo humano pelo mecanismo denominado Generally Recognized As Safe (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. O WATACAP já está disponível comercialmente na forma de cápsulas sob o nome Nutroslim™.

Para investigar a possibilidade de que o WATACAP possa reverter a obesidade em humanos, propomos realizar um estudo piloto destinado à coleta de dados preliminares que servirão para moldar futuras pesquisas clínicas.

## **2. OBJETIVOS**

Primário: Avaliar a eficácia no emprego de peptídeo ativador de tecido adiposo branco ciclofilina A na redução de peso e diminuição da porcentagem de gordura pela composição corporal.

Secundário: Avaliar o comportamento de marcadores inflamatórios como Interleucina 6, TNF alfa, PCR ultrasensível.

### 3. RELEVÂNCIA SOCIAL

A obesidade é uma epidemia global que afeta milhões de pessoas, trazendo sérias consequências para a saúde e aumentando a carga sobre os sistemas de saúde. As abordagens tradicionais, como dieta e exercícios, frequentemente falham em proporcionar resultados duradouros, enquanto intervenções mais invasivas, como a cirurgia bariátrica, apresentam riscos significativos (GREGG & SHAW, 2017; HEYMSFIELD & WADDEN, 2012). Além disso, medicamentos para controle do apetite têm efeitos colaterais preocupantes que limitam sua eficácia e aceitação.

Nesse contexto, o projeto que investiga o peptídeo WATACAP (Pep19TM) representa uma inovação promissora. Este peptídeo tem mostrado potencial na redução da adiposidade sem os efeitos adversos comuns a outras terapias. Ao atuar na conversão de gordura branca em marrom através da termogênese sem tremores, o WATACAP não apenas promove a perda de peso, mas também melhora parâmetros metabólicos como glicemia e triglicerídeos (CANNON & NEDERGAARD, 2004; RECKZIEGEL et al., 2017).

A certificação do WATACAP como ingrediente seguro pela FDA e sua disponibilidade comercial sob a marca Nutroslim™ destacam sua relevância social. A proposta de um estudo piloto para investigar sua eficácia em humanos é um passo crucial para validar essa abordagem inovadora. Se bem-sucedido, esse projeto pode oferecer uma alternativa viável e segura no combate à obesidade e suas complicações associadas, contribuindo assim para a melhoria da saúde pública e qualidade de vida de milhões.

#### **4. LOCAL DE REALIZAÇÃO E POPULAÇÃO A SER ESTUDADA**

Sessenta pacientes serão selecionados e seguidos no Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Especialidades do Centro Universitário FMABC para a realização de um estudo transversal. Os indivíduos serão incluídos seguindo os seguintes critérios: possuir IMC  $\geq 30,0$  Kg/m<sup>2</sup>, estar entre os 18 anos de idade e com idade máxima e igual a 60 anos, ambos os gêneros e glicose no valor máximo de 125 mg/dL. Serão excluídos os indivíduos portadores de neoplasias, com infecções recentes, hepatopatas crônicos, diagnosticados com depressão e em tratamento, os doentes renais crônicos, cirurgia bariátrica prévia, os que apresentarem qualquer pneumopatia (DPOC), os que apresentarem evento cardíaco recente (nos últimos 06 meses), os que possuem doença reumatológica e outras doenças autoimunes, os etilistas declarados, portadores de demência, os obesos associados à síndromes genéticas, os que possuírem hipotireoidismo descompensado e as mulheres menopausadas.

## **5. GARANTIAS ÉTICAS AOS PARTICIPANTES DE PESQUISA**

Cada sujeito será apresentado e solicitado a assinar um consentimento informado, também submetido ao comitê de ética para aprovação. O protocolo será publicado em <https://clinicaltrials.gov>.

Os registros de participação neste estudo serão mantidos confidenciais, exceto quando o compartilhamento das informações for exigido por lei ou conforme descrito neste consentimento informado. O investigador, o patrocinador ou pessoas que trabalham em nome do patrocinador e, sob certas circunstâncias, a ANVISA e o Conselho de Revisão Institucional poderão inspecionar e copiar registros confidenciais relacionados ao estudo que identificá-lo pelo nome. Isto significa que a confidencialidade absoluta não pode ser garantida. Caso os resultados deste estudo sejam publicados ou apresentados em reuniões, os sujeitos não serão identificados. Uma descrição deste ensaio clínico estará disponível em <https://clinicaltrials.gov>. Este site não incluirá informações que possam identificá-lo. No máximo, o site incluirá um resumo dos resultados. Você pode pesquisar este site a qualquer momento.

## 6. MÉTODOS

Sessenta pacientes serão selecionados e seguidos no Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Especialidades do Centro Universitário FMABC para a realização de um estudo transversal. Os indivíduos serão incluídos seguindo os seguintes critérios: possuir IMC  $\geq 30,0$  Kg/m<sup>2</sup>, estar entre os 18 anos de idade e com idade máxima e igual a 60 anos, ambos os gêneros e glicose no valor máximo de 125 mg/dL. Serão excluídos os indivíduos portadores de neoplasias, com infecções recentes, hepatopatas crônicos, diagnosticados com depressão e em tratamento, os doentes renais crônicos, cirurgia bariátrica prévia, os que apresentarem qualquer pneumopatia (DPOC), os que apresentarem evento cardíaco recente (nos últimos 06 meses), os que possuem doença reumatológica e outras doenças autoimunes, os etilistas declarados, portadores de demência, os obesos associados à síndromes genéticas, os que possuírem hipotireoidismo descompensado e as mulheres menopausadas.

Os pacientes selecionados serão tratados conforme esquema:

|                                                 | <i>qualificação</i> | <i>0</i> | <i>30</i> | <i>60</i> | <i>90</i> |
|-------------------------------------------------|---------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>idade</i>                                    | x                   |          |           |           |           |
| <i>altura</i>                                   | x                   |          |           |           |           |
| <i>peso</i>                                     | x                   | x        | x         | x         | x         |
| <i>Gravides*</i>                                | x                   | x        | x         | x         | x         |
| <i>* com teste de urina</i>                     |                     |          |           |           |           |
| <b><u>Histórico</u></b>                         |                     |          |           |           |           |
| <i>revisão de sistemas</i>                      |                     | x        |           |           |           |
| <i>medicamentos</i>                             |                     | x        |           |           |           |
| <i>Histórico de tabagismo e drogas ilícitas</i> |                     | x        |           |           |           |
| <i>Histórico cirúrgico</i>                      |                     | x        |           |           |           |
| <b><u>questionário</u></b>                      |                     |          |           |           |           |
| <i>PSQI</i>                                     |                     | x        | x         | x         | x         |
| <i>Recordatório</i>                             |                     | x        | x         | x         | x         |
| <i>Alimentar</i>                                |                     |          |           |           |           |
| <b><u>Exames físicos</u></b>                    |                     |          |           |           |           |

|                                      |   |   |   |   |
|--------------------------------------|---|---|---|---|
| <i>temperatura</i>                   | X | X | X | X |
| <i>Pressão</i>                       | X | X | X | X |
| <i>Batimento cardíaco</i>            | X | X | X | X |
| <i>Medida da cintura</i>             | X | X | X | X |
| <i>Medida do quadril</i>             | X | X | X | X |
| <i>Medida do peito</i>               | X | X | X | X |
| <b><u>Exames laboratoriais</u></b>   |   |   |   |   |
| <i>hemograma completo</i>            | X | X | X | X |
| <i>Triglicerídeos</i>                | X | X | X | X |
| <i>colesterol total e as frações</i> |   |   |   |   |
| <i>ALT, AST, gamaGT</i>              | X | X | X | X |
| <i>C-reactive protein (PCRus)</i>    | X | X | X | X |
| <i>IL6</i>                           | X | X | X | X |
| <i>TNF alfa</i>                      | X | X | X | X |
| <i>glicose</i>                       | X | X | X | X |
| <i>insulina</i>                      | X | X | X | X |
| <i>HgBA1c</i>                        | X | X | X | X |
| <i>ácido úrico</i>                   | X | X | X | X |
| <i>uréia</i>                         | X | X | X | X |
| <i>creatinina</i>                    | X | X | X | X |
| <i>TSH</i>                           | X | X | X | X |
| <i>T4 livre</i>                      | X | X | X | X |
| <i>βHCG qualitativo</i>              | X | X | X | X |
| <b><u>Exames por imagem</u></b>      |   |   |   |   |
| <i>DEXA</i>                          | X |   |   | X |

As avaliações laboratoriais a serem realizadas serão hemograma completo, proteína c reativa ultrasensível (PCRus), colesterol total e as frações, triglicerídeos, AST, ALT, gama-glutamil-transferase, ácido úrico, uréia, creatinina, TSH, T4 livre, βHCG qualitativo para as mulheres, glicose, insulina e HbA1c (Hemoglobina glicada). Também

serão realizadas as seguintes avaliações ultrassonografia e densitometria por dupla emissão de raios X (DXA).

Os seguintes métodos serão realizados para as determinações supracitadas:

| Avaliações                           | Método                     | Amostra      |
|--------------------------------------|----------------------------|--------------|
| Hemograma completo                   | Citometria de fluxo        | Sangue total |
| PCRus                                | Turbidimetria              | soro         |
| CTF                                  | Enzimático – colorimétrico | soro         |
| Tg                                   | Enzimático-colorimétrico   | soro         |
| AST/ALT/ $\delta$ gt                 | Enzimático                 | soro         |
| Ác úrico, uréia, creatinina, glicose | Enzimático-colorimétrico   | soro         |
| TSH/T4livre/insulina/ $\beta$ HCG    | Eletroquimioluminescencia  | soro         |
| HbA1c                                | Eletroforese capilar       | Sangue total |

As avaliações laboratoriais seguirão as boas práticas em análises clínicas e serão realizadas no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina do ABC.

A ultrasonografia e densitometria por dupla emissão de raios X (DXA) serão realizadas conforme protocolo radiológico na Casa da Esperança, Santo André, SP.

Em todos os encontros, será aplicado o Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI), um instrumento validado cientificamente para avaliar a qualidade do sono. O PSQI é um questionário de auto-relato que mede diversos aspectos do sono, incluindo a duração, a latência, a eficiência habitual, as perturbações do sono, o uso de medicação para dormir e a disfunção diurna. Este questionário é amplamente utilizado tanto em contextos clínicos quanto em pesquisas para discriminar entre bons e maus dormidores, fornecendo uma pontuação global que varia de 0 a 21, onde pontuações mais altas indicam pior qualidade do sono.

Além disso, será realizado o recordatório alimentar de 24 horas, uma ferramenta metodológica utilizada para obter uma estimativa detalhada do padrão alimentar dos participantes. Este método envolve a coleta de informações sobre todos os alimentos e bebidas consumidos nas últimas 24 horas, permitindo uma análise precisa dos hábitos alimentares, ingestão calórica e distribuição de macronutrientes. A combinação dessas avaliações fornecerá uma visão abrangente das interações entre a qualidade do sono e os padrões alimentares dos indivíduos estudados.

Os participantes consentirão de acordo com o formulário enviado ao comitê de ética. Este estudo irá randomizar **60** indivíduos para uma dose diária de 5 mg, 2 mg de Pep19 ou placebo em uma proporção de 1: 1: 1 em um ensaio clínico duplo-cego de 90 dias, controlado por placebo. Pep19 será formulado como suplemento alimentar em cápsulas vegetais com excipiente celulose microcristalina nas seguintes proporções:

|                   | <b><u>placebo</u></b> | <b><u>2mg</u></b> | <b><u>5mg</u></b> |
|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Pep19</b>      | 0%                    | 1%                | 2%                |
| <b>Excipiente</b> | 74%                   | 73%               | 72%               |
| <b>Capsulas</b>   | 26%                   | 26%               | 26%               |

## **6.1 MANUSEIO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO ISOTÓPICA DOS PEPTÍDEOS**

O plasma será separado por centrifugação do sangue coletado da veia braquial, em tubos contendo anticoagulante (ácido etileno-diamino tetra acético (EDTA), fracionados em porções de 0,5 mL, e mantidas a -80°C até o uso. Amostras de plasma serão transferidas para tubos de baixa ligação proteica e um volume igual de solução salina tamponada com fosfato de sódio e potássio (PBS) contendo Tween 20 a 0,05%, pH 7,2 (tampão de amostra) mais dois volumes de acetonitrila (para atingir 66% de acetonitrila ao volume final de extração da amostra), serão adicionados aos tubos. Após agitação em vórtice, as amostras serão incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos (min) e centrifugadas a 12.000 x g por 5 min a 4°C. Das urinas colhidas, 2 mL serão centrifugados a 12.000 x g por 5 min a 4°C, e o sobrenadante seguirá os passos abaixo, juntamente com as amostras de peptídeos de plasma semi-purificados descrito acima.

O sobrenadante será transferido para um tubo limpo de baixa ligação de proteína e o volume será reduzido em uma centrífuga a vácuo de alta velocidade (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 3 horas (h) a 30°C. O pellet semi-seco será ressuspensão em 1,5 mL de água ultrapura, acidificado a pH 2 com HCl 0,1 M (concentração final de 10 mM; Millipore, Burlington, MA, EUA) e transferido para unidades centrífugas Amicon Ultra-4 com ponto de corte de 10.000 Da. (Millipore, Burlington, MA, EUA). Após centrifugação a 1.500 x g, a 4°C, por aproximadamente 1 h, o pH do fluxo (contendo peptídeos de massa molecular < 10.000 Da) será ajustado para 2-4 com ácido fórmico a 50% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). Estes peptídeos serão passados através de cartuchos de extração Oasis HLB 1cc (30 mg) (Waters, Etten-Leur, NB, NL) previamente

equilibrados com 100% de acetonitrila/0,10% de ácido fórmico (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e depois com 5% de acetonitrila/0,10% de ácido fórmico em água ultrapura. Após lavagem com acetonitrila a 5%/ácido fórmico a 0,10%, os peptídeos serão eluídos em acetonitrila a 100%/ácido fórmico a 0,15%, coletados em tubos de microcentrífuga de baixa retenção Fisherbrand™ (Waltham, MA, EUA), e secos em centrífuga a vácuo rápida (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Uma alíquota de peptídeos será ressuspensa em água ultrapura (100 µL) e quantificada por absorbância de 214 nm (NanoDrop™, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), utilizando uma mistura de peptídeos de composição e concentração conhecidas como referência padrão para determinação da concentração de peptídeos (curva padrão).

As amostras de peptídeos serão marcadas usando marcação isotópica com dimetil. O método de marcação empregado baseia-se na dimetilação de grupos amina e formaldeído na presença de cianoborohidreto. A combinação de formaldeído regular, deuterado e  $^{13}\text{C}$  com cianoborohidreto regular e deuterado nos permitirá usar quatro formas isotópicas à medida que as reações adicionam 28, 30, 32 ou 36 Da à massa final dos peptídeos em cada aminoácido de marcação disponível (lisinas ou N-terminal). Resumidamente, 10 µg de extrato peptídico purificado será diluído em 100 µL de tampão de bicarbonato de trietilamônio (TEAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) até uma concentração final de 100 mM. Serão então adicionados 4 µL das diferentes formas isotópicas dos formaldeídos na concentração de 4%, conforme esquema de rotulagem desejado. Em seguida, serão adicionados 4 µL de cianoborohidreto de sódio redutor 0,6 M ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) e as amostras serão incubadas por 16 horas em temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação será então extinta com 16 µL de bicarbonato de amônio a 1%. As amostras serão colocadas em gelo e 8 µL de  $\text{CH}_2\text{O}_2$  (ácido fórmico; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) serão adicionados. Quatro amostras marcadas diferencialmente serão reunidas, dessalinizadas usando cartuchos de extração Oasis HLB 1cc (30 mg) (Waters, Etten-Leur, NB, NL) e eluídas com 100% de acetonitrila contendo 0,15% de ácido fórmico. As amostras serão secas em centrífuga a vácuo e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até o uso.

A quantidade de 0,2 µg de peptídeos diluídos em 5 µL de acetonitrila 100% contendo ácido fórmico 0,15% será injetada para todas as análises de espectrometria de massa. As formas isotópicas acrescidas de 28, 30, 32 ou 36 Da, serão alternadas para garantir que amostras de voluntários com diferentes perfis recebam todos os distintos marcadores.

Análises por espectrometria de massas. As análises de peptidoma por espectrometria de massa serão realizadas em um espectrômetro de massas com spray de elétrons acoplado à cromatografia nanolíquida de alta eficiência ((nLC\_ESI\_MS/MS). Por exemplo, a identificação das sequências peptídicas poderá ser realizada num espectrometro do tipo Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) através de uma fonte de ions nano-electrospray. A separação dos peptídeos será realizada em coluna de 360 µm DE x 150 mm, com 3 µm C-18 contas (Dr. Maisch, 72119 Ammerbuch-Entringen, Alemanha). Os peptídeos serão eluídos utilizando um gradiente linear de 5-40% de acetonitrila, em ácido fórmico a 0,1%, durante 120 min a um fluxo de 250 nL/min. Os dados serão adquiridos após a geração de múltiplos peptídeos protonados pelo ESI (ionização por eletrospray), de acordo com as seguintes condições. Tempo de execução, 120 min, polaridade positiva, estado de carga padrão 2, MS completo, resolução 120.000, padrão alvo AGC, TI máximo 50 ms, faixa de varredura de 300 a 1.500 m/z. Alvo AGC de resolução Dd-MS2 de 30.000: padrão, IT máximo 54 ms, ciclo de trabalho de 2 s, janela de isolamento 1,6 m/z, (N)CE 30. Limite de intensidade para MS2 2.0e4, exclusão de carga 1 e >7, correspondência de peptídeo preferido, excluir isótopos ativado, tempo de exclusão dinâmica 60,0 s. O processamento e as análises dos dados serão realizados internamente usando o XCalibur e o conjunto de software Mascot (motor de busca).

Assim, para realizar análises de dados, os arquivos de dados brutos serão convertidos em formato de lista de picos (mgf) pelo Mascot Daemon (v.2.3 Matrix Science Ltd, Londres, Reino Unido, mecanismo de busca v.2.8). Antes de prosseguir com a busca por peptídeos, será utilizado um procedimento de filtragem utilizando a biblioteca R MSnbase (v.2.24.2)<sup>79</sup> para remover picos contendo a massa de contaminantes presentes no Banco de Dados de Contaminantes de Espectrometria de Massas. Essa etapa será importante porque, apesar de todos os cuidados para trabalhar com amostras da mais alta qualidade possível, alguns contaminantes, como veículos de medicamentos, ainda serão identificados na espectrometria de massas: quando o pico de um desses contaminantes coincide com o tempo de massa esperado para um peptídeo marcado, o algoritmo Mascot irá considerá-lo como o peptídeo, conseqüentemente, a quantificação posterior da razão entre os peptídeos marcados será influenciada;

Após a remoção dos espectros contaminantes, os processos de análise dos dados continuarão com a busca de peptídeos utilizando o mecanismo de busca Mascot. Nenhum local de clivagem será especificado e uma tolerância de massa de íons de fragmento de

$\pm 0,5$  Da será aplicada aos íons MS e MS/MS. Os parâmetros de pesquisa não incluirão digestão enzimática; tolerância de massa do precursor definida para  $\pm 0,5$  Da; nenhuma modificação incluída. Os peptídeos identificados serão filtrados para manter apenas aqueles em que a razão entre o número de íons correspondentes ao peptídeo, e o número de resíduos peptídicos menos um, seja superior a 0,4.

Quantificações e análises estatísticas, níveis relativos de peptídeos. Na espectrometria de massas com marcação isotópica, o valor da proporção de peptídeos entre os grupos é indicativo de seu aumento ou diminuição. Avaliamos se as proporções peptídicas nos grupos de voluntários devidamente agrupados, para que sejam significativamente diferentes do efeito nulo de 1, usando o teste de classificação sinalizada de Wilcoxon de uma amostra. Todas as análises serão realizadas utilizando R (v.4.1). Valores de  $p \leq 0,05$  serão significativamente diferentes.

Análise de enriquecimento de PIN e SLiMs. A identificação de sub-redes ativas em um PIN e as subsequentes análises de enriquecimento serão realizadas usando a biblioteca R pathfindR (v.1.6.4), com os genes que codificam as proteínas precursoras de peptídeos regulados diferencialmente como entrada. Biogrid será selecionado como PIN de referência e KEGG como conjunto de genes de referência. Apenas caminhos com pelo menos dois genes envolvidos serão mantidos. SLiMs de peptídeos regulados diferencialmente serão identificados usando a ferramenta de predição de motivo linear eucariótico (ELM). Apenas SLiMs com instâncias anotadas de Homo sapiens de classes de acoplamento ou ligante serão incluídos para análises posteriores. O enriquecimento de SLiMs selecionados através deste processo será avaliado calculando seu enriquecimento ORA por termo KEGG, usando o teste hipergeométrico de Fisher. O conjunto de referência para essas análises será o banco de dados ELM26 de SLiMs para termos KEGG do Homo sapiens. Um valor de  $p \leq 0,05$  será considerado significativo. A razão de chances será assumida como enriquecimento de vezes.

Alinhamentos de múltiplas sequências. Alinhamentos de peptídeos contendo SLiMs de arginina-glicina-aspartato (RGD) e leucina-ácido aspártico-serina (LDS) serão realizados usando a interface msa para o algoritmo ClustalW. As proporções de peptídeos RGD e LDS serão avaliadas usando o One-Sample Wilcoxon Teste de classificação assinada. Todas as análises serão realizadas utilizando R (v.4.1). Valores de  $p \leq 0,05$  serão significativamente diferentes.

Os peptídeos que despertarem interesse acadêmico e para inovação, serão posteriormente caracterizados.

## **7. ANÁLISE DE DADOS**

Este é um estudo piloto e não foi realizada análise de poder. Se o estudo não der significância estatística, os dados piloto serão usados para uma análise de poder para planejar um estudo que tenha participantes suficientes. A análise dos dados normalmente distribuídos será feita pelo teste ANOVA unidirecional. Os dados categóricos serão analisados pelo teste Qui-Quadrado ou outro teste estatístico apropriado. Os dados do estudo também serão analisados descritivamente.

## **8. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA**

Sessenta pacientes serão selecionados e seguidos no Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Especialidades do Centro Universitário FMABC para a realização de um estudo transversal. Os indivíduos serão incluídos seguindo os seguintes critérios: possuir IMC  $\geq 30,0$  Kg/m<sup>2</sup>, estar entre os 18 anos de idade e com idade máxima e igual a 60 anos, ambos os gêneros e glicose no valor máximo de 125 mg/dL. Serão excluídos os indivíduos portadores de neoplasias, com infecções recentes, hepatopatas crônicos, diagnosticados com depressão e em tratamento, os doentes renais crônicos, cirurgia bariátrica prévia, os que apresentarem qualquer pneumopatia (DPOC), os que apresentarem evento cardíaco recente (nos últimos 06 meses), os que possuem doença reumatológica e outras doenças autoimunes, os etilistas declarados, portadores de demência, os obesos associados à síndromes genéticas, os que possuírem hipotireoidismo descompensado e as mulheres menopausadas.

## 9. CIENCIA DA POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os registros de participação neste estudo serão mantidos confidenciais, exceto quando o compartilhamento das informações for exigido por lei ou conforme descrito neste consentimento informado. O investigador, o patrocinador ou pessoas que trabalham em nome do patrocinador e, sob certas circunstâncias, a ANVISA e o Conselho de Revisão Institucional poderão inspecionar e copiar registros confidenciais relacionados ao estudo que identificá-lo pelo nome. Isto significa que a confidencialidade absoluta não pode ser garantida. Caso os resultados deste estudo sejam publicados ou apresentados em reuniões, os sujeitos não serão identificados. Uma descrição deste ensaio clínico estará disponível em <https://clinicaltrials.gov>. Este site não incluirá informações que possam identificá-lo. No máximo, o site incluirá um resumo dos resultados. Você pode pesquisar este site a qualquer momento.

## 10. CRONOGRAMA

|                                    | <i>qualificação</i> | <i>0</i> | <i>30</i> | <i>60</i> | <i>90</i> |
|------------------------------------|---------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>idade</i>                       | X                   |          |           |           |           |
| <i>altura</i>                      | X                   |          |           |           |           |
| <i>peso</i>                        | X                   | X        | X         | X         | X         |
| <i>Gravides*</i>                   | X                   | X        | X         | X         | X         |
| <i>* com teste de urina</i>        |                     |          |           |           |           |
| <b><u>Histórico</u></b>            |                     |          |           |           |           |
| <i>revisão de sistemas</i>         |                     | X        |           |           |           |
| <i>medicamentos</i>                |                     | X        |           |           |           |
| <i>Histórico de</i>                |                     | X        |           |           |           |
| <i>tabagismo e drogas</i>          |                     |          |           |           |           |
| <i>ilícitas</i>                    |                     |          |           |           |           |
| <i>Histórico cirúrgico</i>         |                     | X        |           |           |           |
|                                    |                     |          |           |           |           |
| <b><u>questionário</u></b>         |                     |          |           |           |           |
| <i>PSQI</i>                        |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Recordatório</i>                |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Alimentar</i>                   |                     |          |           |           |           |
| <b><u>Exames físicos</u></b>       |                     |          |           |           |           |
| <i>temperatura</i>                 |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Pressão</i>                     |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Batimento cardíaco</i>          |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Medida da cintura</i>           |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Medida do quadril</i>           |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Medida do peito</i>             |                     | X        | X         | X         | X         |
|                                    |                     |          |           |           |           |
| <b><u>Exames laboratoriais</u></b> |                     |          |           |           |           |
| <i>hemograma completo</i>          |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>Triglicerídeos</i>              |                     | X        | X         | X         | X         |
| <i>colesterol total e as</i>       |                     |          |           |           |           |
| <i>frações</i>                     |                     |          |           |           |           |

|                                 |   |   |   |   |
|---------------------------------|---|---|---|---|
| <i>ALT, AST, gamaGT</i>         | X | X | X | X |
| <i>C-reactive protein</i>       | X | X | X | X |
| <i>(PCRus)</i>                  |   |   |   |   |
| <i>IL6</i>                      | X | X | X | X |
| <i>TNF alfa</i>                 | X | X | X | X |
| <i>glicose</i>                  | X | X | X | X |
| <i>insulina</i>                 | X | X | X | X |
| <i>HgBA1c</i>                   | X | X | X | X |
| <i>ácido úrico</i>              | X | X | X | X |
| <i>uréia</i>                    | X | X | X | X |
| <i>creatinina</i>               | X | X | X | X |
| <i>TSH</i>                      | X | X | X | X |
| <i>T4 livre</i>                 | X | X | X | X |
| <i>βHCG qualitativo</i>         | X | X | X | X |
|                                 |   |   |   |   |
| <b><u>Exames por imagem</u></b> |   |   |   |   |
| <i>DEXA</i>                     | X |   |   | X |

## 11. ORÇAMENTO DETALHADO

| <b>Materiais</b>                                                                                                                                                                                                                                            | <b>VALOR<br/>TOTAL (R\$)</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Exames Laboratoriais. (hemograma completo, Triglicerídeos, colesterol total e as frações, ALT, AST, gamaGT, C-reactive protein (PCRus), IL6, TNF, alfa glicose, insulina, HgBA1c, ácido úrico, uréia, creatinina, TSH, T4 livre e $\beta$ HCG qualitativo). | 2000,00                      |
| Exame de imagem (DEXA)                                                                                                                                                                                                                                      | 1000,00                      |
| Ultrasonografia                                                                                                                                                                                                                                             | 1000,00                      |
| Insumos (materiais de escritório)                                                                                                                                                                                                                           | 100,00                       |
| <b>TOTAL</b>                                                                                                                                                                                                                                                | <b>4.100,00</b>              |

60 pacientes x 4100,00 reais = 346000,00 reais (total).

O suplemento será disponibilizado de forma gratuita pela empresa Proteinmax.

## **12. OBTENÇÃO DO CONSENTIMENTO**

Durante a triagem no Ambulatório de Endocrinologia do Centro de Especialidades do Centro Universitário FMABC, cada sujeito será apresentado e solicitado a assinar um consentimento informado, também submetido ao comitê de ética para aprovação. O protocolo será publicado em <https://clinicaltrials.gov>.

### **12.1 FORMATO DE REGISTRO**

Assinatura ao final do documento aprovado pelo comitê de ética (2 vias) e rubricas em todas as folhas.

### **13. DESCRIÇÃO DE RISCOS E BENEFÍCIOS**

Durante a pesquisa, os riscos físicos envolvidos incluem a coleta de sangue, que pode causar um leve desconforto, dor, hematoma ou, raramente, uma infecção no local da punção. Os exames de ultrassonografia e densitometria são não invasivos e geralmente seguros.

Os riscos psicológicos podem incluir desconforto ou ansiedade ao responder a questionários ou ao participar de procedimentos médicos. É importante lembrar que sua participação é voluntária e você pode desistir a qualquer momento.

Todas as etapas da pesquisa seguirão estritamente as normas éticas estabelecidas pelo comitê de ética em pesquisa, garantindo o respeito à sua privacidade e segurança ao longo do estudo.

Um dos principais benefícios da participação nesta pesquisa é a oportunidade de acessar um tratamento inovador que pode ajudar na perda de peso e melhorar vários parâmetros de saúde, como níveis de glicose e triglicerídeos, sem os efeitos colaterais comuns das terapias atuais. Além disso, você contribuirá para o avanço da ciência, ajudando a validar uma abordagem que pode beneficiar muitas outras pessoas no futuro. A pesquisa pode proporcionar uma melhoria na sua qualidade de vida e oferecer alternativas eficazes e seguras no combate à obesidade.

## **14. CRITÉRIOS PARA ENCERRAMENTO OU SUSPENSÃO DA PESQUISA**

O investigador principal monitorará e coletará relatórios de quaisquer efeitos adversos. O estudo será encerrado prematuramente se recebermos relatos de efeitos nocivos. Pode ser encerrado pelo investigador principal ou pelo patrocinador. O estudo será disponibilizado para monitoramento, auditoria, revisão do comitê de ética e inspeção regulatória, fornecendo acesso direto aos dados de origem relacionados ao estudo.

## **15. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS**

Ao término do experimento, os resultados obtidos serão minuciosamente analisados e apresentados aos participantes em uma sessão de feedback detalhada. Além disso, os achados serão submetidos para publicação em periódicos científicos de alto impacto, garantindo a disseminação do conhecimento gerado para a comunidade acadêmica e profissional. A publicação incluirá uma discussão abrangente sobre a metodologia empregada, os dados coletados, as análises estatísticas realizadas, bem como as implicações dos resultados no campo de estudo. Este processo visa não apenas compartilhar os insights obtidos, mas também contribuir para o avanço da ciência e promover futuras pesquisas na área.

## REFERÊNCIAS

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *\*Physiological Reviews\**, v. 84, p. 277-359, 2004.

FORNES, A.; HUFF, J.; PRITCHARD, R.; GODFREY, M. Once-weekly semaglutide for weight management: a clinical review. *\*Journal of Pharmacy Technology\**, v. 38, p. 239-246, 2022. DOI: 10.1177/87551225221092681.

GREGG, E.; SHAW, J. Global health effects of overweight and obesity. *\*The New England Journal of Medicine\**, v. 377, n. 1, p. 80-81, 2017. DOI: 10.1056/NEJMe1706095.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *\*The New England Journal of Medicine\**, v. 376, p. 254-266, 2017. DOI: 10.1056/NEJMra1514009.

MECHOULAM, R. A delightful trip along the pathway of cannabinoid and endocannabinoid chemistry and pharmacology. *\*Annual Review of Pharmacology and Toxicology\**, 2022. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-051921-083709.

RECKZIEGEL, P.; FESTUCCIA, W. T.; BRITTO, L. R. G.; JANG, K. L. L.; ROMAO, C. M.; HEIMANN, J. C.; FOGACA, M. V.; RODRIGUES, N. S.; SILVA, N. R.; GUIMARAES, F. S., et al. A novel peptide that improves metabolic parameters without adverse central nervous system effects. *\*Scientific Reports\**, v. 7, p. 14781, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13690-9.

SILVÉRIO, R.; BARTH, R.; HEIMANN, A. S.; RECKZIEGEL, P.; DOS SANTOS, G. J.; ROMERO-ZERBO, S. Y.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J.; RAFACHO, A.; FERRO, E. S. Pep19 has a positive effect on insulin sensitivity and ameliorates both hepatic and adipose tissue phenotype of diet-induced obese mice. *\*International Journal of Molecular Sciences\**, v. 23, 2022. DOI: 10.3390/ijms23084082.