

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

ALMIR DE SOUSA MARTINS
ANA LÍGIA BARBOSA MESSIAS
DEBORAH RIBEIRO NASCIMENTO
DURVAL BATISTA PALHARES
LORENA FALCÃO LIMA
MARILENE GARCIA PALHARES
PAULA CRISTHINA XAVIER
SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC

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

**NOVEMBRO DE 2020
CAMPO GRANDE – MS**

RESUMO

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença genética rara, caracterizada por grave ossificação heterotópica. Sem tratamento curativo, importa ampliar o conhecimento de aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares relacionados aos efeitos do ácido ascórbico associado ao propranolol (FOPCON), sobre vias de sinalização possivelmente envolvidas na fisiopatologia da doença. Propõe-se o acompanhamento longitudinal de um amplo grupo de indivíduos ($n = 40$) em uso contínuo de FOPCON para observação de efeitos clínicos benéficos e/ou adversos. A fim de potencializar tais efeitos, propõe-se a análise experimental dos efeitos da hesperidina e da epigallocatequina, quando administrados entre as doses habituais de FOPCON, na forma de novos compostos: ácido ascórbico + hesperidina (AA+HSP) e ácido ascórbico + epigallocatequina (AA+Epi). A pesquisa será desenvolvida com 5 grupos de indivíduos: (1) oito voluntários sadios; (2) oito indivíduos com FOP sem tratamento; (3) oito indivíduos com FOP em tratamento com FOPCON; (4) oito indivíduos com FOP em tratamento com FOPCON e AA+HSP; e (5) oito indivíduos com FOP em tratamento com FOPCON e AA+Epi. Os aspectos clínicos serão observados e registrados por meio de questionário e exames físico e laboratorial. Aspectos bioquímicos e moleculares relacionados à inflamação, fibrose e ossificação, serão analisados em laboratório, em modelos *in vivo* e *in vitro*, a partir de amostras individuais de sangue e de raspado de mucosa oral. Para análise estatística dos resultados será utilizado o método CT comparativo e aplicados Teste t-Student não pareado e ANOVA ($p < 0,05$). Para análise dos dados antropométricos e clínicos serão utilizados testes não-paramétricos de comparação (Teste Mann-Whitney) e associação (Teste Exato de Fisher e Teste Qui-quadrado). Este projeto, além de incrementar a história natural da FOP e o entendimento de sua fisiopatologia, explicará parte dos efeitos de FOPCON e, com foco inovador, os efeitos da hesperidina e da epigallocatequina no processo inflamatório e osteogênese, possivelmente ampliando sua utilização em outras desordens que envolvam ossificação heterotópica.

Palavras-chave: Ossificação heterotópica; Osteogênese; Inflamação; Fibrose; Ácido ascórbico; Propranolol; Hesperidina; Epigallocatequina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	HIPÓTESE.....	10
3	JUSTIFICATIVA	11
4	OBJETIVOS	12
4.1	Objetivo geral.....	12
4.2	Objetivos específicos.....	12
5	METODOLOGIA.....	13
5.1	Tipo da pesquisa	13
5.2	Sujeitos e amostras.....	13
5.2.1	CrITÉRIOS de inclusão e exclusão	14
5.3	Procedimentos de coleta	14
5.3.1	Coleta de dados clÍnicos e sociodemogrÁficos	14
5.3.2	Coleta de sangue perifÉrico	15
5.3.3	Coleta de raspado de mucosa oral	16
5.4	Tratamentos dos grupos	17
5.4.1	Tratamento com FOPCON (Grupo 3).....	17
5.4.2	Tratamento com FOPCON e AA+HSP (Grupo 4).....	17
5.4.3	Tratamento com FOPCON e AA+EPI (Grupo 5)	18
5.5	Preparo dos medicamentos	18
5.6	Modelo de experimento <i>in vitro</i>	18
5.6.1	Obtenção de células mononucleares de sangue perifÉrico (PBMC)	18
5.6.2	Cultivo celular	19
5.6.3	Tratamento das células	19
5.6.4	Avaliação da viabilidade celular	20
5.6.5	Estudo da expressão de RNA mensageiros.....	20
5.6.5.1	<u>Extração do RNA total e tratamento com DNase</u>	20
5.6.5.2	<u>OligonucleotÍdeos iniciadores</u>	21
5.6.5.3	<u>Transcrição reversa (RT)</u>	21
5.6.5.4	<u>PCR em tempo real (qPCR)</u>	21
5.7	Modelo de experimento <i>in vivo</i>	22
5.7.1	Extração do RNA total e tratamento com DNase	22
5.7.2	OligonucleotÍdeos iniciadores.....	22

5.7.3	Transcrição reversa (RT).....	23
5.7.4	Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	23
5.8	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	24
5.9	Análise estatística	24
5.10	Aspectos éticos	24
5.10.1	Benefícios	25
5.10.2	Riscos	25
6	ORÇAMENTO	27
6.1	Orçamento referente à emenda	28
7	CRONOGRAMA	29
8	VIABILIDADE	30
	REFERÊNCIAS.....	31
	APÊNDICES	36

1 INTRODUÇÃO

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença genética autossômica dominante ultrarrara (1:2 milhões de indivíduos), caracterizada por extensa e progressiva formação de osso heterotópico, isto é, osso novo e verdadeiro em local onde normalmente não deveria ser formado. Habitualmente, a doença se manifesta ainda na primeira infância e confere incapacidade cumulativa a cada surto inflamatório (*flare-up*), de modo que o diagnóstico tardio ou manejo terapêutico inadequado podem, precocemente, restringir o portador de FOP à cadeira de rodas ou ao leito (KITTERMAN *et al.*, 2005; PIGNOLO; SHORE; KAPLAN, 2011).

Trata-se de uma doença de etiologia complexa cujo acometimento físico devastador pode ser acompanhado por importante prejuízo emocional e social do paciente e de sua família. Visando-se ao prolongamento de sua vida com qualidade, é necessário um cuidado multidisciplinar do portador de FOP. Com essa visão, esta proposta enquadra-se como prosseguimento e ampliação de pesquisas previamente realizadas por um grupo de pesquisadores, formado por profissionais de diferentes disciplinas e especialidades: Biologia Molecular, Medicina (pediatria e genética), Odontologia, Farmácia e Bioquímica, Fisioterapia e Enfermagem.

Mencionada pela primeira vez em 1648 (PATIN, 1692), a doença foi mapeada geneticamente em 2006. Foram identificadas mutações no locus ACVR1 do cromossomo 2q23-24, gene que codifica o receptor de ativina A tipo I, também conhecido como ALK2 (activin-like kinase 2), um receptor tipo I da proteína morfogenética óssea – BMP (do inglês, bone morphogenetic protein). No gene mutado, tanto nos casos hereditários como nos esporádicos, observa-se, na maioria dos casos, a idêntica substituição de nucleotídeo único heterozigótico (c.617G>A – guanina por adenina na posição 617) que altera o aminoácido arginina para histidina no códon 206 (R206H), localizado no domínio glicina-serina (SHORE *et al.*, 2006), podendo ocorrer variações adicionais dentre dessas sequências. O gene ACVR1 mutado (R206H) provoca alterações na configuração estrutural da proteína ACVR1, que permitem a ativação desregulada da via de sinalização BMP/Smad, desencadeando processos de diferenciação osteogênica em tempo e local inadequados (HINO *et al.*, 2015; VALER *et al.*, 2019). Modelos experimentais *in vivo*

e *in vitro* demonstraram a ativação do receptor ACVR1 mutado pela alteração do pH decorrente de hipóxia tecidual (OLMSTED-DAVIS *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2016).

As primeiras ossificações ectópicas ocorrem comumente na primeira década de vida com agudizações ou crises denominadas *flare-ups*, caracterizadas por edema e massas dolorosas que aparecem espontaneamente ou após um trauma de diversos tipos: quedas, cirurgias, biópsias, injeções intramusculares e várias doenças virais. As agudizações variam em tamanho e intensidade e podem estar associadas com regressão espontânea (DELAI *et al.*, 2004).

As crises agudas frequentemente culminam com neoformação óssea heterotópica nas áreas afetadas, podendo comprometer tendões, ligamentos, aponeuroses, fáscias e outros tecidos conjuntivos do sistema musculoesquelético voluntário. Os olhos, coração, diafragma, músculos esfinterianos e músculos lisos viscerais são caracteristicamente poupados. As agudizações podem durar semanas ou meses e podem ser acompanhadas por febre baixa (BRIDGES *et al.*, 1994; CONNOR; EVANS, 1982).

A frequência dos *flare-ups* é imprevisível variando de crises repetidas até períodos longos de latência. O ritmo de evolução da FOP é altamente variável de paciente para paciente apresentando adultos já limitados na cama ou em cadeira de rodas ou com grau menor de restrição na fase adulta (BRIDGES *et al.*, 1994; DELAI *et al.*, 2004; CONNOR; EVANS, 1982)

A progressão da FOP é tipicamente: axial para apendicular, cranial para caudal e proximal para distal. O risco aumentado de envolvimento dos quadris, punhos e joelhos aumenta com a idade, sendo a mandíbula tipicamente uma das últimas áreas criticamente envolvidas (BRIDGES *et al.*, 1994; CONNOR; EVANS, 1982; DELAI *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2001).

Sem tratamento curativo, medidas terapêuticas de abordagem multidisciplinar visam ao controle sintomático da doença com manutenção de mobilidade e funcionalidade. O uso limitado de altas doses de corticoides, anti-inflamatórios não esteroidais e inibidores de leucotrienos constituem a terapia mais utilizada durante os surtos, proporcionando alívio da dor e razoável controle da inflamação, sem, contudo, impedir a ossificação heterotópica (DELAI *et al.*, 2004; PIGNOLO; SHORE; KAPLAN, 2011; SHAH *et al.*, 2019). Em fase de ensaio clínico destacam-se o Palovarotene, o REGN 2477 e a Rapamicina (KATAGIRI; TSUKAMOTO; KURATANI, 2018; WENTWORTH; MASHARANI; HSIAO, 2019). Efeitos colaterais ainda estão em

esclarecimento, bem como a eficácia em impedir a progressão da doença (KAPLAN *et al.*, 2018; LEES-SHEPARD *et al.*, 2018).

Desde 1997, Palhares e colaboradores têm sugerido o uso terapêutico de ácido ascórbico (PALHARES, 1997; PALHARES; LEME, 2001; PALHARES *et al.*, 2010), que, posteriormente associado ao betabloqueador não-seletivo propranolol, patenteado como FOPCON (MARTINS *et al.*, 2015), demonstrou-se benéfico no controle da doença, reduzindo a frequência de surtos e a formação de osso ectópico (PALHARES *et al.*, 2019). Estudos de biologia molecular do mesmo grupo têm avançado no conhecimento da expressão de genes direta e indiretamente envolvidos nos processos de inflamação, fibrose e ossificação heterotópica, bem como do comportamento dos mesmos mediante o uso de FOPCON (BALANIUC, 2019; NASCIMENTO, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2017; NASCIMENTO, 2018).

A continuidade desses estudos é fortalecida pela sugestão de que a FOP seja uma doença de ordem inflamatória (BARRUET *et al.*, 2018; HAVIV *et al.*, 2019). Já estabelecida a participação do sistema imune (ALESSI WOLKEN *et al.*, 2018), resta esclarecer na FOP a participação do SNA na regulação da inflamação e nas etapas de formação do osso ectópico (SALISBURY *et al.*, 2010; SALISBURY *et al.*, 2011), bem como a possível atuação coadjuvante do SRA no controle da doença em resposta ao uso do betabloqueador não-seletivo combinado ao ácido ascórbico (BALANIUC, 2019).

Importa destacar que o tratamento com FOPCON tem sido proposto baseado nas capacidades antioxidativa e anti-inflamatória do ácido ascórbico (AA), bem como sua atividade na síntese de colágenos, associados ao potencial efeito antiangiogênico do propranolol (PP) (PALHARES *et al.*, 2019). Até o momento, nenhum outro grupo de pesquisa tem abordado o efeito desses compostos em pacientes FOP, antes e depois de tratamento *in vivo*, controlado e contínuo. Assim, a presente proposta dá, também, seguimento ao estudo desenvolvido por Palhares (dados ainda não publicados; CAAE: 60117916.0.0000.0021), que verificou ineditamente os efeitos clínicos de FOPCON em um grupo relativamente robusto, bem como os efeitos sobre a regulação genômica de genes putativos envolvidos tanto na osteogênese ectópica como em processos imuno-inflamatórios.

Mais recentemente, este grupo de pesquisa tem se interessado pelos benefícios da hesperidina (HSP), um flavonoide antioxidante capaz de melhorar doenças relacionadas à oxidação e distúrbios relacionados à obesidade, por seus

efeitos anti-adipogênico, anti-inflamatório, antioxidante e anti-hipercolesterolêmico (HAIDARI *et al.*, 2015; MOSQUEDA-SOLÍS, *et al.*, 2018). A hesperidina é um bioflavonoide extraído da casca da laranja, ao qual têm sido referidos efeitos benéficos no estresse oxidativo, no processo de osteogênese, com diminuição da neovascularização e inflamação.

Estudos apontam entre as ações da hesperidina (HSP), a atividade antioxidante comparável às atividades do ácido ascórbico, e aumento ou regulação positiva da expressão gênica de Nrf2 e ERK 1/2 (PARHIZ *et al.*, 2014). Além disso, existem comprovações da significativa subregulação na expressão do gene e da proteína IL-1 β e IL-17A (FU *et al.*, 2018; GANESHPURKAR; SALUJA, 2018).

Ações farmacológicas descritas, como atividades anti-hiperlipidêmicas, cardioprotetoras, anti-hipertensivas e antidiabéticas, são atribuídas principalmente a um mecanismo de defesa antioxidante e à supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias. Baseado na atividade anti-inflamatória, antioxidante, bloqueadora do estresse oxidativo e antiangiogênica da HSP, surge a possibilidade de otimizar os efeitos de FOPCON (ácido ascórbico + propranolol), com a adição de uma dose diária de HSP ao tratamento, na forma de ácido ascórbico + hesperidina (AA+HSP), administrado entre as doses habituais de FOPCON.

Outra substância com evidências científicas quanto ao seu fator benéfico de antioxidação, é o chá verde, constituído, entre outras substâncias, por flavonoides e polifenóis (MORAIS *et al.*, 2009). Estes têm a capacidade de combater os radicais livres no corpo humano. Além disso, atuando como um forte agente antioxidante, suas propriedades bioquímicas foram posteriormente categorizadas como anticancerígenas, anti-inflamatórias e anti-radiação. Experimentos realizados em camundongos revelam claramente a função inibitória do chá verde para combater o carcinoma da próstata em grande extensão (ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2003).

Dentre os flavonoides presentes no chá verde, predomina o galato de epigallocatequina (EGCG), com efeitos potencialmente benéficos em uma infinidade de condições de saúde. Estudos internacionais concentram-se na modulação da metilação do DNA na tumorigênese, sugerindo oportunidades científicas interessantes para determinar as propriedades do EGCG na metilação do DNA (LEGEAY *et al.*, 2015). Estudos em linhas celulares e em modelos animais também demonstraram que esses compostos podem afetar uma variedade de vias de sinalização e metabólicas, resultando na melhoria de vários sintomas, incluindo disfunção endotelial (AYYILDIZ

et al., 2018).

No Brasil, já tem sido estudada a extração da substância (EGCG) em laboratórios de universidades públicas, visando a conhecer mais sobre a metodologia de obter os compostos fenólicos a partir da infusão de ervas, enquanto o mais comum na literatura é o extrato obtido por solventes orgânicos das folhas secas. A epigallocatequina, como o principal flavonoide no chá verde, é capaz de prevenir a disfunção endotelial, evitando a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a agregação e adesão plaquetária e a migração e proliferação de células musculares lisas, além do poder de inibição dos radicais livres presentes no organismo (SELENE *et al.*, 2009; LEGEAY *et al.*, 2015).

Compondo as duas linhas de pesquisas inovadoras propostas, o tratamento da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva com FOPCON, AA+HSP e AA+Epi será realizado e analisado por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, buscando evidenciar e esclarecer seus efeitos por meio da análise da expressão de genes marcadores e/ou moduladores da angiogênese, osteogênese, fibrogênese e inflamação na FOP.

2 HIPÓTESE

A FOP é uma doença agressiva, marcada por atividade imunoinflamatória intensa e desordenada, em resposta à fatores variados. Espera-se mostrar a eficácia de FOPCON no controle dos sinais e sintomas inflamatórios e recorrência das crises. Nossa hipótese é de que o grupo estudado apresente registros de evolução da doença diferenciados, no que diz respeito à recorrência das crises, incapacidade cumulativa e qualidade de vida.

Espera-se, também, comprovar o envolvimento dos genes alvos estudados na fisiopatologia da FOP, bem como a participação destes no controle da inflamação e inibição da ossificação heterotópica, quando modulados em resposta ao tratamento com ácido ascórbico e propranolol (FOPCON).

Acredita-se, ainda, que a ingestão diária de doses terapêuticas de Hesperidina ou de Epigallocatequina, por seus efeitos antioxidantes e antiangiogênicos, possa ampliar os efeitos benéficos de FOPCON sobre o processo inflamatório e osteogênico, reduzindo os episódios de flare-ups e evitando a instalação do osso ectópico.

3 JUSTIFICATIVA

Este estudo dá seguimento à investigação pioneira de componentes do SRA e SNA na fisiopatologia da FOP, e em resposta ao tratamento com FOPCON. Portanto, além de incrementar o entendimento da atuação dos sistemas adrenérgico e colinérgico (SNA) na formação de osso, contribuirá com o esclarecimento da farmacodinâmica e farmacocinética de FOPCON, explicando em grande parte seu benefício no controle da FOP.

Além disso, comprovados os efeitos *in vitro* da Hesperidina e da Epigallocatequina, ineditamente, o uso dessas substâncias poderá ser considerado como terapia coadjuvante ao FOPCON, ao potencializar os efeitos antioxidantes do ácido ascórbico e antifibróticos do propranolol.

Os resultados dos experimentos incluindo a Hesperidina e a Epigallocatequina poderão enriquecer o conhecimento sobre as propriedades antioxidantes desses compostos, podendo melhor direcionar a população na escolha apropriada desses produtos, considerando seu potencial teor medicinal. No que se refere à FOP, os estudos produzirão evidências acerca da modulação genética decorrente da ingestão terapêutica de tais compostos, e explicar, pelo menos em parte, os prováveis efeitos sobre o controle da doença.

São comuns entre os portadores de FOP os relatos de dor crônica e períodos de evolução silenciosa com formação de osso ectópico, mesmo sem crises. Como e quanto a doença impacta a qualidade de vida e grau de independência dos portadores de FOP no Brasil, necessita de maior investigação.

Por ser considerada uma doença órfã, sem tratamento curativo, é relevante propor o controle sintomático da dor e inflamação na FOP, objetivando melhor expectativa e qualidade de vida, por meio de FOPCON (do nome fantasia *FOP Control*), um tratamento contínuo de baixo custo, com mínimo ou nenhum efeito adverso ou colateral. Tratando-se de doença ultrarrara, acredita-se que a continuidade da pesquisa em FOP confere notoriedade à instituição de ensino – UFMS, tendo em vista seu impacto científico e relevância na construção da história natural da doença.

Finalmente, os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser úteis para o tratamento de outras desordens, além da FOP, que envolvam ossificação heterotópica de ordem genética ou adquirida.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo da pesquisa

Trata-se de uma pesquisa clínica e experimental, a ser realizada no Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), situado no prédio da Faculdade de Medicina (FAMED).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares relacionados à inflamação, fibrose e ossificação em portadores de Fibrodisplasia Ossificante Progressiva antes e depois do tratamento com ácido ascórbico, propranolol, hesperidina e epigallocatequina.

4.2 Objetivos específicos

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

- a) Aplicar questionário estruturado aos pacientes portadores de FOP antes e depois dos tratamentos propostos;
- b) Identificar os dados sociodemográficos dos participantes portadores de FOP arrolados no estudo;
- c) Acompanhar a evolução clínica dos participantes por meio de instrumentos validados para funcionalidade/AVD, qualidade de vida e adesão ao tratamento.
- d) Desenvolver primers de oligonucleotídeos específicos para o estudo da expressão de mRNA de genes alvos codificadores para marcadores de inflamação, fibrose e osteogênese;
- e) Analisar a expressão basal dos genes alvos em indivíduos saudáveis (n=8) e portadores de FOP sem tratamento prévio (n=8);
- f) Analisar comparativamente a expressão relativa dos genes alvos em indivíduos portadores de FOP em resposta ao tratamento com FOPCON (n=8);
- g) Analisar comparativamente a expressão relativa dos genes alvos em indivíduos portadores de FOP em resposta ao tratamento de FOPCON e FOPCON-Plus

(n=8);

- h) Analisar comparativamente a expressão relativa dos genes alvos em indivíduos portadores de FOP em resposta ao tratamento de FOPCON e FOPCON-Epi (n=8);
- i) Dosar proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo e à inflamação em indivíduos controle (n=8) e portadores de FOP sem tratamento prévio (n=8);
- j) Dosar proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo e à inflamação em indivíduos portadores de FOP em resposta ao tratamento com FOPCON (n=8).

5.2 Participantes e amostras

Considerando a raridade da doença em estudo, não há como limitar o recrutamento dos pacientes a estabelecimentos de saúde ou cidades específicas. Referência na pesquisa em FOP no Brasil, este grupo de pesquisa é frequentemente contactado por profissionais de saúde desta ou de outras cidades, com o intuito de encaminhar pacientes com sinais clínicos da doença. A procura parte também do próprio paciente portador de FOP ou seus familiares, a partir da indicação do grupo por outros pacientes, e, ainda pelas entrevistas e publicações disponíveis nas mídias tradicionais e sociais. Sendo assim, os indivíduos portadores de FOP arrolados na pesquisa poderão ser residentes nas diferentes regiões do Brasil.

A esses pacientes e/ou familiares, havendo interesse, será explicitada a proposta do grupo com as pesquisas desenvolvidas: proporcionar controle da doença, com melhora na qualidade de vida. Constatada a viabilidade de participação no estudo, a partir dos critérios de inclusão e nível de interesse do paciente e seu familiar, será, então, realizado o convite para participação na pesquisa. O aceite será confirmado por meio de Termo de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE ou TALE), conforme descrito mais adiante (Apêndices A, B e C).

Os participantes da pesquisa constituirão cinco grupos:

- Grupo 1: indivíduos saudáveis (n=8);
- Grupo 2: indivíduos portadores de FOP, sem tratamento prévio específico para a doença (n=8);
- Grupo 3: tratamento com FOPCON (n=8);
- Grupo 4: tratamento com FOPCON e AA+HSP (n=8);
- Grupo 5: tratamento com FOPCON e AA+Epi (n=8).

Os resultados obtidos nas análises dos grupos 1 e 2, refletindo o estado basal

controle, serão considerados os valores de referência para a análise comparativa dos resultados obtidos nos grupos 3, 4 e 5, após seus respectivos tratamentos. De todos os grupos, serão coletadas amostras de sangue periférico e de raspado de mucosa oral em swab.

Todos os indivíduos enumerados nos grupos 2 a 5, após o tempo determinado para os ensaios experimentais, e mais oito indivíduos portadores de FOP, serão acompanhados longitudinalmente (evolução clínica), totalizando 40 participantes na pesquisa.

5.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Serão incluídos na pesquisa os indivíduos com sinais clínicos de FOP clássica (e possíveis variantes), independentemente do sexo e da idade, desde que apresentem termo de consentimento assinado. Para o grupo controle, serão selecionados por amostragem não probabilística indivíduos sem comorbidades e com idade semelhante aos indivíduos com FOP arrolados no estudo.

Serão excluídos os indivíduos que já estiverem vinculados a outras propostas de pesquisa experimental.

5.3 Procedimentos de coleta

Os participantes da pesquisa serão recebidos nas dependências da FAMED onde serão submetidos à avaliação clínica e, em seguida, às coletas de sangue periférico e raspado de mucosa oral. Diante de inviabilidade física ou geográfica de deslocamento do paciente e/ou familiares, os pesquisadores irão até o paciente para realizar o exame físico e coleta de amostras. Amostras subsequentes poderão ser coletadas na cidade de origem do paciente por equipe local especializada, mediante contato e orientações prévias do pesquisador principal.

5.3.1 Coleta de dados clínicos e sociodemográficos

Antes e depois do tratamento, será aplicado o questionário semiestruturado para os indivíduos com FOP (Grupos 3, 4 e 5), contemplando dados sociodemográficos, aspectos clínicos e terapêuticos de cada indivíduo, contemplando

possíveis efeitos adversos, bem como as alterações e manifestações clínicas nos indivíduos com FOP, possivelmente advindas das terapias (Apêndice D).

O acompanhamento clínico longitudinal será mantido pelos 24 meses subsequentes, para os 40 participantes, em uso contínuo de FOPCON. Nesse período, além do questionário semiestruturado, serão aplicados instrumentos validados para avaliação da qualidade de vida (WHOLOL-bref, Apêndice E), da independência em atividades da vida diária (Escala de Katz, Apêndice F), da funcionalidade (CAJIS e goniometria, Apêndice G), e da adesão ao tratamento (Apêndices H e I) (KLUTHCOVSKY; KLUTHCOVSKY, 2009; TERESA SARAIVA LINO et al., 2008; KAPLAN; AL MUKADDAM; PIGNOLO, 2017; PIGNOLO; KAPLAN, 2018; BEN; NEUMANN; MENGUE, 2012; CORNÉLIO et al., 2009). Pretende-se aplicar a escala CAJIS aos pacientes cujo acompanhamento clínico possa ser realizado presencialmente ou por teleconsulta/vídeo, em um intervalo de 24 meses.

5.3.2 Coleta de sangue periférico

Para as análises biomoleculares, serão coletadas amostras de sangue periférico de todos os grupos. Dos pacientes FOP tratados (Grupos 3, 4 e 5), serão coletadas mais duas amostras em momentos diferentes: seis meses e 12 meses após o início do tratamento.

As coletas de sangue dos cinco grupos serão obtidas por meio de punção venosa do dorso de uma das mãos dos participantes, tomando as devidas precauções de segurança e higiene, além da cautela criteriosa em evitar traumas que possam predispor a ossificação heterotópica, no caso dos pacientes FOP. As amostras serão coletadas em tubos *vacutainer* heparinizados e separadas em três partes:

- uma parte será transferida para microtubos de 1,5 mL previamente preenchidos com alíquotas de 800 µL de estabilizador de ácidos nucleicos (Ambion™, RNAlater®), e mantidas a 4°C por até 24 horas antes do seu processamento (experimento *in vitro*), e em seguida armazenada em freezer a – 20°C até o momento da etapa seguinte;
- uma parte será transferida para tubos *ependorf* de 2,0 mL, preenchidos previamente com alíquotas de 800 µL de estabilizador de ácidos nucleicos (Ambion™, RNAlater®), e armazenada em freezer a -20°C até o seu processamento;
- uma parte será centrifugada (10 minutos a 10.000 rpm) para separação do

plasma e armazenadas em freezer a -20°C até o seu processamento.

O armazenamento das amostras dar-se-á conforme os critérios estabelecidos em protocolo de biorrepositório.

Coletas de sangue adicionais serão eventualmente necessárias ao surgimento de reações adversas. Para o Grupo 5 (AA+epigallocatequina) especificamente, será necessário acompanhamento mensal da função hepática por meio de exames laboratoriais simples (ALT – alanina aminotransferase, e AST – aspartato aminotransferase).

5.3.3 Coleta de raspado de mucosa oral

Na mesma ocasião da coleta de sangue, serão coletadas amostras de raspado de mucosa oral, para fins de análises biomoleculares. Da mesma maneira, dos pacientes FOP tratados (Grupos 3, 4 e 5), serão coletadas mais duas amostras em momentos diferentes: seis meses e 12 meses após o início do tratamento.

A amostra do raspado de mucosa oral será obtida por rolagem de *swab* seco estéril, de baixo para cima e vice-versa no lado interno de cada bochecha, sendo um *swab* para cada lado da bochecha, alcançando sulcos próximos da gengiva. A extremidade do *swab* com a amostra será cortada com bisturi ou tesoura esterilizada, diretamente para um microtubo previamente preenchido com 500 µL de RNAlater (Ambion™, RNAlater®). O microtubo com a amostra será agitado e congelado a -86°C até o seu processamento, conforme critérios estabelecidos no protocolo de biorrepositório.

5.4 Tratamentos dos grupos

5.4.1 Tratamento com FOPCON (Grupo 3)

Após a avaliação médica, serão fornecidas gratuitamente a cada paciente, doses individualizadas de FOPCON (ácido ascórbico e propranolol), prescritas de

acordo com peso e idade (MARTINS *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2017). A princípio, deverão ser tomadas três cápsulas por dia (8/8h), podendo ser necessário o fracionamento da dose estipulada em maior quantidade de cápsulas menores, devido limitações na abertura da boca. Ajustes poderão ser realizados sempre que necessário, conforme alteração de peso, pressão arterial e/ou frequência cardíaca.

O tratamento com FOPCON será seguido por pelo menos 24 meses, após os experimentos propostos (biologia molecular), para todos os participantes da pesquisa (n=40), para seguimento longitudinal da evolução clínica da doença e efeitos terapêuticos.

5.4.2 Tratamento com FOPCON e AA+HSP (Grupo 4)

Após a avaliação médica, serão fornecidas gratuitamente a cada paciente, doses individualizadas de FOPCON (ácido ascórbico e propranolol), prescritas de acordo com peso e idade (MARTINS *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Neste grupo, deverão ser tomadas duas cápsulas por dia. Ajustes poderão ser realizados sempre que necessário, conforme alteração de peso, pressão arterial e/ou frequência cardíaca.

Adicionalmente, o paciente receberá doses individualizadas de AA+HSP, composto por 10 mg/kg/dose de ácido ascórbico e 10 mg/kg/dose de hesperidina (dose máxima de 500 mg/dia). Uma cápsula de AA+HSP deverá ser ingerida entre as doses de FOPCON, com intervalo de 8 horas entre cada cápsula, seguindo a sequência: FOPCON / AA+HSP / FOPCON.

Eventualmente será necessário o fracionamento da dose estipulada em maior quantidade de cápsulas menores, devido limitações na abertura da boca.

5.4.3 Tratamento com FOPCON e AA+Epi (Grupo 5)

Após a avaliação médica, serão fornecidas gratuitamente a cada paciente, doses individualizadas de FOPCON (ácido ascórbico e propranolol), prescritas de acordo com peso e idade (MARTINS *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Neste grupo, deverão ser tomadas duas cápsulas por dia. Ajustes poderão ser realizados

sempre que necessário, conforme alteração de peso, pressão arterial e/ou frequência cardíaca.

Adicionalmente, o paciente deste grupo receberá doses individualizadas de AA+Epi, composto por 10 mg/kg/dia de ácido ascórbico (dose máxima de 250 mg/dose) e 5 mg/kg/dose de epigalocatequina (dose máxima de 300 mg/dose), conforme valores de referência estabelecidos por Ayyildiz *et al.* (2018). Uma cápsula de AA+Epi deverá ser ingerida entre as doses de FOPCON, com intervalo de 8 horas entre cada cápsula, seguindo a sequência: FOPCON / AA+Epi / FOPCON.

Eventualmente será necessário o fracionamento da dose estipulada em maior quantidade de cápsulas menores, devido limitações na abertura da boca.

5.5 Preparo dos medicamentos

Os compostos dos medicamentos serão pesados e triturados juntos, com as proporções indicadas para cada medicação, considerando peso e idade. Serão encapsulados por meio de encapsuladora semiautomática e armazenados em frascos com sílica, devidamente identificados e lacrados. Esses procedimentos serão realizados no Laboratório de Patologia Molecular da UFMS, por profissional farmacêutico participante do grupo de pesquisa. A fonte e dosagens de ácido ascórbico e propranolol foram previamente padronizadas por Nascimento *et al.* (2014; 2107). A extração da epigalocatequina será realizada conforme descrito por Saio *et al.* (2006), e a Hesperidina conforme o estudo de Tassic *et al.* (2013).

5.6 Modelo de experimento *in vitro*

5.6.1 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

O método a ser utilizado para a separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi descrito por Gazzinelli *et al.* (1983) com algumas modificações. Resumidamente, aproximadamente 15 ml de sangue heparinizado serão transferidos para tubo Falcon de 50 ml, contendo uma mistura de Ficoll-diatrozoato, obtida comercialmente (Histopaque® - 1077, Sigma® 10771), na proporção de uma parte de Ficoll-diatrozoato para duas partes de sangue. O anel de leucócitos será obtido por gradiente em ficoll, através da centrifugação por 40 minutos

a 1400 rpm (~1000g) a temperatura ambiente com especificação de aceleração máxima (9) e frenagem mínima (1) em centrífuga de alta rotação marca HIMAC CR21E Hitache®). Após centrifugação, as células mononucleares serão coletadas na interface entre o plasma e o Ficoll-diatrozoato, em seguida transferidas para novos tubos e lavadas por três vezes em meios de cultivo, sendo duas vezes em meio DEMEM estéril (Gibco® pH, 7,2 a 7,4) e uma vez em meio RPMI 1640 completo (10% soro fetal bovino + L-glutamina + gentamicina + streptomicina, pH 7,4) (Gibco® pH 7,2 a 7,4). A lavagem das células será realizada a 1200 rpm (~800g) / 7 minutos/ 4°C. As células serão ressuspensas em 1mL de meio RPMI completo. A densidade celular será ajustada para concentração desejada, após contagem celular com Azul de Tripán em Câmara de Neubauer. Todos os procedimentos que necessitem de condições estéreis serão realizados em capela de fluxo laminar (BIOSEG® 12, Grupo VECO).

5.6.2 Cultivo celular

O cultivo celular será realizado em placa de 96 poços, sendo 180 microlitros da suspensão celular (~ 3×10^5 células) cultivados e estabilizados por 24 horas em meio RPMI 1640 completo, mantidos em estufa de CO₂ (5%) a 37°C (Thermo scientific/Forma Series II Water Jacket CO₂ incubator).

5.6.3 Tratamento das células

As células do grupo 3 serão tratadas com ácido ascórbico + propranolol conforme padronizado por Nascimento (2015; 2017).

As células do grupo 4 serão tratadas com ácido ascórbico + hesperidina em dosagem a ser definida de acordo com as verificações e testes laboratoriais para estabilização do composto.

As células do grupo 5 serão tratadas com ácido ascórbico + epigallocatequina em dosagem a ser definida de acordo com as verificações e testes laboratoriais para estabilização do composto.

Os tratamentos serão realizados em triplicata para avaliação de viabilidade celular e em quadruplicata para PCR em tempo real. As células ficarão em tratamento por 24 horas em estufa de CO₂.

5.6.4 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular será realizada a partir do método do MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), que é baseado na redução metabólica a formazan. Resumidamente, após 20 horas de incubação, serão adicionados 20 μ L de MTT (5mg/mL) a cada poço em RPMI. Após 4 horas de incubação o conteúdo dos poços será cuidadosamente retirado com pipeta multicanal e adicionados a cada poço, 200 μ L de HCl 0,04N em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan nas células viáveis, o produto cromogênico artificial nas placas será determinado em leitor de ELISA no comprimento de onda de 590nm (Molecular Devices, Versa Max – *microplate reader*). Além disto, a viabilidade celular será concomitantemente avaliada pela contagem de células com azul de tripan após 24 horas dos tratamentos.

5.6.5 Estudo da expressão de RNA mensageiros

5.6.5.1 Extração do RNA total e tratamento com DNase

Para extração do RNA total serão utilizados $\sim 1,2 \times 10^6$ ou $\sim 1,5 \times 10^6$ das células do cultivo de cada indivíduo. Serão avaliadas células tratadas e não tratadas. Para obtenção do RNA total, as células serão transferidas da placa para tubos de microcentrífuga tipo *ependorff* de 1,5 mL, centrifugadas imediatamente a 1200rpm por 7 minutos, para concentração do *pellet* de células. Em seguida, o RNA total será extraído utilizando-se reagente Stat-60®, segundo protocolo descrito pelo fabricante, sem modificações. O RNA total ressuspenso em 25 μ L de água DEPC, será quantificado em 260nm em nanodrop Denovix® DS-11 utilizando-se uma alíquota de 1 μ L. Alíquotas de amostras de RNA total (1000ng) serão, em seguida, tratadas com *Dnase I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA) para eliminação de traços de DNA genômico. A *Dnase I* será inativada com EDTA 15mM a 75°C por 10 min segundo o protocolo do fabricante. Após este tratamento, as alíquotas serão requantificadas em 260 nm para posterior utilização no RT-PCR.

5.6.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (qPCR) serão estudados, desenhados e selecionados a partir de

análises das sequências descritas no *GeneBank*, utilizando-se o programa *BLAST* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017). Os iniciadores serão sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT). O controle endógeno normalizador será o gene *S26* (VINCENT; MARTY; FORT, 1993).

5.6.5.3 Transcrição reversa (RT)

A RT para síntese de sscDNA (DNA complementar de fita simples) será realizada a partir de 700 ng de RNA total em volume final de reação de 21 µL por amostra. Resumidamente, 700 ng de RNA serão pré-incubados a 70°C por 10 minutos com 10 pmol de cada primer reverso, específico para os genes-alvo em estudo, juntamente com 10 pmol de primer oligo dT₁₈ (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 11 µL do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) contendo 2 µL de dNTP mix (10 mM de cada) serão incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de RNA e iniciadores previamente descritos. A reação será finalizada a 4°C e imediatamente utilizada na qPCR ou congeladas a -20°C até a qPCR. Todos os reagentes serão provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

5.6.5.4 PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de sscDNA resultantes da RT serão utilizadas na qPCR, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras em triplicata serão aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em um volume final de reação de 10 µL cada. Alíquotas de 0,8 µL de sscDNA das amostras serão pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se, posteriormente, 9,2 µL de sybr Mix (5 µL do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 0,6 µL de cada primer (senso e anti-senso; 10 pmol/ul) e 3 µL água estéril filtrada). A placa será selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações ocorrerão no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15 s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60°C para análise da especificidade dos amplicons.

5.7 Modelo de experimento *in vivo*

5.7.1 Extração do RNA total e tratamento com DNase

Para obtenção do RNA total a partir dos leucócitos, após o descongelamento das amostras, alíquotas de ~1,5 mL serão centrifugadas a 700g por 15 minutos, para concentração do *pellet* de células. Em seguida, o RNA total será extraído utilizando-se reagente Stat-60®, segundo protocolo descrito pelo fabricante. O RNA total será ressuspenso em 100 µL de água *RNAse free* tipo *DEPC* e alíquotas de 2 µL quantificadas por leitura a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Scientific™ Spectrophotometer). Na sequência, alíquotas de amostras de RNA total serão tratadas com *DNase I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA) para eliminação de traços de DNA genômico, extraídas com 2 volumes de fenol tamponado em Tris-EDTA 1M, pH 4,2 e precipitadas com 50% (v/v) de isopropanol (200 proof). O *pellet* de RNA tratado com DNase será lavado com 700 µL de etanol ultra puro e ressuspendido em 25 µL de H₂O DEPC. Após esse tratamento, as alíquotas serão requantificadas por leitura a 260 nm, para subsequente utilização na RT-PCR.

5.7.2 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (qPCR) serão criteriosamente desenhados e selecionados a partir de análises das sequências alvos dos mRNAs específicos, descritos no *GeneBank*, utilizando-se o programa *BLAST*, do site NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY, 2018). Os iniciadores serão sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Os mesmos, por serem recebidos liofilizados, serão posteriormente ressuspendidos em H₂O S.F. e aliquotados para armazenamento a -20°C em estoques de 100 pmol/µl. Como controle endógeno normalizador será utilizado o gene *S26* (VINCENT; MARTY; FORT, 1993), cujo *primer* específico foi previamente padronizado por Nascimento (2014).

5.7.3 Transcrição reversa (RT)

A transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA (DNA complementar) de fita simples será realizada a partir de ~350 ng de RNA total em volume final de reação de 21 µL por amostra. Em suma, as amostras de RNA serão pré-incubadas a 70°C por 10 minutos, com 10 pmol de cada *primer* reverso, específico para os genes alvos em estudo, juntamente com 10 pmol de *primer* oligo dT₁₈ (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 11 µL do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), contendo 2 µL de dNTP mix (10 mM de cada), serão incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de RNA e *primers* previamente descritos. A reação será terminada a 4°C e utilizada imediatamente na qPCR (PCR quantitativo em tempo real). Todos os reagentes serão provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-qPCR).

5.7.4 Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

As amostras de sscDNA resultantes da RT serão utilizadas na qPCR, a ser realizada no equipamento QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2011). As amostras em triplicatas serão aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em volume final de reação de 25 µL. Alíquotas de 2 µL de cDNA das amostras serão pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se, posteriormente, 23 µL de sybr Mix (12,5 µL do SYBR Green PCR Master Mix Kit; 0,15 µL de cada primer [senso e anti-senso]; 10 pmol/µL) e água estéril filtrada (q.s.p. 25 µL). A placa será selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de qPCR ocorrerão no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60°C para análise da especificidade dos fragmentos alvos amplificados (*amplicons*).

5.8 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os níveis de proteínas no plasma serão dosados utilizando kits ELISA (ensaio

de imunoabsorção enzimática) disponíveis no mercado, e os testes serão processados conforme instrução do fabricante.

5.9 Análise estatística

Para análise dos dados antropométricos e clínicos deste estudo serão utilizados testes não-paramétricos de comparação (Teste Mann-Whitney) e associação (Teste Exato de Fisher e Teste Qui quadrado). Valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

Para a quantificação relativa da qPCR será realizada uma análise comparativa da expressão dos transcritos dos genes alvos com o controle endógeno, utilizando-se o método CT comparativo, no qual o controle endógeno será utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos ([média do CT gene alvo – média do CT controle endógeno]) gerando o ΔCT . Posteriormente, ΔCT será utilizado para calcular o $\Delta\Delta CT$ ($[\Delta CT \text{ amostra} - \Delta CT \text{ do calibrador (amostra de referência)}]$). Por fim, será aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ para chegar aos níveis relativos de expressão (*fold change*) de cada gene alvo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os resultados serão lançados no programa GraphPad Prism 5, para a análise estatística, na qual serão aplicados o Teste t de Student não pareado e ANOVA. Os resultados serão considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5.10 Aspectos éticos

Em cumprimento à resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O trabalho de campo será iniciado somente após a aprovação do projeto.

Todos os participantes serão devidamente esclarecidos por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), com o qual deverão concordar voluntariamente. Os participantes com idade entre seis anos e 18 anos incompletos deverão assinar o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Apêncides B e C), acompanhado do TCLE assinado por seu responsável.

Por meio do termo de consentimento, o participante poderá concordar ou não com a coleta das amostras, bem como com o registro de vídeo e imagens. O

participante se comprometerá com o envio mensal (ou sempre que solicitado) de dados dos sinais vitais: frequência cardíaca e pressão arterial, para controle de efeitos adversos, bem como do peso corporal, para ajustes na dosagem do medicamento sempre que necessários.

Aos participantes, não será oferecido nenhum benefício financeiro, entretanto, será garantida a participação na pesquisa sem qualquer ônus, seja para aquisição da medicação, realização de exames ou deslocamento até o local da pesquisa quando solicitado pelos pesquisadores. Havendo necessidade de a medicação ser disponibilizada via correio, não haverá custo para o paciente.

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

5.10.1 Benefícios

O principal benefício esperado é a diminuição das crises dolorosas a partir da estabilização da doença com o uso contínuo das terapias propostas. Além disso, a proposta inovadora da coleta de raspado de mucosa oral para as análises laboratoriais, a depender dos resultados, poderá ser estabelecida como uma técnica alternativa à coleta de sangue periférico, proporcionando aos participantes da pesquisa, mais conforto e maior confiabilidade de que não acontecerão *flare ups*, por tratar-se de técnica menos invasiva.

5.10.2 Riscos

Normalmente, a associação do ácido ascórbico e do propranolol não apresenta efeitos colaterais quando administrada em doses adequadas. Os pacientes participantes da pesquisa serão orientados para que, ao surgimento de sintomas como: bradicardia, hipotensão, irritação gástrica ou outro sintoma indesejado, relacionado ao uso de FOPCON, o pesquisador responsável seja contatado imediatamente, para que sejam tomadas as devidas providências.

Quanto aos possíveis efeitos da epigalocatequina, evidências sugerem que o extrato do chá verde contendo dosagens altas de epigalocatequina possa reduzir o apetite e aumentar o catabolismo de gorduras (XU *et al.* 2004). Já a hesperidina, como

diarreia, cefaleia, dor epigástrica e abdominal, também está contraindicada no período da gravidez e lactação(CRAIG, 1999).

Por meio do TCLE, o paciente estará ciente do risco de processo inflamatório desencadeado pela coleta de sangue, e do risco de constrangimento caso registro de imagens seja autorizado. Ressaltamos que a coleta será realizada por profissional especializado e experiente.

6 ORÇAMENTO

MATERIAL DE CONSUMO					
ITEM	QUANT.	UNID.	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VALOR MÉDIO UNITÁRIO (EM R\$)	VALOR TOTAL (EM R\$)
1	Variável	Variável	Material de escritório	Variável	200,00
2	10	Caixa	Luva látex de procedimento sem talco	15,00	150,00
3	1	Pacote	Microtubo Eppendorf 200 µL com 1000 unid., estéril	35,00	35,00
4	2	Pacote	Microtubo Eppendorf 2,0 ML com 1000 unid.	32,00	64,00
5	2	Pacote	Tubos Falcon 15 mL com 50 unid.	31,00	62,00
6	1	Pacote	Ponteira branca tipo Eppendorf 10 µL com 1000 unid.	30,00	30,00
7	1	Pacote	Ponteira branca tipo Eppendorf 200µL com 1000 unid.	70,00	70,00
8	1	Pacote	Ponteira azul com coroa e filtro com 1000 unid.	25,00	25,00
9	2	Frasco	Álcool etílico ABS PA ACS 1000 mL	15,00	30,00
10	10	Unidade	Filtro com membrana polietersulfonica de 0,22 µm	5,00	50,00
11	1	Kit	DNase I	2.120,80	2.120,80
12	1	Frasco	Ladder 50 PB 500 mL (50 reações)	190,00	190,00
13	1	Frasco	Ladder 100 PB 500 mL (100 reações)	290,00	290,00
14	1	Frasco	Bis-Acrilamida 25 g	80,00	80,00
15	1	Frasco	Acrilamida 300 g	190,00	190,00
16	1	Frasco	SDS 100 g	120,00	120,00
17	1	Frasco	Persulfato de amônio 100 g	100,00	100,00
18	1	Frasco	RNase A 5 mL 10 mg/mL	205,00	205,00
19	1	Frasco	Ácido bórico 500 g	105,00	105,00
20	1	Frasco	Tris base 500 g	140,00	140,00
21	1	Frasco	EDTA 250 g	160,00	160,00
22	1	Kit	Kit de extração de RNA	1620,00	1.620,00
23	15	Kit	Colágenos específicos	600,00	9.000,00
24	22	Base	Primers específicos 50 nmol	2,60	57,20
25	2	Pacote	Placa para cultura de células - 384 poços (pacote com 50 placas)	1.597,50	3.195,00
26	1	Caixa	Filme adesivo óptico (com 100 unid.)	1.215,00	1.215,00
27	50	Frascos	Ácido Ascórbico + Propranolol (FOPCON)	20,00	1.000,00
28	50	Frascos	Ácido Ascórbico + Propranolol + Hesperidina 30 mg (FOPCON Plus)	40,00	2.000,00
29	1	Frasco	SYBR Green PCR Master Mix 1 x 50 MI	18.825,00	18.825,00
30	1	Frasco	RNA STAT – 60 - 1 x 500 mL	4.462,35	4.462,35
31	6	Frasco	M-MLV Transcriptase Reversa Buffer de 1 mL	351,86	2.111,16
31	1	Caixa	dNTP set (100mM) 8 x 1,25	9.524,32	9.524,32
32	1	Frasco	Proteinase K – 5 MI	537,00	537,00
33	1	Frasco	RPML – 1640 medium – 6 x 1 L	1.030,00	1.030,00
TOTAL GERAL					58.993,03

A proposta poderá ser, em grande parte, custeada pelo IAPES – Instituto de Assistência e Pesquisa em Educação e Saúde, apoiador da pesquisa em FOP. Material de consumo de baixo custo poderá ser suprido pelos pesquisadores.

6.1 Orçamento referente à emenda

MATERIAL DE CONSUMO					
ITEM	QUANT.	UNID.	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VALOR MÉDIO UNITÁRIO (EM R\$)	VALOR TOTAL (EM R\$)
1	Variável	Variável	Material de escritório	Variável	200,00
2	10	Caixa	Luva látex de procedimento sem talco	15,00	150,00
3	960	Frascos	Ácido Ascórbico + Propranolol (FOPCON)	30,00	28.800,00
				TOTAL	29.150,00

8 VIABILIDADE

Os equipamentos classificados como materiais permanentes necessários para o desenvolvimento da pesquisa (freezer, centrífuga, pipetas, NanoDrop™ e QuantStudio 6) encontram-se disponíveis no Laboratório de Patologia Molecular da UFMS.

Uma vez aprovada, a pesquisa aqui proposta será, em grande parte, custeada pelo Instituto de Assistência e Pesquisa em Educação e Saúde - IAPES, apoiador da pesquisa em FOP, e custada pelo pesquisador responsável.

REFERÊNCIAS

- ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officinalis* in hypercholesterolemic rats. **Food Chem.**, [s.L.], v. 83, n.4, p. 569-574. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00155-9)
- AYYILDIZ, S.S. *et al.* Optimizing the extraction parameters of epigallocatechin gallate using conventional hot water and ultrasound assisted methods from green tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 37-44, jun. 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.06.003>.
- XU JZ, YEUNG SY, CHANG Q, HUANG Y, CHEN ZY. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. **Br J Nutr.** V.91, nº 6, p. 873-81, 2004. DOI: 10.1079/BJN20041132
- CRAIG, WJ. Health promoting properties of common herbs. **Am J Clin Nutr.** 70(Suppl.3):491s-9, 1999. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/10.1093/ajcn/70.3.491s>
- BALANIUC, S. L. B.; *et al.* Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: pro-inflammatory and pro-fibrotic genes as targets for research and treatment of clinical symptoms of this rare and devastating disease. **Revista NBC**, Belo Horizonte, v. 9, n. 17, julho de 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/335146244>
- BARRUET, E. *et al.* NF- κ B/MAPk activation underlies ACVR1-mediated inflammation in human heterotopic ossification. **JCI Insight**, v. 3, n. 22, p. e122958, Nov. 2018. doi: 10.1172/jci.insight.122958
- BRIDGES, A.J. *et al.* Fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva. **Semin Arthritis Rheum.**, v.24, p.155-164, 1994. doi: [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(94\)90071-x](https://doi.org/10.1016/0049-0172(94)90071-x)
- CONNOR, J.M.; EVANS, D.A.P. Fibrodysplasia ossificans progressiva: the clinical features and natural story of 34 patients. **J Bone Joint Surg [Br]**, v.64, p. 76- 83, 1982. doi: <https://doi.org/10.1302/0301-620X.64B1.7068725>
- DELAI, P. L. R. *et al.* Fibrodysplasia ossificans progressiva: a hereditary illness of multidisciplinary interest. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 5, p. 205-213, maio 2004.
- FU, Z. *et al.* Hesperidin protects against IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, p. 3721-7, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6616>.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. The pharmacological potential of hesperidin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 56, pp. 287-300, p. 287-300.
- HAIDARI, F. *et al.* Hesperidin supplementation modulates inflammatory responses following myocardial infarction. **Journal of the American College of Nutrition.** v. 3;

p. 205–211 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/07315724.2014.891269>.

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

HINO, K. *et al.* Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 112, n. 50, p. 15438-43, Dec. 2015. doi: 10.1073/pnas.1510540112

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

KAPLAN F.S. *et al.* The Fop Clinical Consortium: Medical management of fibrodysplasia ossificans progressiva: current treatment considerations. **Clin Proc Third Intl Symp FOP**, v. 1, p.1-52, 2001.

KATAGIRI, T.; TSUKAMOTO, S.; KURATANI, M. Heterotopic bone induction via BMP signaling: potencial therapeutic targets for fibrodysplasia ossificans progressiva. **Bone**, v. 109, p. 241-250, Apr., 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.07.024

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

LEGEAY, S. *et al.* Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. **Nutrients**, [s.L.], v.7, n.7, p. 5443-68, jul. 2015. doi: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fnu7075230>.

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

LEES-SHEPARD, J. B. *et al.* Palovarotene reduces heterotopic ossification in juvenile FOP mice but exhibits pronounced skeletal toxicity. **eLife**, v. 7, e40814, Sept. 2018. doi: 10.7554/eLife.40814

LU, Y.; YEAP, F.L. Poliphenolics of Salvia - a review. **Phytochemistry**, v. 59, n. 2, p.117-40, jan. 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00415-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00415-0).

MARTINS, A. S. *et al.* **Composições Farmacêuticas de Propranolol e Ácido Ascórbico e Usos**. BR 1020150324928, UFMG/UFMS, 23 dez. 2015.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, L.A.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v.19, n.1, p. , jan./mar. 2009. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200023>

MOSQUEDA-SOLÍS, A. *et al.* Hesperidin and capsaicin, but not the combination, prevent hepatic steatosis and other metabolic syndrome-related alterations in

western diet-fed rats. **Scientific Reports.**, v.8, n.1, p. 2018. DOI:10.1038/s41598-018-32875-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32875-4.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2020.

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

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

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST: Basic local alignment search tool**, Mar. 2017. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 10 jan. 2020.

OLMSTED-DAVIS, E. *et al.* Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 620-632, Feb. 2007. doi: 10.2353/ajpath.2007.060692.

PALHARES, D. B. Myositis ossificans progressive. **Calcified Tissue International**, v. 60, n. 4, p. 394, Apr. 1997. doi: 10.1007/s002239900250.

PALHARES, D. B.; LEME, L.M. Miosite ossificante progressiva: uma perspectiva no controle da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 5, p. 431-434, out. 2001. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572001000500016>

PALHARES, D. B. *et al.* Fibrodysplasia ossificans progressiva: oral ascorbate and intravenous bisphosphonate during flare-ups. **Journal of Musculoskeletal Pain**, v. 18, n. 3, p. 270-276, 2010. doi:10.3109/10582452.2010.501300

PALHARES D. B. *et al.* Propranolol and ascorbic acid in control of fibrodysplasia ossificans progressiva flare-ups due to accidental falls. **Intractable and Rare Diseases Research**, v. 8, n. 1, p. 24-28, Feb. 2019. doi: 10.5582/irdr.2018.01095

PARHIZ, H. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. **Phytother. Res.**, 29, p. 323-31, nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.5256>.

PATIN, G. Lettre XII. In: PETIT, J. (Ed.). **Lettres choisies de Feu Mr. Guy Patin**. v.1. Paris: Jean Petit, 1692. p. 32.

PIGNOLO, R. J.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 6, n. 80, p. 1-6, Dec. 2011. doi: 10.1186/1750-1172-6-80

SAITO, S.T. *et al.* A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 26, n. 2, April/June 2006. doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200023>

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

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

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

HORE, E.M. *et al.* A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. **Nature Genetics**, v. 38, n. 5, p. 525-527, May 2006. doi: 10.1038/ng1783

Tasic, L.; Tsukamoto, J.; Awan, A. T.; Durán, N. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130325856, data de depósito: 18/12/2013, título: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOETANOL, ESPERIDINA E NANOCELULOSE A PARTIR DE BAGAÇO DE LARANJA", Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit**, Sept. 2011. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041053.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2020.

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

VINCENT, S.; MARTY, L.; FORT, P. S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 6, p. 1498, Mar. 1993. doi: 10.1093/nar/21.6.1498

WANG, H. *et al.* Celular hypoxia promotes heterotopic ossification by amplifying BMP signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 9, p. 1652-1665, Sept. 2016. doi: 10.1002/jbmr.2848.

WENTWORTH, K. L.; MASHARANI, U.; HSIAO, E. C. Therapeutic advances for blocking heterotopic ossification in fibrodysplasia ossificans progressiva. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 1180-1187, June 2019. doi: 10.1111/bcp.13823

WOLKEN D. M.A. *et al.* The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in fibrodysplasia ossificans progressiva. **Bone**, v. 109, p. 210-217, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.06.01

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome do voluntário: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____ anos

Você está sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa “ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM FOPCON, FOPCON Plus e FOPCON Epi”.

A pesquisa é coordenada por Durval Batista Palhares, pesquisador da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que pode ser contatado pelo telefone (67) 99982- 1927, e-mail: dbpalhares@hotmail.com, ou no endereço profissional: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Av. Senador Filinto Muller, 355, Vila Ipiranga, Campo Grande/MS. Esta pesquisa foi previamente avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS que em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, pode ser contatada pelo telefone (67) 3345-7187, pelo e-mail: cepconep.propp@ufms.br, ou diretamente no campus da UFMS, localizado na Av. Costa e Silva, s/n – Prédio das Pró- Reitorias, 1º andar.

O objetivo desta pesquisa é investigar os efeitos do tratamento contínuo e prolongado (24 meses) da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), com um medicamento composto (patenteado como FOPCON). Nossa hipótese é de que o uso contínuo de FOPCON pode reduzir a ocorrência dos surtos inflamatórios e a formação de osso heterotópico. Queremos, também, saber se esse efeito pode ser melhorado com o uso adicional de FOPCON Plus ou FOPCON Epi. Assim, estudaremos três grupos de tratamento: (1) FOPCON; (2) FOPCON Plus; e (3) FOPCON Epi.

Ao concordar em participar da pesquisa, após avaliação clínica pelo pesquisador e sua equipe, você será alocado em um grupo e a medicação será manipulada de acordo com a sua idade e o seu peso, sob orientação médica. A medicação será disponibilizada gratuitamente e ajustada sempre que necessário. Caso você já receba FOPCON, o mesmo será mantido e poderá ser oferecido, adicionalmente, FOPCON Plus ou FOPCON Epi, que poderá ser identificado como “FOPCON Tarde”.

Concordando com a participação na pesquisa, você se compromete a tomar diariamente a medicação proposta (3x/dia), e a responder periodicamente a alguns questionários que poderão ser aplicados por telefone, vídeochamada ou formulário online. Visitas presenciais ou teleconsultas poderão ser necessárias para acompanhamento da evolução clínica e registro de imagens (foto e/ou vídeo). O tempo gasto com a resposta do questionário é de aproximadamente 15 minutos. Visitas ou teleconsultas poderão durar entre 30 e 60 minutos. Mediante o risco de constrangimento, você poderá autorizar ou não o registro de imagens ao final deste termo.

A participação na pesquisa também conta com sua doação de pequenas amostras de sangue e/ou de raspado da parte interna da bochecha (mucosa oral), antes e durante o tratamento. Essas amostras serão estocadas no Laboratório de Patologia Molecular/FAMED/UFMS, conforme a Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017, que rege as Normas Regulamentadoras para o armazenamento e uso de material biológico humano da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os materiais coletados serão utilizados exclusivamente nos estudos desenvolvidos dentro deste projeto. A coleta de sangue pode trazer desconforto momentâneo com dor leve e possível surgimento de hematoma no local da coleta. A coleta de mucosa oral costuma não causar dor. Você poderá concordar ou não com a coleta de sangue e/ou mucosa ao final deste termo.

Normalmente, a associação contida no FOPCON não apresenta efeitos colaterais quando administrada em doses adequadas. As substâncias adicionadas no FOPCON Plus ou FOPCON Epi, são compostos de origem natural, e habitualmente não apresentam efeitos

colaterais. Ao surgimento de sintomas como: redução da frequência cardíaca ou da pressão arterial, irritação gástrica, dor de estômago ou abdominal, dor de cabeça, alteração nos hábitos alimentares ou outro sintoma indesejado, o pesquisador responsável deverá ser contatado imediatamente, para que sejam tomadas as devidas providências. Ressaltamos que o uso de FOPCON Plus é contraindicado no período de gestação e lactação. Para controle de efeitos adversos, será necessário que você envie mensalmente dados pessoais como peso, frequência cardíaca e pressão arterial. Para sua segurança, a falta desses dados implicará no seu automático desligamento da pesquisa.

Em caso de gastos decorrentes de sua participação na pesquisa, você será ressarcido. Eventuais danos decorrentes da pesquisa serão devidamente indenizados. Para sua segurança e fidelidade dos resultados, é importante que você não inicie outros medicamentos para tratamento da FOP sem o conhecimento do pesquisador responsável. Entretanto, tratamentos de qualquer outra condição de saúde podem e devem ser mantidos junto aos médicos especialistas e às instituições de saúde de sua cidade, que devem ser também procuradas em casos de urgência médica.

Reforçamos que esforços repetitivos e atividades físicas extenuantes devem ser evitadas e medidas para prevenção de quedas e traumas devem ser mantidas, mesmo durante o tratamento com FOPCON.

Ao final da pesquisa, você poderá ter acesso aos resultados e se estes forem publicados em revistas científicas, garantimos total sigilo e privacidade das suas informações pessoais, bem como do seu rosto, caso a divulgação de imagens seja necessária. Você tem total liberdade para recusar participar deste projeto de pesquisa, agora ou em qualquer momento durante seu desenvolvimento. Este termo será preenchido e assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador principal e outra com você.

Eu, _____
_____, declaro ter sido informado(a) e esclarecido(a), e concordo voluntariamente com a participação na pesquisa, incluindo as seguintes condições:

- () Autorizo o registro de imagens por foto e/ou vídeo.
- () Não autorizo o registro de imagens por foto e/ou vídeo.
- () Autorizo a coleta de sangue, se for solicitado.
- () Não autorizo a coleta de sangue durante a pesquisa.
- () Autorizo a coleta de raspado da mucosa da boca, se for solicitado.
- () Não autorizo a coleta de raspado da mucosa da boca durante a pesquisa.

Campo Grande, MS, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura da testemunha

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - Responsável

Nome do voluntário: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____ anos

Seu (sua) filho(a) está sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa “ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM FOPCON, FOPCON Plus E FOPCON Epi”.

A pesquisa é coordenada por Durval Batista Palhares, pesquisador da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que pode ser contatado pelo telefone (67) 99982-1927, e-mail: dbpalhares@hotmail.com, ou no endereço profissional: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Av. Senador Filinto Muller, 355, Vila Ipiranga, Campo Grande/MS. Esta pesquisa foi previamente avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS que em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, pode ser contatada pelo telefone (67) 3345-7187, pelo e-mail: cepconep.propp@ufms.br, ou diretamente no campus da UFMS, localizado na Av. Costa e Silva, s/n – Prédio das Pró-Reitorias, 1º andar.

O objetivo desta pesquisa é investigar os efeitos do tratamento contínuo e prolongado (24 meses) da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), com um medicamento composto (patenteado como FOPCON). Nossa hipótese é de que o uso contínuo de FOPCON pode reduzir a ocorrência dos surtos inflamatórios e a formação de osso heterotópico. Queremos, também, saber se esse efeito pode ser melhorado com o uso adicional de FOPCON Plus ou FOPCON Epi. Assim, estudaremos três grupos de tratamento: (1) FOPCON; (2) FOPCON Plus; e (3) FOPCON Epi.

Ao concordar em participar da pesquisa, após avaliação clínica pelo pesquisador e sua equipe, dependendo do grupo que seu(sua) filho(a) participar, a medicação será manipulada de acordo com a idade e o peso do(a) seu(sua) filho(a), que será disponibilizada gratuitamente e ajustada sempre que necessário, sob orientação médica. Caso ele(a) já receba FOPCON, o mesmo será mantido e poderá ser oferecido, adicionalmente, FOPCON Plus ou FOPCON Epi, que poderá ser identificado como “FOPCON Tarde”.

Concordando com a participação na pesquisa, o voluntário se compromete a tomar diariamente a medicação proposta (3x/dia), e a responder periodicamente a alguns questionários que poderão ser aplicados por telefone, vídeochamada ou formulário online. Visitas presenciais ou teleconsultas poderão ser necessárias para acompanhamento da evolução clínica e registro

de imagens (foto e/ou vídeo). O tempo gasto com a resposta do questionário é de aproximadamente 15 minutos. Visitas ou teleconsultas poderão durar entre 30 e 60 minutos. Mediante o risco de constrangimento, você poderá autorizar ou não o registro de imagens ao final deste termo

A participação na pesquisa também conta com a doação de pequenas amostras de sangue e de raspado da parte interna da bochecha (mucosa oral), antes e durante o tratamento. Essas amostras serão estocadas no Laboratório de Patologia Molecular/FAMED/UFMS, conforme a Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017, que rege as Normas Regulamentadoras para o armazenamento e uso de material biológico humano da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os materiais coletados serão utilizados exclusivamente nos estudos desenvolvidos dentro deste projeto. A coleta de sangue pode trazer desconforto momentâneo com dor leve e possível surgimento de hematoma no local da coleta. A coleta de mucosa oral costuma não causar dor. Você poderá concordar ou não com a coleta de sangue e/ou mucosa ao final deste termo.

Normalmente, a associação contida no FOPCON não apresenta efeitos colaterais quando administrada em doses adequadas. As substâncias adicionadas no FOPCON Plus ou FOPCON Epi, são compostos de origem natural, e habitualmente não apresentam efeitos colaterais. Ao surgimento de sintomas como: redução da frequência cardíaca ou da pressão arterial, irritação gástrica, dor de estômago ou abdominal, dor de cabeça, alteração nos hábitos alimentares ou outro sintoma indesejado, o pesquisador responsável deverá ser contatado imediatamente, para que sejam tomadas as devidas providências. Ressaltamos que o uso de FOPCON Plus é contraindicado no período de gestação e lactação. Para controle de efeitos adversos, será necessário que você envie mensalmente dados pessoais do voluntário, como peso, frequência cardíaca e pressão arterial. Para segurança do participante, a falta desses dados implicará no automático desligamento da pesquisa.

Em caso de gastos decorrentes da participação na pesquisa, você será ressarcido. Eventuais danos decorrentes da pesquisa serão devidamente indenizados. Para sua segurança e fidelidade dos resultados, é importante que não sejam iniciados outros medicamentos para tratamento da FOP sem o conhecimento do pesquisador responsável. Entretanto, tratamentos de qualquer outra condição de saúde podem e devem ser mantidos junto aos médicos especialistas e às instituições de saúde de sua cidade, que devem ser também procuradas em casos de urgência médica.

Reforçamos que esforços repetitivos e atividades físicas extenuantes devem ser evitadas e medidas para prevenção de quedas e traumas devem ser mantidas, mesmo durante o tratamento com FOPCON.

Ao final da pesquisa, você poderá ter acesso aos resultados e se estes forem publicados em revistas científicas, garantimos total sigilo e privacidade das suas informações pessoais, bem como do seu rosto, caso a divulgação de imagens seja necessária. Você tem total liberdade para recusar participar deste projeto de pesquisa, agora ou em qualquer momento durante seu desenvolvimento. Você tem total liberdade para recusar a participação neste projeto de pesquisa, agora ou em qualquer momento durante seu desenvolvimento. Este termo será preenchido e assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador principal e outra com você, como responsável legal do participante.

Eu,

_____,
declaro ter sido informado(a) e esclarecido(a), e concordo voluntariamente com a participação do menor: _____ na pesquisa, incluindo as seguintes condições:

- () Autorizo o registro de imagens por foto e/ou vídeo.
- () Não autorizo o registro de imagens por foto e/ou vídeo.
- () Autorizo a coleta de sangue, se for solicitado.
- () Não autorizo a coleta de sangue durante a pesquisa.
- () Autorizo a coleta de raspado da mucosa da boca, se for solicitado.
- () Não autorizo a coleta de raspado da mucosa da boca durante a pesquisa.

Campo Grande, MS, _____ de _____ de _____

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura da testemunha

Apêndice C - Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (TALE)

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____ anos.

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “ASPECTOS CLÍNICOS E BIOLÓGICOS EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA EM TRATAMENTO COM FOPCON”, realizada por Durval Batista Palhares e sua equipe. Queremos saber se as dores e o osso formado por causa da FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA (FOP) podem diminuir se você tomar um remédio específico todos os dias.

Se você e seus pais (ou responsáveis) aceitarem participar da pesquisa, você será avaliado por um médico e vai receber de graça um remédio para tomar todos os dias, o FOPCON. De vez em quando você precisará responder algumas perguntas para sabermos como você tem se sentido.

Para estudarmos os efeitos do remédio dentro do seu corpo, se você concordar vamos precisar coletar um pouco do seu sangue e um raspado do lado de dentro da sua bochecha, algumas vezes durante a pesquisa. Essas amostras ficarão guardadas em lugar seguro, obedecendo as regras da universidade - UFMS (Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017).

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

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

Normalmente, quando indicado por um médico, esse remédio não apresenta efeitos colaterais. Isso quer dizer que ele não vai fazer mal para você. Mas, se tomando FOPCON você sentir dores na barriga, enjôo, ou alguma sensação ruim e diferente depois de começar a usar o remédio, você precisa avisar seus pais e eles poderão procurar o pesquisador pelo telefone (67) 99982-1927, para que ele e sua equipe cuidem de você.

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

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

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

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

- ☐ () Eu deixo tirarem fotos ou filmarem vídeos.
- ☐ () Eu concordo em doar uma amostra de sangue se me pedirem.
- ☐ () Eu concordo em doar uma amostra da parte de dentro da bochecha se me pedirem.
- ☐ () Eu não quero que tirem fotos ou gravem vídeos.
- ☐ () Eu não quero doar uma amostra de sangue.
- ☐ () Eu não quero doar uma amostra da parte de dentro da bochecha.

_____, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura da testemunha

APÊNDICE D

QUESTIONÁRIO – PESQUISA FOP-UFMS

Data de preenchimento : Clique ou toque aqui para inserir uma data.

1. Nome: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
2. Documento (RG ou CPF): Clique ou toque aqui para inserir o texto.
3. Gênero: Escolher um item. 4. Data de Nascimento: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
5. Cidade/Estado: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
6. Telefone(s) para contato: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
7. E-mail: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
8. Há quanto tempo você faz tratamento com FOPCON? Clique ou toque aqui para inserir o texto.
9. Qual FOPCON você tomou nos últimos 6 meses? Escolher um item.
- Outro: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

As crises de FOP ou *flare-ups* são episódios inflamatórios em que aparecem inchaços localizados e dolorosos em partes (tecidos) moles do corpo. As perguntas 10 a 18 são sobre essas crises.

10. Quando foi a sua última crise? Escolher um item.
11. Quantas crises de FOP você teve nos últimos 6 meses? Escolher um item.

Responda as perguntas 12 a 18 considerando as crises que você apresentou nos últimos 6 meses.

12. Qual o local acometido nessa(s) crise(s)? Clique ou toque aqui para inserir o texto.
 13. Quais foram os principais sintomas de suas crises?
- | | |
|---|---|
| ☐ Edema (inchaço) | ☐ Dores localizadas |
| ☐ Vermelhidão | ☐ Calor local |
| ☐ Rigidez da articulação | ☐ Diminuição de movimentos |

Outro: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

14. Considerando 10 (dez) para dor máxima ou insuportável, e 0 (zero) para nenhuma dor, que número representa melhor a dor que você sente durante uma crise?



Nota: Escolher um item.

15. A(s) crise(s) de FOP que você apresentou nos últimos 6 meses pode(m) estar associada(s) a alguma(s) das situações abaixo?

- ☐ Estresse emocional (ex.: mudança de rotina, perda de parentes, felicidade ou tristeza extrema...)
- ☐ Traumas físicos (ex.: quedas, contusões...)
- ☐ Vacinas ou injeções

- ☐ Infecção ou síndrome viral (ex.: gripe, resfriado, Covid-19, dengue...)
- ☐ Cirurgias
- ☐ Uso excessivo dos braços ou pernas (ex.: trabalho intenso ou prática de esporte)
- ☐ Interrupção do FOPCON.
- ☐ As crises foram espontâneas

16. Você teve alguma sequela após a(s) crise(s)? Escolher um item.

Para outra sequela, especifique: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

17. Você parou de tomar FOPCON durante a crise? Escolher um item.

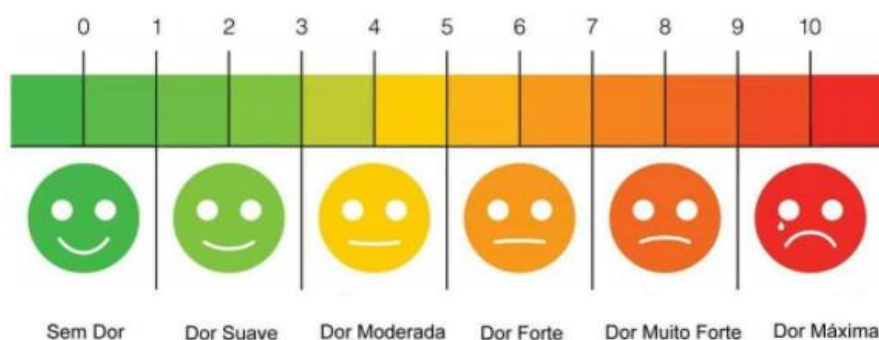
18. Você tomou outro remédio durante a crise? Escolher um item.

Se sim, qual remédio você tomou? Clique ou toque aqui para inserir o texto.

19. Nos últimos 6 meses, como você tomou FOPCON? Escolher um item.

20. Você sente dores no corpo mesmo sem estar em crise da FOP (*flare-up*)? Escolher um item.

21. Se sim, considerando 10 para dor máxima, insuportável e 0 (zero) para nenhuma dor, que número representa melhor a dor que você sente?



Nota: Escolher um item.

22. Você tem dificuldades para dormir? Escolher um item.

23. Se sim, o que você acha que atrapalha o seu sono? Escolher um item.

Se outro motivo, especifique: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

24. Como você considera a evolução da sua FOP nos últimos 6 meses? Escolher um item.

Explique: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

Muito obrigado por sua participação.
Equipe FOP - UFMS

APÊNDICE E

[WHOQOL-bref\(1\)](#)

APÊNDICE F - ESCALA DE KATZ

ÍNDICE DE KATZ – De Independência nas Atividades de Vida Diária

Tentar obter essas informações com o paciente caso seja possível.

1. Tomar banho (esponja, chuveiro ou banheira):

(I) Não precisa de ajuda;

(I) Precisa de ajuda apenas para lavar uma parte do corpo;

(D) Precisa de ajuda para higiene completa (ou não toma banho).

2. Vestir-se:

(I) Pega as roupas e veste-se sem nenhuma ajuda;

(I) Pega as roupas e veste-se sem ajuda, com exceção de amarrar os sapatos;

(D) Precisa de ajuda para pegar as roupas ou para se vestir, ou fica parcial ou completamente não vestido.

3. Ir ao banheiro:

(I) Vai ao banheiro, faz a higiene, e se veste sem ajuda (mesmo usando um objeto para suporte como bengala, cadeira de rodas, e pode usar urinol à noite, esvaziando este de manhã);

(D) Recebe ajuda para ir ao banheiro, ou para fazer higiene, ou para se vestir depois de usar o banheiro, ou para o uso do urinol à noite;

(D) Não vai ao banheiro fazer suas necessidades.

4. Locomoção:

(I) Entra e sai da cama, assim como da cadeira, sem ajuda (pode estar usando objeto para suporte, como bengala ou andador);

(D) Entra e sai da cama ou da cadeira com ajuda;

(D) Não sai da cama.

5. Continência:

(I) Controla a urina e movimentos do intestino completamente, por si próprio;

(D) Tem acidentes ocasionais;

(D) Supervisão ajuda a manter o controle da urina e do intestino, cateter é usado ou é incontinente.

6. Alimentação:

(I) Alimenta-se sem ajuda;

(I) Alimenta-se com exceção no caso de cortar carne ou passar manteiga no pão;

(D) Recebe ajuda para se alimentar ou é alimentado parcial ou completamente por meio de tubos ou fluído intravenosos.

Quando o paciente não souber informar, favor anotar que a informação não foi dada por ele.

Resultados:

A. Independente em tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro, locomoção, continência e alimentação;

B. Independente para todas as funções anteriores, exceto uma;

C. Independente para todas exceto tomar banho e outra função adicional;

D. Independente para todas as funções exceto tomar banho, vestir-se e outra função adicional;

E. Independente para todas as funções exceto tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro e outra função adicional;

F. Independente para todas as funções exceto tomar banho, vestir-se, ir ao banheiro, alimentação e outra função adicional;

G. Dependente em todas as seis funções;

H. Dependente em ao menos duas funções, mas não pode ser classificado como **C, D, E e F.**

APÊNDICE G - CAJIS E GONIOMETRIA (Adaptado)

CAJIS e GONIOMETRIA

Incapacidade	Sim	Não
Caminha	☐	☐
Usa cadeira de rodas	☐	☐
Necessita de alguma ajuda nas Atividades de Vida Diária	☐	☐
Necessita de total ajuda nas Atividades de Vida Diária	☐	☐

	Afetado (1)*	Funcionalmente anquilosado (2)*	Goniometria
Pescoço			
Coluna torácica e lombar			
Mandíbula			
Ombro D			
Ombro E			
Cotovelo D			
Cotovelo E			
Punho D			
Punho E			
Quadril D			
Quadril E			
Joelho D			
Joelho E			
Tornozelo D			
Tornozelo E			
Subtotal			
Total			

*Considerar: 0 (zero) = mobilidade normal a déficit <10%; 1 (um) = déficit de 10%-90%; 2 (dois) = déficit ≥ 90%. **Examinador:**

Fonte: KAPLAN; AL MUKADDAM; PIGNOLO (2017). (adaptado).

APÊNDICE H - Brief Medication Questionnaire

1) Quais medicações que você usou na ÚLTIMA SEMANA?

Entrevistador: Para cada medicação anote as respostas no quadro abaixo:

Se o entrevistado não souber responder ou se recusar a responder coloque NR

NA ÚLTIMA SEMANA

a) Nome da medicação e dosagem	b) Quantos dias você tomou esse remédio	c) Quantas vezes por dia você tomou esse remédio	d) Quantos comprimidos você tomou em cada vez	e) Quantas vezes você esqueceu de tomar algum comprimido	f) Como essa medicação funciona para você 1 = Funciona Bem 2 = Funciona Regular 3 = Não funciona bem

2) Alguma das suas medicações causa problemas para você? (0) Não (1) Sim

a) Se o entrevistado respondeu SIM, por favor, liste os nomes das medicações e quanto elas o incomodam

Quanto essa medicação incomodou você?

Medicação	Muito	Um pouco	Muito pouco	Nunca	De que forma você é incomodado por ela?

3) Agora, citarei uma lista de problemas que as pessoas, às vezes, têm com seus medicamentos.

Quanto é difícil para você:	Muito difícil	Um pouco difícil	Não muito difícil	Comentário (Qual medicamento)
Abrir ou fechar a embalagem				
Ler o que está escrito na embalagem				
Lembrar de tomar todo remédio				
Conseguir o medicamento				
Tomar tantos comprimidos ao mesmo tempo				

Escore de problemas encontrados pelo BMQ

DR – REGIME (questões 1a-1e)	1 = sim	0 = não
DR1. O R falhou em listar (espontaneamente) os medicamentos prescritos no relato inicial?	1	0
DR2. O R interrompeu a terapia devido ao atraso na dispensação da medicação ou outro motivo?	1	0
DR3. O R relatou alguma falha de dias ou de doses?	1	0
DR4. O R reduziu ou omitiu doses de algum medicamento?	1	0
DR5. O R tomou alguma dose extra ou medicação a mais do que o prescrito?	1	0
DR6. O R respondeu que “não sabia” a alguma das perguntas?	1	0
DR7. O R se recusou a responder a alguma das questões?	1	0
NOTA: ESCORE ≥ 1 INDICA POTENCIAL NÃO ADESAO soma:		Tregime
CRENÇAS		
DC1. O R relatou “não funciona bem” ou “não sei” na resposta 1g?	1	0
DC2. O R nomeou as medicações que o incomodam?	1	0
NOTA: ESCORE ≥ 1 INDICA RASTREAMENTO POSITIVO PARA BARREIRAS DE CRENÇAS soma:		Tcrenças
RECORDAÇÃO		
DRE1. O R recebe um esquema de múltiplas doses de medicamentos (2 ou mais vezes/dia)?	1	0
DRE2. O R relata “muita dificuldade” ou “alguma dificuldade” em responder a 3c?	1	0
NOTA: ESCORE ≥ 1 INDICA ESCORE POSITIVO PARA BARREIRAS DE RECORDAÇÃO soma:		Trecord

R = respondente NR = não respondente

Fonte: BEN; NEUMANN; MENGUE (2012).

APÊNDICE I - Teste de Morisky-Green

ITENS	PONTUAÇÃO	
1. Alguma vez você se esqueceu de tomar os medicamentos para sua doença?	Sim (0)	Não (1)
2. Alguma vez você foi descuidado com os horários de tomar os medicamento?	Sim (0)	Não (1)
3. Alguma vez você deixou de tomar os medicamentos para a sua doença, por se sentir melhor?	Sim (0)	Não (1)
4. Alguma vez você deixou de tomar os medicamentos para a sua doença, por iniciativa própria, após ter se sentido pior?	Sim (0)	Não (1)
Na ocorrência de pelo menos uma resposta sim, aplicar as duas questões seguintes.		
	Motivação	Conhecimento
5. Você foi informado sobre a importância e benefício de usar o medicamento?	—	Sim/não
6. Você se esquece de repor os medicamentos antes que terminem?	Sim/não	—

Escore: 0 a 1 = baixa adesão; 2 a 3 = média adesão; 4 pontos = alta adesão

*Adaptado de MORISKY et al.²⁸

Fonte: CORNÉLIO et al. (2009).

ANEXO B- TERMO DE RESPONSABILIDADE ORÇAMENTÁRIA

IAPES - Instituto de Assistência e Pesquisa em Educação e Saúde
Rua Mar das Antilhas, n. 19, Chácara Cachoeira • Campo Grande – MS • CEP: 79.040-080
CNPJ (MF) n. 09.195.485/0001-90 • OSCIP (MJ) n. 08071.000190/2008-07

**TERMO DE RESPONSABILIDADE**

O INSTITUTO DE ASSISTÊNCIA E PESQUISA EM EDUCAÇÃO E SAÚDE - IAPES, pessoa jurídica de direito privado, sem lucrativos, inscrita no CNPJ/MF sob o número 09.195.485/0001-90, com sede na Rua Mara das Antilhas, n. 19, Chácara Cachoeira, em Campo Grande - MS, por intermédio de sua representante legal, Fernanda Gomes de Araújo, brasileira, advogada, CPF/MF n. 868.772.401-20, residente e domiciliada nesta capital, vem respeitosamente **DECLARA** para os devidos fins que **CONCORDA** com o apoio financeiro da pesquisa referente ao projeto "ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, PROPRANOLOL, HESPERIDINA E EPIGALOCATEQUINA", a ser realizado no período de dezembro de 2020 a dezembro de 2024.

Sem mais e por ser expressão da verdade, firma o presente Termo.

Campo Grande - MS, 11 de novembro de 2020.


Fernanda Gomes de Araújo
Presidente do IAPES

Apêndice E - Instrumento de coleta- parte 2

Pós uso do FOPCON

Data de preenchimento: _____ / _____ / _____

ID do Paciente: _

19. Com que idade você começou a tomar FOPCON? _____ anos e _____ meses.

20. Você teve alguma intolerância ao FOPCON? () Sim () Não

21. Você apresentou algum efeito colateral com FOPCON? Se "SIM", qual? ()
Sim. Especifique:

() Não

22. Marque no quadro abaixo a ocorrência de alterações em sua frequência cardíaca, pressão arterial e função renal, após o início de FOPCON:

Frequência cardíaca () Mais baixa () Mais alta () Não houve alteração

Pressão arterial () Mais baixa () Mais alta () Não houve alteração

eve problemas renais? () Sim () Não

23. Teve novas ossificações após o início de FOPCON? () Sim () Não

27. Alguma(s) de suas ossificações diminuiu de volume após o início de FOPCON? () Sim () Não

28. Você perdeu algum movimento após ter iniciado FOPCON? Se "SIM", qual? ()
Sim. Especifique:

() Não

29. Você recuperou algum movimento após ter iniciado o FOPCON? Se "SIM", qual? () Sim. Especifique:

() Não

30. Qual a porcentagem indica a ocorrência de sua crise da FOP como resultado de trauma, estresse, virose ou uso excessivo do membro?

() 0 % () 41-60%

() 1-20% () 61-80%

() 21-40% () 81-100%

Observação:

Quem respondeu o questionário? () O próprio paciente.

() Outra pessoa. Por favor, especifique na linha abaixo nome e grau de parentesco: