Universidade de São Paulo

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Departamento de Psicologia Experimental

**Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na
atividade da telomerase nas células mononucleadas do
sangue periférico**

Aluno: Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

São Paulo

2020

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

**Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na
atividade da telomerase nas células mononucleadas do
sangue periférico**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Psicologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fernandes da Costa.

Coorientação: Profa. Dra. Daniela Maria Oliveira Bonci e; Prof. Dr. Wellington Zangari.

São Paulo

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Corrêa de Paula Santos, Anderson Josué

Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade da telomerase nas
células mononucleadas do sangue periférico / Anderson Josué Corrêa de Paula
Santos; orientador Marcelo Fernandes da Costa; co-orientadora Daniela Maria
Oliveira Bonci. -- São Paulo, 2020.

156 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental) --
Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2020.

1. PSICOLOGIA EXPERIMENTAL. 2. HIPNOSE. 3. MEDITAÇÃO
(PSICOLOGIA). 4. HIPNOTERAPIA (TERAPÊUTICA MÉDICA). 5. TELÔMERO.
I. Fernandes da Costa, Marcelo , orient. II. Oliveira Bonci, Daniela Maria , co-
orient. III. Título.

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade da telomerase nas células mononucleadas do sangue periférico

Versão corrigida da tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 15 de outubro de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Fernandes da Costa - IP USP (Presidente / Não votante)

Prof. Dr. Avelino Luiz Rodrigues – IP USP (Titular) /

Parecer: APROVADO

Prof. Dr. Humberto Miguel Garay Malpartida – EACH USP (Titular) /

Parecer: APROVADO

Profa. Dra. Fatima Regina Machado – Sem Vínculo - IP USP (Titular) /

Parecer: APROVADO

Profa. Dra. Raquel de Melo Alves Paiva – SBIB – Externo /

Parecer: APROVADO

Profa. Dra. Fernanda Agostini Rocha – SBIB – Externo /

Parecer: APROVADO

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Fernandes da Costa, pela orientação e por acolher esse projeto multidisciplinar e desafiador.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Wellington Zangari por inspirar a ideia desse projeto junto com seu orientando Guilherme Raggi nas reuniões do GEHIP, por sua orientação, apoio, parcerias estabelecidas com outros profissionais e por todos os ensinamentos técnicos em hipnose.

À minha coorientadora Profa. Dra. Daniela Maria Oliveira Bonci por sua orientação, apoio, dedicação, por todos o suporte técnico em Biologia e por me conectar com outros profissionais e departamentos.

Ao Dr. Danilo Forghieri Santaella por sua ajuda na elaboração do projeto e revisão do protocolo de meditação.

Ao psicólogo André Renato Rizzi por sua grande ajuda na elaboração do protocolo de hipnose, no amadurecimento do projeto e na elaboração do protocolo de meditação e relaxamento.

À Dra. Raquel Paiva e à sua orientanda Caroline Mitiká Watanabe por todo o seu suporte na etapa prática desse estudo.

À cada voluntário e voluntária que dedicou o seu tempo, recursos e energia para a participação nesse estudo durante 4 meses.

À CAPES pela bolsa que possibilitou à dedicação necessária para que esse estudo acontecesse.

À minha companheira Gisele Corcino de Souza por seu constante apoio.

Aos meus tios Sonia Maria Corrêa de Paula, Maria Aparecida Corrêa de Paula e José Francisco Corrêa de Paula e à minha avó por terem despertado em mim o interesse pela ciência desde muito cedo.

À minha mãe Maria Luiza Corrêa de Paula por todo o incentivo que me deu e por sempre acreditar em mim, não importando o quão difícil parece ser a atividade que me proponho a realizar.

Resumo

SANTOS, A.J.C.P. **Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade da telomerase nas células mononucleadas do sangue periférico.**

Tese de Doutorado – Instituto de Psicologia – Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2020.

Introdução: A prática milenar da meditação tem recebido uma crescente atenção por parte da ciência. Têm-se estudado os efeitos dessa prática no DNA humano, incluindo seus efeitos no comprimento dos telômeros e na atividade da enzima telomerase, responsável pela regeneração dos telômeros perdidos durante a divisão celular. Os telômeros são fundamentais para o bom funcionamento das células, visto que o potencial replicativo das células saudáveis é diretamente proporcional a quantidade de telômeros presentes nas mesmas. A hipnose clínica tem diversas propriedades terapêuticas, dentre as quais, emular os efeitos da meditação de maneira guiada e controlada pelo terapeuta. **Objetivo:** O propósito principal desse estudo foi comparar experimentalmente os efeitos da meditação e da hipnose na saúde dos sujeitos que passaram por tais práticas, utilizando a atividade da telomerase (AT) das células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) como biomarcador para tais efeitos. **Materiais e Métodos:** Para comparar a meditação e a hipnose, foi conduzido um experimento longitudinal. Cada sujeito participou do estudo sendo exposto por 4 meses, a intervenções diárias por meio de uma gravação e a três coletas de sangue para que fosse obtida uma curva da atividade de telomerase em seu PBMC. Os sujeitos foram alocados aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais disponíveis, sendo esses: Hipnose, Meditação, Relaxamento e Controle. O grupo “relaxamento” foi um controle positivo para as expectativas acerca da meditação. Questionários de saúde e da psicofísica avaliando expectativas e bem-estar ajudaram a enriquecer os resultados obtidos. A análise da AT das células viáveis se deu pelo kit comercial TrapEZE XL seguindo o seu protocolo. **Resultados:** Em relação a AT não foram obtidos resultados que sugeriram alterações significativas na AT dos sujeitos decorrentes da exposição aos tratamentos. Os sujeitos relataram melhora em sua saúde e

outros efeitos positivos decorrentes do uso das técnicas de meditação, hipnose e relaxamento desenvolvidos no presente estudo. **Discussão e Conclusão:** Embora o presente estudo não ofereça evidências dos efeitos das práticas na AT, investigações complementares se fazem necessárias. Em relação às amostras coletadas é preciso realizar a medição do comprimento do telômero das PBMCs e também é importante repetir o estudo aumentando o arcabouço amostral aumentar a validade externa do estudo.

Palavras-chave: Psicologia Experimental; Hipnose; Meditação; Hipnoterapia; Telômero.

Abstract

SANTOS, A.J.C.P. Effects of meditation and hypnotic suggestion on telomerase activity in peripheral blood mononucleated cells. Doctoral Thesis - Institute of Psychology - University of São Paulo. São Paulo - SP, 2020.

Introduction: The ancient practice of meditation has received increasing attention from science overtime. The effects of this practice on human DNA have been studied, including its effects on the telomere's length and on the activity of the telomerase enzyme, responsible for regenerating the telomeres lost during cell division. The telomere is fundamental for the proper functioning of cells, since the replicative potential of healthy cells is directly proportional to the amount of telomere present in them. Clinical hypnosis has several therapeutic properties, among which, emulating the effects of meditation in a guided and controlled manner by the therapist. **Objective:** The main purpose of this study was to experimentally compare the effects of meditation and hypnosis on the health of the volunteers who underwent such practices, using the telomerase activity (TA) from peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) as a biomarker for such effects. **Materials and Methods:** To compare both techniques, a longitudinal experiment was conducted. Each volunteer who participated in the study was exposed for 4 months to daily interventions through a recording and to three blood collections to obtain a telomerase activity curve in their PBMC. The subjects were randomly allocated to one of the four available experimental groups, namely: Hypnosis, Meditation, Relaxation and Control. The "relaxation" group was a positive control for the expectations towards meditation. Health and psychophysical questionnaires assessing expectations and well-being helped to enrich the results obtained. The TA analysis of viable cells was carried out using the TrapEZE XL commercial kit by following its protocol. **Results:** Regarding TA, no results suggesting significant changes in the TA of the subjects resulting from exposure to treatments were obtained. The subjects reported improvement in their health and other positive effects resulting from the use of meditation, hypnosis and relaxation techniques developed in the present study. **Discussion and Conclusion:** Although the present study does not offer evidence of the

effects of meditation and hypnosis on TA, complementary investigations are necessary. Regarding to the collected samples, it is necessary to measure their telomere length on PBMCs and it is also important to repeat this study, increasing the sample framework to improve the external validity of the study.

Keywords: Experimental Psychology; Hypnosis; Meditation; Hypnotherapy; Telomere.

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Imunidade humoral e imunidade mediada por célula.....	26
Figura 2- Separação por densidade Ficoll-Paque Plus®: PBMC está representado em cinza.....	47
Figura 3- Tubo Falcon após centrifugação do Ficoll + Sangue em PBS	48
Figura 4 - Site da Merck onde o KIT TRAPeze XL é vendido	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Regressão linear dos dados que gera a equação determinante para a concentração das amostras	54
Gráfico 2: Curva Controle de TSR8 - Bateria 1.	68
Gráfico 3 Curva TSR8 - Bateria 1.....	68
Gráfico 4 - Atividade de telomerase nas amostras da bateria 1 (parte 1)	69
Gráfico 5 - Atividade de telomerase nas amostras da bateria 1 (parte 2)	69
Gráfico 6 - Curva Controle de TSR8 (bateria 2)	71
Gráfico 7 - Curva TSR8 - Bateria 2	72
Gráfico 8 - Atividade de telomerase nas amostras da bateria 2 (parte 1)	72
Gráfico 9 - Atividade de telomerase nas amostras da bateria 2 (parte 2)	73
Gráfico 10 - Curva Controle de TSR8 (bateria 3)	74
Gráfico 11 - Curva TSR8 - Bateria 3	75
Gráfico 12 - Atividade de telomerase nas amostras da bateria 3 (parte 1)	75
Gráfico 13 - Atividade de telomerase nas amostras da bateria 3 (parte 2)	76
Gráfico 14 Resumo dos resultados da bateria 1 (valores de TPG) - Grupos 1 e 2	77
Gráfico 15 - Resumo dos resultados da bateria 1 (valores de TPG) - Grupos 3 e 4	78
Gráfico 16 - Resumo dos resultados da bateria 3 (valores de TPG) - Grupos 1 e 2	80
Gráfico 17 - Resumo dos resultados da bateria 3 (valores de TPG) - Grupos 3 e 4	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Células e moléculas solúveis do sistema imunológico	23
Tabela 2 - Delineamento Experimental	41
Tabela 3 - Absorbância da curva BSA vs CHAPS.....	54
Tabela 4 - Dados do pré-teste obtidos no espectrofotômetro	55
Tabela 5 - Preparação da placa	59
Tabela 6 – Preparação do tampão para mensurar fluorescência.....	60
Tabela 7 - Faixas de leitura que devem ser usadas no equipamento	61
Tabela 8 – Resultados do Questionário Preparatório.....	63
Tabela 9 - Resultado das expectativas acerca do relaxamento guiado	64
Tabela 10 - Resultados das expectativas acerca da Meditação.....	65
Tabela 11 - Resultados das expectativas acerca da Hipnose	66
Tabela 12 - Curva Controle de TSR8 (bateria 1).....	67
Tabela 13 - Curva Controle de TSR8 (bateria 3).....	74
Tabela 14 - Resumo dos resultados da bateria 1 (valores de TPG).....	77
Tabela 15 - Resumo dos resultados da bateria 3 (valores de TPG).....	79
Tabela 16 - Avaliação da percepção dos resultados do tratamento usando a escala de Centimax (Anexo 7).	81
Tabela 17 - Curva para o cálculo da concentração das amostras medida em 10/11/2019	148
Tabela 18 - Concentração final e diluição necessária para atingir a contração desejada.....	149
Tabela 20 - Concentração final e diluição necessária para atingir a contração desejada.....	150
Tabela 21 -Curva para o cálculo da concentração das amostras medida em 26/11/2019.	151
Tabela 22 - Concentração final e diluição necessária para atingir a contração desejada.....	152
Tabela 23 - Resultados e análises básicas das amostras da bateria 1	152
Tabela 24 - Curva Controle de TSR8 (bateria 2).....	153
Tabela 25 - Resultados e análises básicas das amostras da bateria 2.....	154
Tabela 26 - Resultados e análises básicas das amostras da bateria 3.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma (1 x 10 ⁻⁶ gramas)
µl	Microlitro (1 x 10 ⁻⁶ litros)
APA	<i>American Psychological Association</i>
Art.	Artigo
AT	Atividade de Telomerase
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine Serum Albumin ¹
CHAPS	CHAPS Detergent (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate)
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
DCs	Células Dendríticas
dH2O	Água destilada
Dkc1	<i>Diskerin 1</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>
Ficoll	Ficoll-Paque Plus®
GEHIP	Grupo de Estudo de Hipnose – USP
H ₀	Hipótese inicial
HTert	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>

¹ Nome utilizado em inglês para diferenciar o Soro Fetal Bovino que acompanha o kit BCA

LTs	Linfócitos T
MBG water	Molecular Biology Grade Water
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro (1 x 10 ⁻³ litros)
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Nome dado para um reagente)
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Software estatístico)
TA	<i>Telomerase Activity (AT)</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TERC	<i>Telomerase RNA Component</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TRAP	<i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i>
TrisHCl	<i>Trizma hydrochloride</i>
TTAGGG	<i>Timina-Timina-Adenina-Guanina-Guanina-Guanina</i>
WICF	<i>Written Informed Consent Form (TCLE)</i>

SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VII
LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE GRÁFICOS	IX
Sumário	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	30
3. JUSTIFICATIVA	31
4. VARIÁVEIS E HIPÓTESES:	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 - Levantamento de dados secundários	34
5.2 - Auto percepção dos resultados do tratamento	35
5.3 - Experimento	35
5.4 - Desenho Experimental	41
5.5 - Considerações de segurança	43
5.6 - Condição cega	43
5.7 - Pré-testes	45
5.8 - Análises laboratoriais	46
5.9 Expectativas	61
6. RESULTADOS	62
6.1 - Arcabouço amostral	62
6.2 - Questionário Preparatório	62
6.3 - Questionário de expectativas	63

6.4 - Análises laboratoriais	66
6.5 - Auto percepção dos resultados do tratamento	80
6.6 - Relatos	81
7. DISCUSSÃO	84
7.1 - Desenho Experimental	85
7.2 - Atividade da Telomerase	85
7.3 - Auto percepção dos resultados do tratamento	86
7.4 - Relatos	87
7.5 - Limitações	89
8. CONCLUSÕES	93
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
Anexo 1 – TCLE	100
Anexo 2 - Avaliação das expectativas acerca da técnica	117
Anexo 3 – Protocolo de indução hipnótica	127
Anexo 4 – Protocolo de Meditação e Relaxamento	134
Anexo 5 – Protocolo de medição da atividade da telomerase de PBMC	138
Anexo 6 – Questionário de preparatório	141
Anexo 7 – Questionário para a avaliação da percepção dos resultados do tratamento	144
Anexo 8 – Tampão para mensurar Fluorescência	146
Anexo 9 – Diluições	148
Anexo 10 – TrapEZE – Resultados	152

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes (BLACK & SLAVICH, 2016; DAUBENMIER et al., 2012; HO et al., 2012; JACOBS et al., 2011; LAVRETSKY et al., 2013; SCHUTTE & MALOUFF, 2013) têm fornecido um crescente número de evidências de que a meditação pode impactar a saúde humana, especialmente influenciando a regeneração de parte do DNA das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) e causando o aumento da atividade da telomerase nessas células. Um dos marcadores utilizado para medir tal impacto tem sido atividade da telomerase (AT) em PBMC, por razões que serão detalhadas em outras sessões desse projeto. No entanto, pouco se sabe sobre quais são os componentes essenciais das técnicas meditativas para a obtenção de tais benefícios. Quando comparadas diversas técnicas meditativas acerca de seus efeitos sobre a AT em PBMC, nota-se que ainda que essas técnicas sejam compostas de procedimentos diferentes (SCHUTTE & MALOUFF, 2013), todas têm alguma capacidade de aumentar a AT no PBMC.

Daubenmier et al. (2012) realizou um estudo longitudinal de 4 meses de duração aplicando meditação Mindfulness, combinada com um programa de reeducação alimentar, em pacientes com obesidade, obtendo aumento na atividade de telomerase do sangue periférico de 47 pacientes que tiveram seu material biológico coletado antes e após passarem pelo tratamento. Em outro estudo Jacobs et al. (2011) analisou 30 sujeitos que passaram por um retiro meditativo de 3 meses com uma prática diária de 6 horas de meditação focada na plena atenção e na busca por estados de calma e de amorosidade. Esses participantes tiveram a atividade da telomerase de seu PBMC avaliada ao final do estudo e comparada a um grupo controle (n=30) e os resultados também indicaram o aumento da telomerase em PBMC após os 3 meses de prática. Lavretsky et al. (2013) conduziu um estudo com 39 pessoas que estavam cuidando de algum familiar com demência. Eles foram expostos a uma técnica meditativa da Kundalini Yoga por 12 minutos diários durante 8 semanas. O grupo controle ouvia uma música relaxante pelo mesmo tempo. Além de uma melhora significativa nos quadros de depressão, os participantes apresentaram melhora na atividade de 43% em relação ao grupo controle. Ho et al. (2012) conduziram um estudo com 64 participantes (33 no grupo de tratamento e 31 no grupo controle) que sofriam de fadiga crônica, meditando com o uso da técnica Qigong. Os participantes do grupo tratamento passaram por um

treino de meditação de 5 semanas, sendo duas sessões por semana de 2 horas cada e posteriormente por 12 semanas de meditação em casa em sessões diárias de 30 minutos cada. Os participantes passaram por duas coletas de sangue, sendo uma antes e outra após os 4 meses de intervenção. O PBMC do sangue dos participantes foi avaliado usando separação por Ficoll e um kit comercial que utiliza o método de TRAP assim como o kit utilizado pelo presente estudo. Como resultado, o estudo aponta aumento na atividade de telomerase e melhora no quadro de fadiga crônica para os sujeitos do estudo. O aumento da AT em todos esses estudos pode ter ocorrido devido a algum elemento comum a todas as técnicas, entretanto, comparar tais técnicas não é uma tarefa trivial, de forma que nenhum desses estudos indicou qual o componente exato da meditação que causa o aumento da AT em PBMC.

Ainda que as vertentes da meditação sejam difíceis de comparar (LUSH & DIENES, 2019), existem variáveis similares entre as técnicas meditativas nelas empregadas. As variáveis intrínsecas às técnicas são de difícil comparação devido a pluralidade das mesmas, no entanto, existe uma variável extrínseca aparentemente compartilhada por todas as técnicas denominadas como sendo “meditação”, sendo essa a expectativa. A expectativa acerca da meditação parece ser uma variável comum a todas as técnicas meditativas, principalmente entre os que estão iniciando a prática, visto que essas pessoas ainda não teriam tido suas expectativas alteradas por conhecimentos mais profundos sobre a meditação nem tiveram exposição prática significativa às técnicas meditativas. A expectativa inicial é algo que os sujeitos trazem para as práticas e para os tratamentos, seja por causa de suas experiências individuais ou por conta de construções socioculturais acerca dos fenômenos aos quais foram expostos. As expectativas podem amadurecer devido à influência de diversas variáveis externas, como a influência do grupo, liderança de opinião, metáforas, mídias sociais e de massa, etc. Uma forma controlada para moldar expectativas é a experimentação científica. Esse estudo tem um desenho experimental criado especialmente para controlar as expectativas acerca da meditação.

É importante destacar que existe uma tendência crescente nos tratamentos utilizando abordagens alternativas na prática da medicina. Além disso, a abordagem preventiva vem ganhando espaço em relação à medicina de cuidados paliativos. O papel do paciente tem se alterado para um papel mais ativo e participativo nos tratamentos (BLACK & SLAVICH, 2016). Considerando tais mudanças, é natural que

o uso de medicamentos seja minimizado pelo aumento da adoção de hábitos mais saudáveis. Com isso, novos métodos de tratamento vêm ganhando espaço tanto nos estudos da medicina como nas práticas de muitos centros de saúde em muitos países desenvolvidos (BLACK & SLAVICH, 2016) como, por exemplo, tratamentos utilizando a meditação e a hipnose.

Devido a essas novas tendências, para que as intervenções clínicas não sejam substituídas pelo autodiagnóstico e pela automedicação, os tratamentos clínicos precisam ser adaptados constantemente às necessidades e expectativas dos pacientes. Esse estudo pode trazer novas possibilidades de intervenções com o uso da hipnose além de reforçar as formas como a meditação já é utilizada nas clínicas ao redor do mundo, indo essas de encontro às necessidades desse paciente contemporâneo e das novas tendências da medicina.

Esse estudo consiste de um ensaio clínico randomizado que compara os efeitos da meditação e da hipnose, isolando os efeitos da expectativa. A AT de PBMC está sendo utilizada como um marcador para entender os efeitos dos tratamentos. O presente estudo junta três importantes conceitos e propõe um experimento na forma de ensaio clínico controlado e randomizado de fase III (ESCOSTEGUY, 1999) para compreender o potencial de impacto desses tratamentos na saúde das pessoas. São esses: a meditação; a hipnose; e a AT em PBMC.

Meditação – No ocidente a meditação se tornou um conceito amplamente utilizado em diversos contextos: dentro de religiões; academias; clínicas de diversos tipos; canais de vídeo on-line (por exemplo, YouTube); aplicativos para meditação e relaxamento; e antes disso o conceito de meditação já vinha sendo trabalhado dentro de práticas orientais milenares (THOMAS & COHEN, 2014). Existem diversas técnicas para a prática de meditação, como: meditação transcendental; kundalini; zen budista; *mindfulness*; tantra yoga; etc. Por isso, definir meditação não é uma tarefa simples. Embora haja diferentes técnicas e maneiras distintas de se praticar meditação, existem características compartilhadas pela maioria dos métodos. Dentre tais, são apontadas como características universais pela literatura apenas a atenção focada ou direcionada e o controle da respiração (OSPINA et al., 2007). Outras características conhecidas como por exemplo a auto percepção, estados alterados de consciência, relaxamento e o caráter religioso não são apontadas como universais, uma vez que existem

técnicas que não utilizam alguns desses elementos. Dada a vasta diversidade de experiências nomeadas meditação, de acordo com a técnica escolhida, o relaxamento pode ou não ser uma característica da meditação (OSPINA et al., 2007) e, quando presente, pode ser pré-requisito para meditar ou pode ser uma consequência do processo meditativo, podendo estar inclusive, culturalmente associado à meditação, principalmente no ocidente. Na definição das características universais da meditação, Ospina et al (2007) deixa de incluir a expectativa como sendo uma característica universal da meditação. Característica essa considerada pelo presente estudo.

O contexto cultural influencia não apenas na forma como a meditação é definida, mas também na sua prática como um todo, desde a motivação para começar a meditar até a forma como a meditação é vivenciada. Em culturas orientais a meditação costuma assumir um papel de destaque na vida das pessoas que aderem à prática, influenciando a alimentação, literatura, estilo de vida, filosofia e muitos outros aspectos individuais e coletivos. Nessas culturas, a meditação tem um papel tão fundamental que se torna capaz de moldar crenças e atitudes dos indivíduos. Em culturas ocidentais a prática de meditação é muito mais nova quando comparada culturas orientais, fazendo com que em muitos casos seja praticada, não como um estilo de vida, mas como uma atividade cotidiana com tempo pré-estabelecido de maneira bastante limitada, concorrendo com todas as outras atividades cotidianas dos indivíduos. Os ocidentais tendem também a ser mais pragmáticos em relação aos propósitos que os levam a praticar a meditação, principalmente quando estão iniciando nessa prática (CORBY Et alet al., 1978). No oriente, a meditação é praticada na busca por iluminação e autoconhecimento, enquanto que no ocidente a prática da meditação tem o propósito de reduzir o estresse, aumentar o relaxamento, ser um passatempo, ou até mesmo entreter. Isso faz com que os ocidentais tenham mais dificuldade em atingir estágios mais profundos na prática, entretanto, isso não impede essas pessoas de colherem benefícios com a prática (THOMAS & COHEN, 2014).

Embora não seja fácil definir meditação, definir uma técnica específica é bem mais simples, uma vez que cada técnica tem o seu protocolo específico e a maioria delas possui uma vasta literatura, facilitando a criação de protocolos para a prática dessas técnicas. A técnica utilizada neste trabalho foi adaptada do Tantra Yoga e esta será melhor detalhada na metodologia (Seção 5.3). O protocolo da meditação será apresentado na Seção de apêndices (Anexo 4). Mas de acordo com essa técnica

podemos definir meditação como sendo um processo ou uma prática pela qual o sujeito possa alcançar a “Última Realidade” também chamada de Bhairava (JOO, 2002). O estado de Bhairava é visto como um estado de iluminação no qual o indivíduo está desperto para a realidade e consciente de sua integração com o todo de uma maneira única, sendo inclusive, considerado um estado de encontro com o criador, no qual o iluminado se torna um só com o criador e com a criação. Pode ser também, visto como um estado de plena consciência, no qual a percepção se amplia, tornando o sujeito capaz de liberar as pessoas do medo do ciclo de reencarnação, denominado *Samsara* e espalhando luz por onde for (JOO, 2002). Fica evidente que essa vertente da meditação assume um caráter que funde a religião e as crenças no divino com o processo meditativo. Esse aspecto do Tantra Yoga poderia ser uma fonte de viés, uma vez que a busca por uma conexão com Deus pode alterar as motivações e expectativas dos participantes de acordo com as suas crenças religiosas, entretanto, o protocolo desse estudo utiliza um texto que se propõe a cobrir apenas a parte prática da meditação, chamada de Vijñāna Bhairava (JOO, 2002). Ainda assim, durante a criação do protocolo foi tomado o cuidado de tornar essa prática o mais laica possível, uma vez que Vijñāna Bhairava (JOO, 2002) parte do princípio de que todos os seus praticantes têm crenças e fundamentação cultural semelhantes e essa não é uma realidade em nosso estudo. Não foram usados termos em idiomas orientais que poderiam implicar em algo místico ou sobrenatural nem foi citado nenhum Deus ou foi feita nenhuma alusão a qualquer divindade, energia, nem nada que se assemelhe a isso.

Hipnose – Existe uma série de definições para hipnose variando, tanto de acordo com as crenças do grupo que criou a definição quanto de acordo com a forma como a hipnose é praticada nesse grupo. Historicamente a divergência inicial esteve entre fluidistas e animistas. Os fluidistas acreditavam que a hipnose era uma energia tangível, trocada entre hipnotizador e hipnotizado, enquanto que os animistas afirmavam que o hipnotizado estava sob a influência sugestiva do hipnotizador, sendo a causa de seus efeitos puramente psicológica. A visão animista prevaleceu e atualmente é a mais difundida (PINTAR E LYNN, 2008).

Nos dias atuais, um dos pontos de maior divergência está na discussão de haver ou não a necessidade de os hipnotizados estarem em um estado alterado de

consciência para que possam ser considerados sob o efeito da hipnose. Essa discussão é relevante para se definir a hipnose porque para os grupos que pregam as teorias de não-estado a sugestão é considerada uma forma de hipnose enquanto que para o que pregam teorias de estado a sugestão é uma das etapas do processo hipnótico (PINTAR E LYNN, 2008).

O site da APA (*AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION*, 2016) oferece uma definição adaptada da *Encyclopedia of Psychology*:

“Hipnose é uma técnica terapêutica na qual, clínicos aplicam sugestões a indivíduos que, tenham passado por algum procedimento desenhado para relaxar e focar em suas mentes”.

Interessantemente, essa não é a definição oficial da APA. A definição oficial da APA (ELKINS et al., 2014) diz que hipnose é:

“... um estado de consciência envolvendo atenção focada e uma atenção periférica reduzida caracterizada pela capacidade aumentada de resposta a sugestão”.

Essa definição já sofreu diversas mudanças vindo de definições que reforçavam as teorias de estado, até chegar à essa definição que não se posiciona quanto a essa questão. É válido destacar que existe a possibilidade de o indivíduo hipnotizar a si mesmo em um processo denominado auto-hipnose que não está contemplado na definição adaptada da *Encyclopedia of Psychology*, mas não é descartada pela definição oficial da APA, uma vez que a sugestão pode ser aplicada pelo mesmo sujeito a qual essa se destina. Também foram excluídas da definição da *Encyclopedia of Psychology* as hipnoses de palco ou qualquer outra que não seja realizada por um clínico. A definição oficial da APA é bastante relevante, uma vez que contempla diferentes vertentes de estudo da hipnose.

De acordo com Wahbeh et al (2008) a hipnose envolve atenção focada e possui três componentes principais: absorção, dissociação e sugestionabilidade. Absorção está relacionada à capacidade do indivíduo de concentrar-se e envolver-se em uma tarefa; dissociação é a separação de funções experienciais que normalmente ocorrem simultaneamente e; sugestionabilidade é a susceptibilidade do indivíduo às sugestões aplicadas.

A indução hipnótica pode ocorrer de várias maneiras e com diversos propósitos. Atualmente, a hipnose é famosa pelo seu uso para o entretenimento, no entanto, em suas origens, seu propósito era predominantemente clínico. Na clínica, a hipnose é utilizada de diversas maneiras, dentre as quais se destacam pela sua efetividade os usos para: o tratamento de diversas formas de dor; o relaxamento e redução do estresse dos pacientes e; o auxílio à mudança de hábitos danosos como o tabagismo e alcoolismo (PINTAR et al., 2008).

No presente trabalho, o uso da hipnose terá o foco no relaxamento, além de sugestões diretas para um efeito fisiológico identificável, o alongamento dos telômeros de PBMC através do aumento da expressão da enzima telomerase em PBMC, devido aos objetivos da pesquisa. Esse estudo pode auxiliar na confirmação ou não de diversos ditos populares de que a hipnose pode afetar a saúde dos seres humanos e outros aspectos biológicos. Tem-se falado muito nas mídias sociais (ATTRACTION, 2020a) sobre a hipnose sendo capaz de afetar o DNA humano, algumas vezes sobre o nome de biokinesis (ATTRACTION, 2020b), mas em nenhum destes materiais são apresentados dados que possam nos dar embasamento científico para tais informações. Assim, uma contribuição extra desse estudo é a de saber o quanto essas afirmações popularmente difundidas podem ter algum fundamento. O protocolo da indução hipnótica utilizado no presente estudo foi criado especificamente para a finalidade acima descrita, sendo esse melhor detalhado na metodologia e exposto nos apêndices (Anexo 3).

Telomerase e Telômeros – Os telômeros são sequências repetidas de DNA (TTAGGG) posicionadas no final de cada cromossomo humano. Suas funções conhecidas estão principalmente ligadas à manutenção do cromossomo durante a divisão celular, também denominada mitose. A cada mitose, o cromossomo perde um pedaço de DNA e a presença dos telômeros faz com que a célula possa se dividir sem

sofrer danos que influenciem o seu funcionamento. Ao invés de perder moléculas de DNA codificante, fundamentais para o funcionamento daquela célula, a célula perde pedaços do telômero (TEMPAKU et al., 2015). Caso os telômeros se esgotem, as células podem sofrer senescência ou apoptose (morte celular programada) e esse processo é uma das principais etapas do envelhecimento tecidual humano e da maioria dos animais pluricelulares, senão de todos. Em alguns casos, células com telômeros totalmente esgotados podem sofrer mutações e até evoluir para um tumor (SKVORTSOV et al., 2011).

A telomerase consiste em uma enzima de transcriptase reversa (Tert ou HTert para humanos) e uma unidade catalítica do DNA (Terc) que age como molde para a síntese de DNA, além de uma proteína chamada Dkc1 (Disquerina – traduzido do inglês *dyskerin*), que tem a função de ligar Terc (DONATE & BLASCO, 2011). A telomerase é capaz de restituir a parte danificada do telômero através da adição de novas sequências teloméricas no lugar das que haviam sido perdidas durante a mitose.

Em organismos saudáveis a telomerase tem maior índice de ativação em tecidos embrionários e em células tronco do que em tecidos somáticos, mas também está ativa em graus heterogêneos em células do sistema imune (LIN et al., 2010). Tecidos tumorais também podem exibir altos índices de telomerase ativa. Em tecidos saudáveis a telomerase ativa tem sido associada a estudos de envelhecimento celular e indica uma menor carga de estresse celular, o que traz impactos positivos na saúde e uma menor taxa de envelhecimento tecidual dos indivíduos (DONATE & BLASCO, 2011).

PBMC – As células mononucleadas do sangue periférico, também chamadas de PBMC, do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*, são células que contém 1 (um) núcleo circular e que estão presentes no sangue periférico. O sangue periférico é o sangue circulante e foi escolhido para esse estudo por ser facilmente coletável através de venipuntura. As células que fazem parte do PBMC são: Linfócitos T (LTs); Linfócitos B; células *Natural Killer* (NK); monócitos; e células dendríticas (Tabela 1). Em humanos as células prevalentes no PBMC são as células imunológicas (VERHOECKX et al., 2015). Por essa razão se faz necessária uma breve revisão do sistema imune e de sua relação com a AT.

A população de células de glóbulos vermelhos e granulócitos apresenta uma densidade superior à das PBMCs e não está sendo analisada no presente estudo.

Sistema Imune - Existem duas principais divisões do sistema imune (Tabela 1) que são a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa (CRUVINEL et al., 2010).

Tabela 1 - Células e moléculas solúveis do sistema imunológico

Componente	Imunidade inata	Imunidade adquirida
Células	Fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) Células <i>natural-killer</i> (NK) Mastócitos, basófilos e eosinófilos	Linfócitos T, B e NK/T Células dendríticas ou apresentadoras de antígenos (APCs)
Moléculas solúveis	Complemento Proteínas de fase aguda Citocinas Quimiocinas	Anticorpos Citocinas Quimiocinas

Fonte: CRUVINEL et al., 2010

A imunidade inata é um sistema de combate às ameaças que o organismo já recebe desde seus primeiros estágios de desenvolvimento, antes mesmo do nascimento. Esse sistema é capaz de combater uma ampla gama de ameaças ao organismo de maneira extremamente rápida pois é um sistema pré-formado, adquirido dos pais. No entanto, suas limitações estão no combate a ameaças que estejam em constante evolução, pois a imunidade inata (Tabela 1) não evolui ao longo do ciclo de vida do organismo (CRUVINEL et al., 2010).

A imunidade adquirida complementa a imunidade inata, uma vez que supre a principal fraqueza da imunidade inata que é a falta de adaptabilidade. Diferente do sistema inato, o sistema imune adquirido aprende a identificar combater agentes agressores nunca antes combatidos pelo organismo e, uma vez feito isso, o sistema imune adquirido desenvolve uma memória para o combate desses agressores, para que em uma reinfecção a resposta imunológica possa ser mais efetiva (CRUVINEL et al., 2010). A maior parte das células do PBMC fazem parte da imunidade adquirida (VERHOECKX et al., 2015). As células NK e células dendríticas fazem parte tanto da imunidade inata, quanto da imunidade adquirida (CRUVINEL et al., 2010). As células

imunológicas podem ainda ser classificadas como imaturas - também denominadas naíve - ou maduras - também chamadas células de memória (CRUVINEL et al., 2010).

Células Dendríticas (DCs) – Compõe cerca de 1% até 2% do PBMC (VERHOECKX et al., 2015) e são responsáveis pela captura e apresentação de antígenos. Devido à sua função, essas células ficam alocadas em tecidos onde é mais comum a presença de invasores e geralmente são as primeiras a chegarem aos locais infectados do organismo. As células imaturas são efetivas na captura de invasores, enquanto que as células de memória fazem a apresentação rápida de antígenos recorrentes. Essas células são consideradas células de transição entre o sistema imune inato e o sistema imune adquirido (CRUVINEL et al., 2010). As células dendríticas são determinantes no tipo de resposta imune que ocorrerá diante de uma invasão, sendo muitas vezes responsáveis pela proliferação das células imunológicas necessárias ao combate de tal invasão.

Células Natural Killer (NK) – Representam de 5% a 20% da população de células do PBMC (VERHOECKX et al., 2015) e se originam na medula óssea. São tumoricidas, bactericidas, antivirais além de atacar protozoários. Sua defesa é inespecífica. Atuam lisando células infectadas; recrutando macrófagos e neutrófilos; e ativando DCs e linfócitos T e B.

Monócitos – Correspondem de 10% a 20% da população de PBMC (VERHOECKX et al., 2015) e 3% a 8% dos leucócitos circulantes (CRUVINEL et al., 2010). Monócitos são leucócitos e são formas imaturas de macrófagos. Os macrófagos se ocupam de fagocitar resíduos celulares, cuidando de reparos teciduais, atuando como microbicida e tumoricida, mediando inflamações e fazendo apresentação celular aos LTs de acordo com os subtipos de população ao qual pertencem (CRUVINEL et al., 2010).

Linfócitos T (LTs) – Representam de 70% a 85% da população de células do PBMC (VERHOECKX et al., 2015) e esses fazem parte do Sistema de Imunidade Adquirida (Tabela 1). Esse sistema é responsável pela capacidade de adaptação para lidar de maneira específica com novas ameaças ao organismo. Os LTs (também conhecidos como células T) recebem esse nome devido ao fato de amadurecerem no Timo,

possuindo um importante papel na imunidade celular por lidar com infecções que se instalam dentro das células e também auxiliam no recrutamento de leucócitos para combater outras ameaças extracelulares (ABBAS et al., 2015).

Quando o organismo não está combatendo invasores a maior parte das células do PBMC são células de memória ou células naïve ambas livres de funções efetoras (CRUVINEL et al., 2010). Isso porque uma vez combatida a ameaça, células reguladoras agem de forma a parar a resposta imunológica, evitando que as células do sistema imunológico ataquem células saudáveis, mecanismo esse que prevê a autoimunidade (ABBAS et al., 2015). Por essa razão células T especializadas para tipos específicos de antígenos apresentam baixa prevalência.

As células de memória são um componente importante da imunidade adquirida (Tabela 1), uma vez que estas carregam a informação necessária para reconhecer e combater as ameaças recorrentes ao nosso organismo (LIN et al., 2010). Por essa razão, a primeira vez que se é infectado por algumas doenças, tem efeitos muito mais devastadores do que em uma segunda infecção pelo mesmo tipo de antígeno.

A imunidade é também classificada por imunidade humoral e imunidade mediada por célula (Figura 1). Basicamente a imunidade humoral lida com invasores extracelulares ao passo que a imunidade celular lida com invasores intracelulares. Os LTs fazem parte da imunidade mediada por células. Os LTs auxiliares ativam macrófagos para destruir microrganismos invasores. Os LTs citotóxicos destroem diretamente células infectadas” (ABBAS et al., 2015).

Figura 1- Imunidade humoral e imunidade mediada por célula.

Fonte: ABBAS et al., 2015.

Linfócitos B - Compõe cerca de 5% a 10% do PBMC (VERHOECKX et al., 2015) e fazem parte da imunidade humoral. Os linfócitos B secretam anticorpos que previnem as infecções e eliminam os microrganismos extracelulares.

Os telômeros e o sistema imune

Os telômeros são sequências repetidas de bases presentes no final de cada cromossomo. Em humanos essa sequência é TTAGGG e essa se repete por diversas vezes. Dentre outras funções, até então não conhecidas por completo, o telômero protege as demais regiões codificantes do cromossomo, uma vez que parte desse telômero é perdida durante a divisão celular. Isso ocorre porque a DNA polimerase,

principal enzima responsável pela replicação semiconservativa do DNA durante a divisão celular necessita de 16 repetições de telômero como suporte para fazer a replicação do material genético. Essas repetições não entram na replicação e não são passadas para a nova célula. Como resultado desse processo, cada nova geração celular tem telômeros cada vez mais curtos até que não exista mais a possibilidade de divisão celular (LIN et al., 2010).

A telomerase é um complexo ribonucleico capaz de reconstituir os telômeros que foram danificados pela mitose (divisão celular), podendo estabelecer um processo de equilíbrio dinâmico entre o encurtamento dos telômeros causado pela divisão celular e o alongamento dos telômeros proporcionado pela atividade da telomerase (SKVORTSOV et al., 2011). A telomerase humana é composta por uma estrutura proteica (hTERT) que abriga uma estrutura de RNA (TERC) que serve de molde para a produção do DNA que será adicionado à extremidade 3' dos cromossomos. A telomerase liga-se ao final do telômero, onde inicia o processo de transcriptase reversa, ou seja, transcrição de DNA a partir de RNA, reconstituindo os telômeros perdidos durante a mitose. Com isso a telomerase é capaz de retardar a senescência celular causada pelo encurtamento dos telômeros ou outras mutações mais sérias causadas pela ligação irregular de dois cromossomos com telômeros perdidos, além de ajudar na regeneração tecidual (SKVORTSOV et al., 2011).

Quanto maior a AT, maior o potencial de replicação de uma célula, uma vez que essa pode se dividir mais vezes sem correr o risco de esgotar seus telômeros (SKVORTSOV et al., 2011). O esgotamento dos telômeros, em tecidos saudáveis, levaria a células à morte programada ou à senescência. Em tecidos somáticos não tumorais os níveis de AT tendem a ser reduzidos, se comparados aos tecidos embrionários ou às células germinativas. As células-tronco possuem a produção de telomerase em níveis elevados e no sistema imune a telomerase também está presente, no entanto, sua atividade diminui na medida em que a célula vai passando por processos de diferenciação (LIN et al., 2010). Esse mecanismo implica que as células do tipo *naïve*² possuam maior AT e conseqüentemente, maior potencial replicativo do que as células de memória³.

² Células que nunca tiveram contato com um antígeno

³ Células - diferenciadas para combater um antígeno específico

Ao entrar em contato com um antígeno, as células *naïve* dão origem à população de células necessária para combater a ameaça ao organismo e por isso essas células necessitam de um alto potencial replicativo (ABBAS, et al., 2015). As células de memória são especializadas e consequentemente, mais eficazes do que as células do tipo *naïve* no combate especializado das ameaças ao organismo, mas também são incapazes de gerar a mesma variedade de células que as células *naïve*, necessitando, portanto, de um potencial replicativo menos elevado. Por esta razão, ter um alto potencial replicativo é mais importante para as células do tipo *naïve* do que para as células de memória, fator esse que pode ajudar a explicar a heterogeneidade na AT dentro do sistema imune estar diretamente ligada ao grau de especialização da célula. Em tecidos saudáveis, quanto maior a necessidade de reposição das células, maior a atividade da telomerase (SKVORTSOV et al., 2011). Embora essa heterogeneidade da AT no sistema imune de um indivíduo ocorra, para que o mesmo seja saudável é necessário que essa atividade seja ao menos suficiente para a manutenção da efetividade imunitária.

A AT também é muito importante para processos relacionados ao envelhecimento do organismo, tanto em nível celular, quanto em nível tecidual e sistêmico. Isso porque o tamanho dos telômeros é determinante para o número de divisões que uma célula pode realizar antes de sofrer morte celular (RAZGONOVA et al., 2020). Existe uma aparente relação entre envelhecimento e potencial replicativo. Na medida em que o potencial replicativo de um tecido diminui, o mesmo envelhece.

Células com telômeros totalmente esgotado estão ainda mais sujeitas a mutações que podem resultar em tumores. A regulação da AT desempenha um papel importante na prevenção e combate de tumores causados por replicação excessiva de células mutantes (SKVORTSOV et al., 2011). Tumores malignos dependem da AT para continuarem se replicando desordenadamente.

Tem sido também evidenciado em estudos recentes (SCHUTTE & MALOUFF, 2013; BLACK & SLAVIC, 2016) que a AT varia de um indivíduo para o outro, assim como a extensão dos telômeros das células imunológicas devido a diversos fatores ambientais (epigenéticos) e hereditários (genéticos e epigenéticos). Um fator ambiental altamente estudado, positivamente correlacionado com a expressão de telomerase em várias células do sistema imunológico, é a prática da meditação.

Células imunológicas necessitam de muitas divisões para combater as ameaças. Essa cinética celular gera uma necessidade constante de divisão de células tanto do sistema imune inato quanto do sistema imune adquirido (ABBAS, et al., 2015). Por essa razão, indivíduos capazes de aumentar sua capacidade de expressão e AT têm maiores chances de ter um sistema imune mais efetivo, uma vez que o potencial replicativo de suas células é proporcional a AT. Células com maior AT demoram mais para esgotar seus telômeros visto que os telômeros perdidos durante a divisão celular são posteriormente repostos pela telomerase (ANDREWS et al., 2010).

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo inicial confirmar os efeitos da meditação sobre a AT da telomerase dos PBMC.

O objetivo secundário desse estudo é verificar se a hipnose poderia oferecer resultados similares ou superiores aos da meditação sobre a AT da telomerase dos PBMC.

Buscou-se identificar o tamanho do efeito das expectativas da meditação nos efeitos observados com o uso de um controle positivo denominado “Relaxamento Guiado”.

Esse estudo apresenta também a aplicação de um importante questionário de expectativas acerca da hipnose, altamente validado em outros países, adaptando-o para a realidade brasileira e que foi utilizado para comparar as expectativas acerca da meditação, hipnose e relaxamento guiado.

3. JUSTIFICATIVA

Esse estudo permite a comparação entre a meditação e a hipnose, permitindo isolar os efeitos da expectativa dos efeitos das técnicas. A AT de PBMC é utilizada aqui como um marcador de efetividade dos tratamentos.

A escolha da mensuração da AT de PBMC se justificou inicialmente pela literatura, uma vez que existem diversos estudos (SCHUTTE & MALOUFF, 2013; BLACK & SLAVIC, 2016) que apontam para alterações relevantes na expressão e na AT como efeito de práticas meditativas. Estudos prévios (RUZYLA-SMITH et al., 1998) demonstraram os efeitos da hipnose sobre a contagem de PBMC, que consiste principalmente de células imunológicas e sobre a quantidade de células T e células B. No entanto, a contagem de células é uma medida passível de vieses, uma vez que o aumento na quantidade de células pode ocorrer devido a atividade do sistema imunológico no combate à doenças (ABBAS et al., 2015) e não porque o sujeito está mais saudável.

A telomerase e os telômeros em PBMC por outro lado, são boas medidas de saúde, visto que quanto maior a AT, maior o comprimento dos telômeros e, maior o potencial replicativo das células do sistema imunitário. Isso torna o sistema imune mais efetivo, pois o torna capaz de suprir as demandas sazonais de grandes populações de célula (ABBAS, 2015). O aumento da AT do PBMC indica indiretamente o aumento de AT em células imunológicas devido à alta proporção de células desse tipo no PBMC (VERHOECKX et al., 2015).

A meditação apareceu como um elemento natural para esse trabalho, uma vez que os estudos apontam para a meditação como sendo capaz de aumentar efetivamente a atividade de telomerase e atuar na restauração dos telômeros de PBMC (SCHUTTE & MALOUFF, 2013; BLACK & SLAVIC, 2016).

Esse estudo traz benefícios tanto na confirmação dos efeitos da meditação e da hipnose sobre a AT do Sistema Imune, quanto da demonstração de que não há benefícios para o Sistema imune advindos da prática de meditação.

Os impactos na vida das pessoas da confirmação científica dos benefícios da meditação para o sistema imune são:

- a) A meditação pode passar a ser utilizada como método de prevenção de doenças mantendo a população saudável, reduzindo a necessidade de

consultas médicas e exames caros para obter resultados similares, tanto por canais informais quanto pelas redes de saúde de todos os países;

- b) Uma redução dos custos para o sistema público de saúde, através da redução na quantidade de medicamentos gastos no tratamento de algumas enfermidades. O número de visitas ao médico em decorrência dos efeitos colaterais dos medicamentos também cairia significativamente.

Os impactos na vida das pessoas da confirmação científica de que não há benefícios da meditação para o sistema imune são:

- a) O combate às informações pseudocientíficas, uma vez que existem diversas afirmações na mídia ditas como sendo científicas acerca dos efeitos da meditação, mas sem o devido respaldo.
- b) Indicação de que os estudos anteriores nos quais esse estudo se fundamentou precisam ser refeitos mais vezes afim de termos um real parecer sobre o assunto, visto que resultados negativos iriam contra os estudos de Schutte & Malouff (2013) e Black e Slavic (2016).

Além dos impactos mencionados anteriormente, a confirmação científica dos benefícios da hipnose para o sistema imune pode ampliar as possibilidades de atuação dos psicólogos na prevenção de doenças através de tratamentos para aumentar a efetividade do sistema imune, permitindo que os psicólogos atuem também, em parceria com médicos usando a hipnose como complementação para os tratamentos tradicionais.

Do ponto de vista da construção do conhecimento científico, a hipnose trouxe para esse estudo um aspecto original, uma vez que não foram encontrados estudos relacionando a indução hipnótica e a AT em PBMC, nem a comparação entre hipnose e meditação sob essa ótica do potencial replicativo de PBMC.

4. VARIÁVEIS E HIPÓTESES:

- As variáveis independentes no presente estudo são: (a) prática regular de meditação (seja sob o nome “meditação” ou sob o nome “relaxamento”); (b) exposição contínua à sugestão hipnótica e; (c) exposição regular à música utilizada no controle.
- As variáveis dependentes são: expectativa e AT em PBMC.
- A hipótese inicial principal desse estudo é:

H_0 : Os sujeitos que passarem por algum dos tratamentos (meditação, hipnose, controle positivo) terão a AT em seu PBMC aumentada em relação ao grupo controle.

- As hipóteses iniciais secundárias do estudo são:

H_0' : O grupo relaxamento e o grupo meditação apresentarão resultados diferentes.

H_0'' : A hipnose será mais capaz de aumentar a AT do PBMC que os demais tratamentos aqui apresentados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa teve início com o levantamento de dados secundários acerca dos três principais constructos deste trabalho, que são meditação, hipnose e AT em PBMC. Buscou-se também, adquirir o entendimento sobre o quanto a interação entre esses constructos já havia sido estudada. Métodos informais de pesquisa como conversas com pesquisadores de cada área foram muito úteis para a elaboração desse trabalho, além da busca constante em base de dados confiáveis e outros meios para levantamento citados a seguir.

A segunda parte da pesquisa buscou estabelecer relação causal entre os constructos através de experimentação controlada, que está melhor explicada ao longo deste trabalho.

A última fase consistiu na avaliação e interpretação dos resultados. Houve também ao longo do estudo, a coleta de informações através de um “*survey*”, com o objetivo de entender as expectativas dos participantes acerca dos tratamentos aqui propostos. A cada encontro virtual ou presencial com os participantes coletei relatos acerca da participação dos sujeitos no experimento e os principais relatos estão expostos nesse trabalho.

5.1 - Levantamento de dados secundários

A coleta de dados secundários foi realizada pesquisando palavras-chave como psicossomática, hipnose, meditação, telomerase, cortisol e biofeedback nas principais fontes de conhecimento científico sobre o assunto. Estes são os sistemas de busca da NCBI (principalmente o PUBMED), outros indexadores de dados como Sibi-USP e Scielo, bem como artigos compartilhados no GEHIP (Grupo de Estudo de Hipnose na USP) e livros presentes no programa das disciplinas das Universidades de renome e nas citações dos principais artigos e que abordam assuntos relacionados à essa pesquisa. Foram também, utilizados alguns recursos do Google (Google, LLC, California, U.S.A.) como “Google Scholar” e “Google Livros”. Livros altamente citados também foram levados em consideração, quando escritos com rigor metodológico e anteriormente citados por artigos de excelência. A busca por bibliografia também ocorreu por meios indiretos ao pesquisar as fontes citadas pelos autores dos artigos

que fazem parte da referência. Algumas informações e artigos puderam ser obtidos na rede social ResearchGate (ResearchGate GmbH Chausseestr. 20. 10115 Berlin Germany), por onde foi contatado o pesquisador Hector Valenzuela da Califórnia para entender mais sobre o tempo necessário para que mudanças na telomerase possam ser mensuráveis. As demais etapas metodológicas foram elaboradas com a ajuda desta coleta secundária de dados.

5.2 - Auto percepção dos resultados do tratamento

Esse questionário (Anexo 7) foi aplicado apenas para os sujeitos dos grupos de tratamento: Grupo Hipnose (grupo 1); Grupo Relaxamento (grupo 2) e; Grupo Meditação (grupo 3). O grupo controle ficou de fora por conta da pergunta 1. A aplicação do questionário se deu por meio eletrônico.

5.3 - Experimento

Em seu estudo, Daubenmier et al. (2012) aplicou meditação Mindfulness, combinada com um programa de reeducação alimentar realizou um estudo longitudinal durante 4 meses em pacientes com obesidade, obtendo aumento médio na atividade de telomerase do sangue periférico de 47 pacientes que tiveram seu material biológico coletado antes e após passarem pelo tratamento. Nesse estudo os pacientes passaram por 9 intervenções meditativas de 2h30 cada com a presença de um instrutor e uma intervenção de 7 horas de meditação guiada. Além disso, os pacientes realizavam intervenções diárias em suas casa de meditação e alimentação consciente, sem a presença de um instrutor ou pesquisador.

Devido à etapa experimental, o presente estudo foi classificado como sendo um ensaio clínico controlado randomizado de fase III (ESCOSTEGUY, 1999). Por isso esse estudo teve que ser cadastrado na Plataforma Brasil, sendo posteriormente aprovado por um comitê de ética em pesquisas com seres humanos. O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob a numeração CAAE: 73462317.0.0000.5561.

No experimento aqui aplicado, foi criado um grupo chamado de “relaxamento” que utiliza o mesmo protocolo de meditação aplicado ao grupo denominado

“meditação”, mas que ao não ser anunciado como meditação, não traz consigo a expectativa trazida pelo nome “meditação”.

Caso o aumento na AT demonstrado pelos estudos aqui apontados (BLACK & SLAVICH, 2016; DAUBENMIER et al., 2012; HO et al., 2012; JACOBS et al., 2011; LAVRETSKY et al., 2013; SCHUTTE & MALOUFF, 2013) tenha ocorrido devido a técnica de meditação e não devido às expectativas, é possível que uma técnica desenhada especialmente para aumentar a AT em leucócitos seja ainda mais eficaz. Levando isso em consideração, foi desenvolvido nesse estudo um protocolo de hipnose aplicado ao aumento da AT. Os resultados da meditação foram comparados aos apresentados pela indução hipnótica para verificar se a hipnose pode ser uma ferramenta ainda mais efetiva no aumento da AT de PBMC do que a meditação.

O experimento contou com 4 grupos, sendo 3 expostos a diferentes tratamentos e um controle. Os indivíduos de cada grupo passaram por um tratamento específico diário durante 30 minutos ao longo de 4 meses, seguindo o mesmo tempo de estudo de Daubenmier et al. (2012). O protocolo de todos os tratamentos se inicia com a mesma técnica de relaxamento pelos primeiros cinco minutos (com exceção do grupo controle que não recebeu tratamento) e os próximos 25 minutos são específicos para cada grupo. Era previsto que todos os grupos com tratamento teriam um encontro semanal para a prática conjunta que visaria aumentar o engajamento dos participantes no estudo. Ao final de cada sessão seria conduzido um grupo de foco com a finalidade de captar suas percepções quanto ao tratamento. No entanto, essa prática estava surtindo um efeito oposto, pois os participantes não estavam tendo disponibilidade para aparecer no dia específico da reunião, o que os deixava desmotivados e muitas vezes os levava a desistir. Como o quórum era muito baixo e as recompensas não superavam os pontos negativos, essa atividade foi descontinuada.

Todos os tratamentos tinham uma mesma música de fundo relaxante e os sujeitos do grupo controle tinham que ouvir à música de fundo dos tratamentos meia hora por dia e tiveram que passar pelas coletas como todos os demais sujeitos. Esse procedimento foi necessário para isolar os efeitos da música de fundo nos tratamentos dos demais grupos. Os relatos do grupo controle foram surpreendentes e serão expostos na sessão de resultados.

Os tratamentos foram aplicados de maneira mecânica com o uso de um áudio, para reduzir a possibilidade de vieses. Cada sujeito foi instruído a ouvir diariamente ao

mesmo áudio, em um horário de sua própria escolha, mas preferencialmente sempre no mesmo horário para criar uma rotina que os ajudaria a lembrar de ouvir o áudio. Os sujeitos do grupo controle deveriam ouvir ao áudio enquanto realizavam alguma de suas tarefas cotidianas, ao passo que os sujeitos dos grupos de tratamento deveriam ouvir aos áudios em um local calmo e livre de distrações, sentados ou deitados e focando apenas nessa atividade por 30 minutos.

Arcabouço amostral – Cerca de 700 pessoas se interessaram em participar do estudo e a seleção inicial ocorreu por um questionário com perguntas-filtro através de um recurso da Google chamada de “Google Forms”. 156 pessoas responderam dessas, 65 pessoas puderam de fato iniciar. Do total de 65 voluntários que iniciaram a participação no estudo, 14 participantes concluíram os 4 meses de participação no estudo. O recrutamento foi de pessoas de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que não fizessem uso regular nem durante o estudo, de drogas e medicamentos com ação sobre o sistema nervoso central. A captação dos voluntários ocorreu fisicamente dentro e nos arredores de Universidades em São Paulo, por mídias sociais e por vídeos no YouTube (YouTube, LLC, San Bruno, California), fato esse que torna a amostra obtida por conveniência. As pessoas interessadas eram colocadas em um grupo dentro do aplicativo móvel WhatsApp (WhatsApp Inc., Mountain View, California), onde eram comunicadas das datas de recrutamento e também recebiam os questionários de interesse desse estudo. O grupo também serviu para que os benefícios do estudo fossem estendidos na íntegra para todos os voluntários assim que a pesquisa foi concluída. Até que isso tenha acontecido, os voluntários que chegaram ao fim da pesquisa foram instruídos de que poderiam continuar usufruindo dos benefícios do tratamento se assim o desejassem fazer.

A formação dos grupos ocorreu de maneira aleatória utilizando um algoritmo de aleatorização por meio de um aplicativo de celular chamado *randomizer* (disponível na Android Play Store) e cada indivíduo recebeu um treinamento específico de acordo com o grupo do qual estava participando. O método de aleatorização utilizado foi por blocos (ESCOSTEGUY, 1999).

Sujeitos que estavam em tratamento médico que utilize medicamentos psicoativos, entorpecentes ou psicotrópicos (inclusos na classificação do Art. 80 da PORTARIA N.º 344, DE 12 DE MAIO DE 1998 – Ministério da Saúde como

medicamentos de tarja preta) não foram incluídos no estudo para evitar possíveis influências destes. Sujeitos que iniciaram o tratamento psiquiátrico medicamentoso durante o estudo tiveram que abandonar o estudo para focar em seu tratamento médico.

Os sujeitos não poderiam praticar técnicas concorrentes ao estudo ao longo dos 4 meses de participação no estudo. Independente de qual grupo o sujeito fizesse parte, ao longo do estudo ele não poderia meditar, fazer sessões de relaxamento guiado ou hipnose a não ser a que estivesse no áudio do estudo. Pessoas que passassem a executar alguma técnica concorrente seriam excluídas do estudo, pois não haviam mecanismos para controlar os efeitos dessas práticas, sendo assim uma fonte de viés para os resultados. Diversos sujeitos deixaram o estudo para meditar ou para fazer tratamentos médicos.

O áudio do estudo deveria ser ouvido apenas uma vez ao dia. Sujeitos que ouviram o áudio ao menos quatro vezes por dia foram considerados aptos.

Como as amostras de sangue poderiam ser congeladas por até um ano, o recrutamento de participantes ocorreu em fluxo contínuo, de maneira que os indivíduos puderam entrar no estudo em períodos diversos, permanecendo sob tratamento por quatro meses. Foram formadas ondas de voluntários e cada onda só teria início quando cada grupo tivesse no mínimo 5 participantes, mas acabamos abrindo exceções para ondas menores visto que muitos sujeitos iniciaram sua participação no mesmo dia que alguém fazia sua segunda ou terceira coleta.

Grupo meditação – Os participantes desse grupo foram expostos a uma técnica de meditação adaptada do Tantra Yoga. O texto de base para a criação do protocolo de meditação foi o Vijñāna Bhairava (JOO, 2002). Esse texto se adequa às pesquisas no contexto ocidental, segundo Joo (2002), por se tratar de um texto focado na parte prática, não sendo necessário que os sujeitos tenham um estilo de vida ou crenças espirituais específicos, como costuma ser demandado em muitos outros textos orientais sobre a meditação. Trata-se de um dos principais guias para meditadores da prática Kashmira de Tantra Yoga. Existem outras abordagens meditativas adaptadas ao ocidente, das quais as mais famosas, em termos de quantidade de publicações, são as baseadas em Mindfulness (BLACK & SLAVICH, 2016). Entretanto, tais abordagens demandam cerca de duas horas de prática por sessão. Para evitar que o

tempo de tratamento se torne uma fonte desmotivação para os voluntários desse estudo, é necessário que todos os tratamentos estejam devidamente adaptados à cultura e ritmo de vida das pessoas que vivem nos grandes centros urbanos, de forma que possam ser devidamente executados sem causar desconforto aos participantes. Isso justifica o uso de uma técnica que pode ser executada pelo próprio participante em 30 minutos (inferior ao tempo usual de outros estudos) como uso de um áudio que pode ser reproduzido em um local e hora conveniente para o voluntário. A técnica de meditação aqui proposta usou os princípios do Tantra Yoga, mas os seus mantras e palavras de condução foram adaptados para que pudesse ser aplicada no grupo de relaxamento sem que os participantes se dessem conta de que estavam sendo expostos a uma técnica meditativa. Ao ouvir o áudio o indivíduo era totalmente guiado por uma sessão de Tantra Yoga.

O protocolo utilizado foi fornecido pelo psicólogo André Renato Rizzi (CRP 06/131868) que utiliza o mesmo protocolo em suas sessões terapêuticas e já se provou (comunicação pessoal) ser um protocolo seguro ao longo do tempo. Adaptei o protocolo para esse estudo, tirando as palavras que revelariam que se trata de um protocolo de meditação. O protocolo foi produzido com equipamento e programas de alta qualidade e passou por edição e eliminação de ruídos. Foi utilizado um aplicativo para alterar minha voz e tornando-a irreconhecível, de forma que essa não se tornasse um elemento de distração ou viés para as pessoas que já me conheciam antes de entrar no estudo. A música de fundo do protocolo são os 30 primeiros minutos da música “Relaxing Music for Deep Sleep. Delta Waves. Calm Background for Sleeping, Meditation, Yoga” (2015). Os passos de gravação e edição foram estendidos para os tratamentos dos outros grupos de maneira padronizada.

Grupo de relaxamento – O grupo de relaxamento teve a finalidade de isolar a técnica da meditação dos efeitos da expectativa que o nome “meditação” traz consigo. Os participantes desse grupo passaram por um tratamento diário de 30 minutos por sessão, exatamente igual ao aplicado no grupo de meditação, no entanto, acreditavam estar participando de um relaxamento guiado. Esse grupo foi criado para mensurar o quanto dos efeitos observados ocorreram devido à técnica empregada e não devido aos efeitos que os participantes esperam vir da meditação, ou seja, às expectativas acerca da meditação. As únicas diferenças entre o grupo de relaxamento e o grupo de

meditação é o nome da técnica divulgada e o TCLE que especificou o nome dessa técnica aplicada a cada grupo como sendo relaxamento e a conversa preparatória para a técnica.

Grupo hipnose – Outros participantes passaram por sessões regulares de hipnose. Tal prática foi diretamente supervisionada pelo Professor Doutor Wellington Zangari do Instituto de Psicologia da USP, sendo esse um perito no assunto. A técnica de indução a ser aplicada começou com os mesmos primeiros cinco minutos comuns a todos os grupos. A intervenção específica proposta para esse grupo seguiu um protocolo (Anexo 3) criado especificamente para esse estudo, com sugestões aplicadas diretamente aos resultados esperados. A fim de facilitar o processo de visualização, os participantes assistiram no primeiro dia de tratamento, a um vídeo explicando a ação da telomerase e tiveram uma conversa preparatória sobre o que é hipnose, desmistificando algumas das principais fontes de resistência às induções, que são os medos e ideias pré-concebidas de que a hipnose é uma batalha de controle entre hipnotizador e hipnotizado. A sugestão hipnótica da indução do estudo foi diretamente voltada a induzir os sujeitos a visualizar suas células imunes sendo recuperadas pela ação da telomerase.

Grupo controle – O grupo controle consiste de indivíduos que foram expostos diariamente à música de fundo das intervenções enquanto executavam suas atividades de rotina. Esse procedimento foi necessário para garantirmos que essa música não era uma variável de confusão.

5.4 - Desenho Experimental

O experimento teve a duração de 4 meses. As coletas foram programadas para ocorrer a cada dois meses. Os voluntários deveriam ouvir diariamente, na íntegra, um áudio contendo o tratamento com meia hora de duração, sendo aceitável uma frequência mínima de 4 (quatro) vezes por semana. O delineamento do experimento se resume ao que está demonstrado na Tabela 2:

Tabela 2 - Delineamento Experimental

Grupos / Tempo	0 dias	0 dias	60 dias	120 dias
Meditação	A	O	O / X	O
Relaxamento	A	O	O / X	O
Hipnose	A	O	O / X	O
Controle	A	O	O	O

A – Aleatorização dos grupos; X - Tratamento específico; O – Observação

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tal desenho experimental buscou controlar os principais erros de validade interna do experimento (CAMPBELL E STANLEY, 1979). A alocação dos indivíduos de maneira aleatória garantia a homogeneidade dos grupos. A observação antes do início do tratamento estabelecia o estado basal dos indivíduos. A observação aos 60 dias possibilitou o desenho de uma curva de evolução dos resultados. A última observação após o término do tratamento possibilitava, além de colher amostras, obter relatos sobre como foi a participação do indivíduo no estudo, tanto em termos de assiduidade como no que dizia respeito às sensações experimentadas por cada participante. O grupo controle e o grupo relaxamento foram fundamentais para aumentar a validade interna do experimento garantindo que não havia interferência não controlada de fatores externos nem psicológicos causados pela expectativa acerca das técnicas.

Durante a alocação dos sujeitos nos grupos, era aplicado o TCLE (Anexo 1) e, para garantir a participação dos sujeitos no estudo de maneira segura, foi incluído no próprio TCLE um questionário com perguntas filtro. No início do estudo, o questionário com perguntas filtro era aplicado a distância por meios eletrônicos (Anexo 6), mas após

algumas tentativas as perguntas filtro passaram a fazer parte do TCLE pois alguns voluntários mudavam suas respostas dadas no questionário filtro quando indagados sobre suas respostas na conversa preparatória, que ocorria no primeiro dia, após já estarem alocados nos grupos. Outras pessoas afirmavam não fazer uso de medicamentos para serem aceitas no estudo e acabavam revelando que faziam o uso de medicamentos após terem acesso ao tratamento e já terem feito uma das coletas. Com o novo formato, ao ler o TCLE as pessoas vias quão sério era o estudo e a importância do não uso de medicamentos para o desenho experimental. Isso reduziu a quantidade de pessoas deixando o estudo na segunda coleta por uso de medicamentos ou tratamento psiquiátrico, demonstrando assim, que essa adaptação do TCLE foi altamente impactante na qualidade do arcabouço amostral. Além disso, responder ao questionário vinha se tornando mais uma barreira à participação dos voluntários, visto que nem todos tinham familiaridade com o preenchimento de questionários eletrônicos.

Após a alocação dos sujeitos nos seus respectivos grupos, era feita a primeira observação, através de coleta de sangue periférico. Seria aplicado também um questionário de expectativas, mas por questões operacionais, após algumas tentativas, essa etapa foi trocada pela aplicação online dos questionários, pois fazer o cadastro em conjunto com a aplicação do questionário tornava o tempo da primeira coleta impraticável. A primeira coleta era a que mais recebia voluntários e o preenchimento do questionário fazia com que as pessoas tivessem que esperar além do que consideravam tolerável.

Nesse primeiro encontro era realizada uma sessão de explicação sobre a técnica que os voluntários estavam prestes a experimentar. Uma vez alinhadas as expectativas e estabelecido o “*rapport*”, as sessões de tratamento tinham início. Ao final da sessão, os participantes recebiam uma gravação com o seu tratamento e eram instruídos a praticar o tratamento guiados pelo áudio em um ambiente calmo, confortável e livre de interrupções. Era solicitado ao participante aplicasse o tratamento em si mesmo diariamente, no entanto seriam mantidos os sujeitos que se expuseram ao tratamento por pelo menos 4 (quatro) vezes por semana.

A segunda venipuntura ocorria dois meses após o início do tratamento e a coleta final após quatro meses de tratamento. Após a conclusão do estudo todos os sujeitos receberam os áudios de todos os tratamentos para que pudessem praticar e continuar

usufruindo dos benefícios das práticas pelo tempo que desejarem, de acordo com o que determina o comitê de ética em pesquisa com seres humanos.

5.5 - Considerações de segurança

Todos os protocolos e procedimentos práticos de tratamento foram planejados e executados sob a supervisão de psicólogos devidamente registrados no Conselho Regional de Psicologia e estão descritos nos apêndices. Profissionais capacitados estiveram disponíveis para prestar assistência caso houvesse necessidade, embora as técnicas de hipnose e meditação não ofereçam riscos à pacientes saudáveis.

Toda venipuntura foi conduzida por profissionais devidamente habilitados. Foram usados para tal, seringas, escalpes, adaptadores, luvas e agulhas todos descartáveis e os processos sanitários respeitaram os devidos protocolos de segurança e sanitização. O descarte desse material foi realizado de seguindo todas as normas legais e de segurança indicadas pela vigilância sanitária e através da Autoridade Municipal de Limpeza Urbana (AMLURB). Todas as coletas de sangue ocorreram em ambiente adequado que dispunha de mecanismos para o descarte adequado do material, álcool 70%, acomodações adequadas e limpas, ar condicionado e sala de espera separada do local de coleta.

As análises laboratoriais foram conduzidas no laboratório de oncologia do Hospital Israelita Albert Einstein seguindo os mais rigorosos padrões de segurança para evitar qualquer tipo de contaminação por conta de contato com o sangue dos pacientes. Os tubos de sangue apenas eram abertos dentro do fluxo, estando eu em um ambiente estéril, em um laboratório de pressão negativa e o presente aluno e pesquisador estava totalmente paramentado para manipular o sangue de maneira totalmente segura.

5.6 - Condição cega

Existem três possíveis alvos para a condição cega em um estudo: o paciente, os profissionais envolvidos na execução do projeto e o pesquisador (ESCOSTEGUY, 1999). No presente estudo, a condição cega não pôde ser aplicada aos pacientes, uma vez que as expectativas acerca dos tratamentos estavam sendo consideradas como

parte do processo. A expectativa é um componente importante principalmente em um estudo que compara hipnose e meditação, principalmente devido à meditação estar altamente associada a melhorias na saúde. Fato esse, que poderia ser fonte de erros na pesquisa se as expectativas não fossem controladas (PINTAR & LYNN, 2008). O cegamento ocorreu no momento da análise das amostras de sangue. As amostras foram rotuladas apenas com um código, evitando assim, erros de aferição (ESCOSTEGUY, 1999). Isso fez com que houvesse cegamento no momento do processamento das amostras e durante toda a análise laboratorial e processamento dos dados. Os responsáveis pela coleta não sabiam em qual grupo cada indivíduo foi inserido, de forma que não poderiam influenciar as expectativas destes.

Foi solicitado aos voluntários que não falassem com os participantes dos demais grupos a respeito das intervenções sofridas para evitar a contaminação dos resultados.

5.6 - Auto Relatos

Alguns questionários com propósitos diferentes foram aplicados ao longo do estudo. Antes da divisão dos grupos, no mesmo momento da apresentação do TCLE (Anexo 1) foram aplicados questionários de expectativa em relação às técnicas (Anexo 2). Esses questionários de expectativas passaram também a ser aplicados por meios eletrônicos para os demais interessados no estudo.

Ao longo de todo o estudo seria passado um questionário (Anexo 7) para avaliar a auto percepção de relaxamento, bem-estar e saúde dos sujeitos. Esse questionário seria passado antes e depois de cada tratamento in loco. Porém os encontros presenciais ficaram restritos às datas de coleta e esse questionário acabou sendo substituído por uma conversa sobre como os participantes estavam se sentindo ao longo do processo. Essa substituição foi bastante benéfica para aumentar o engajamento dos sujeitos que passavam a se sentir mais valorizados por tal conversa em relação a preencherem um questionário, que tornava a interação impessoal.

Foram substituídas as perguntas predominantemente fechadas dos questionários por perguntas abertas das entrevistas em formato de conversa. Além de aumentar o engajamento, tal substituição também faz mais sentido quando analisamos

a quantidade de pessoas que completaram tratamento. O tamanho de amostra esperado (120 sujeitos) possibilitava a aplicação de um estudo com de caráter conclusivo, enquanto que o tamanho de amostra obtido (14 sujeitos) coloca esse estudo na categoria de estudo exploratório, para o qual perguntas abertas são mais adequadas (FLICK, 2004). A pesquisa qualitativa será empregada utilizou entrevistas em profundidade pela técnica de laddering (FLICK, 2004), que consiste de um roteiro semiestruturado com questões que surgem a partir das respostas dos sujeitos aos tópicos pré-determinados por um roteiro.

5.7 - Pré-testes

Dada a originalidade desse estudo, especialmente no Brasil, foi necessário que tanto os protocolos dos tratamentos quanto os questionários passassem por uma etapa de pré-testes. Com essa etapa pudemos saber se os tratamentos produziram o efeito desejado e se sua duração é aceitável para os participantes, além de garantir que não haviam erros nos protocolos e questionários. O pré-teste foi realizado com cerca de 4 a 6 sujeitos e depois foi lhes solicitado que discorressem sobre pontos positivos e pontos de melhoria dos protocolos e questionários, além de indagar se haviam erros e se era tudo compreensível.

Quanto ao pré-teste dos questionários, foi adicionada a seguinte observação no final dos questionários online:

Coloque abaixo observações sobre questões que não estejam claras ou que te deixaram confuso (a).

Isso permitiu identificarmos três questões que potencialmente precisavam de adaptação:

“O paciente necessita estar em transe hipnótico para conseguir atingir as metas da intervenção”.

“Creio que sob hipnose a pessoa é um autômato à mercê do hipnotizador”.

“A pessoa hipnotizada encontra-se dissociada”.

Após as alterações, as questões ficaram como se segue:

“O paciente necessita estar em transe para obter benefícios da intervenção”.

“Creio que sob hipnose a pessoa é como um robô à mercê da vontade do hipnotizador”.

“A pessoa hipnotizada encontra-se fora de si”.

O mesmo vale para os questionários de meditação e relaxamento, nos quais também foram substituídas as palavras “as metas”, “é um autômato” e “dissociada” por “benefícios”, “é como um robô” e “fora de si” respectivamente.

Após tal substituição foi feito outro pré-teste para validar as novas questões submetendo os respondentes a ambas as questões originais e adaptadas, apresentadas de maneira aleatória. Obtivemos 40 respostas e submetemos tais respostas a análise estatística, fazendo um teste de chi quadrado dos valores observados versus valores esperados e um ranqueamento de coeficiente de correlação tau de Kendall que mostraram que essas questões eram similares, embora mais adaptadas ao contexto brasileiro, visto que esse questionário foi inicialmente criado para ser aplicado na Europa.

5.8 - Análises laboratoriais

Coleta do material biológico – Tal coleta foi feita através da venipuntura do sangue, preferencialmente do braço dos sujeitos. Essa foi realizada por profissionais habilitados para tal função. Foram coletados dois tubos de 3,5 ml de sangue e o tipo de tudo utilizado foi o de EDTA em um sistema de coleta à vácuo com o uso de adaptadores e escalpes descartáveis (ver Seção 5.5 para maiores detalhes de segurança).

Tratamento e Armazenamento das Amostras – Foi executado um protocolo de separação de células por densidade (Figura 2) utilizando o kit comercial Ficoll-Paque Plus® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Uppland, Sweden), para extrair as PBMCs e ao fazer isso as células que permanecem serão consideradas para esse estudo e assim denominadas PBMCs.

Figura 2- Separação por densidade Ficoll-Paque Plus®: PBMC está representado em cinza.

Fonte: VERHOECKX et al., 2015

O material coletado foi catalogado por um código para garantir a condição cega e refrigerado a 4°C por no máximo 12 horas. O transporte do material também foi cuidadosamente realizado com o devido acondicionamento. O material foi processado e armazenado nos laboratórios do Hospital Israelita Albert Einstein. Para que as amostras tivessem longa duração elas precisavam ser congeladas a – 80°C e para tal utilizamos a separação de células por densidade, utilizando um protocolo adaptado de Ficoll-Paque Plus® (Ficoll) seguindo os passos abaixo:

- 1 – Centrifugar por 5 minutos as amostras à 4°C na velocidade de 400 RCF – Essa etapa faz com que grande parte do plasma seja separada dos demais componentes do sangue.
- 2 – Identificar um tubo do tipo Eppendorf pelo número do paciente e data de análise. Coletar pelo menos 1 ml do plasma das amostras que após a centrifugação ficou suspenso. Descartar o restante do plasma no descarte líquido⁴.
- 3 – Adicionar 3 ml de tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline (**PBS**) a cada amostra e misturar bem – Essa etapa tem a função de reduzir a densidade do material biológico facilitando o procedimento a seguir.
- 4 – Para cada amostra, separar um tubo do tipo Falcon de 15 ml, identificado pelo número do paciente, contendo 3 ml de Ficoll. Nas primeiras amostras foram utilizados

⁴ O descarte líquido é um pote com hipoclorito que fica dentro do fluxo e serve para descartar reagentes e material biológico que não será mais utilizado de maneira segura.

4 ml de Ficoll, devido a uma adaptação do protocolo proposta pela equipe do laboratório, mas revisitando o protocolo original, passamos a usar 3 ml de Ficoll sem alteração nos resultados.

5 – Adicionar o sangue + PBS no tubo Falcon onde está contido o Ficoll de maneira que o material biológico fique suspenso, sem se misturar ao Ficoll. Como geralmente são analisadas diversas amostras no mesmo dia, a agilidade é importante nessa etapa, pois o material que está em suspensão começa a precipitar gradativamente e a separação por densidade não ocorrerá no material precipitado, de forma que células dentro desse material estão perdidas.

6 – Centrifugar os tubos de Ficoll + Sangue em PBS à 20°C na velocidade de 350 RCF (força centrífuga relativa – unidade de velocidade rotacional) por 40 minutos – as primeiras amostras foram feitas a 500 RCF mas depois a pesquisadora responsável pediu que alterasse essa velocidade e aparentemente não houve diferença nos resultados – nessa etapa o sangue irá sofrer uma precipitação gradativa. Como cada componente do sangue tem uma densidade específica, o Ficoll servirá como um filtro deixando passar os eritrócitos e neutrófilos e bloqueando a passagem do PBMC. Como o PBMC é mais denso que o Plasma, ao final dos 40 minutos, são formadas 4 camadas visivelmente diferentes dentro dos tubos Falcon (Figura 3).

Figura 3- Tubo Falcon após centrifugação do Ficoll + Sangue em PBS

Fonte: Elaborado pelo autor

7 – Para cada amostra, separar um tubo do tipo Falcon de 15 ml, identificado pelo número do paciente, contendo 4 ml de PBS. Após à centrifugação (passo 6), com o

auxílio de uma pipeta, extrair o PBMC (Figura 3) e colocá-lo nos tubos preparados com PBS – O PBMC tem o aspecto de uma nuvem branca e é muito difícil de coletar apenas PBMC sem qualquer plasma ou Ficoll, de forma que se tiver que coletar algo a mais é melhor que se colete plasma que não vai danificar as células e será facilmente separado nas próximas etapas. Todo o resto dentro do tubo pode ir para o descarte líquido.

8 – Centrifugue o PBMC + PBS à 4°C por 5 minutos à velocidade de 500 RCF – Esse processo, denominado lavagem em PBS serve para separar as células de outros reagentes.

9 – Descarte o sobrenadante no descarte líquido e adicione sobre o precipitado 2 ml de Tampão de Lise. Homogeneíze as células e o Tampão de Lise e deixe descansar por 5 minutos para que o Tampão possa agir. Em seguida centrifugue essa solução à 4°C por 5 minutos à velocidade de 500 RCF – Essa etapa permite com que as proteínas de interesse sejam purificadas.

10 – Descarte o sobrenadante e lave as células em 4 ml de PBS (etapa 8)

11 – Descarte o sobrenadante e homogeneíze o precipitado em 800 µl de PBS.

Após, seguidos esses 11 passos, foram feitas 4 alíquotas de células diluídas em PBS, sendo essas divididas como descrito abaixo:

- 232 µl * (Células + PBS) - em um Tubo Eppendorf rotulado como “DNA”;
- 232 µl * (Células + PBS) + 750 µl de TRIZOL - em um Tubo Eppendorf rotulado como “RNA”;
- 232 µl * (Células + PBS) + 500 µl *(SFB + 10% DMSO) + 500 µl *(RPMI) - em um criotubo;
- 232 µl * (Células + PBS) + 500 µl *(SFB + 10% DMSO) + 500 µl *(RPMI) - em um criotubo.

Todos os tubos receberam a numeração de cada paciente correspondente a cada amostra, data de análise e a identificação da pesquisa para evitar que se perdessem no laboratório pois nesses estariam contidas as células viáveis que eram de extrema importância para as análises. Enquanto a maioria dos tubos seguiam diretamente para o congelamento a -80°C em uma caixa de papelão comum identificada com os dados do pesquisador, enquanto os criotubos eram inseridos em

uma caixa denominada *Mr. Frosty™ Freezing Container* (ThermoFisher Scientific™ Rochester, NY, Estados Unidos) que promovia o congelamento lento das células e essa caixa era inserida no freezer à -80°C. Esse processo era necessário para garantir a viabilidade das células após o descongelamento. No entanto o *Mr. Frosty™ Freezing Container* era um recurso compartilhado por diversos pesquisadores, aumentando as possibilidades de amostras serem perdidas. Por essa razão os criotubos recebiam identificação extra. Após alguns dias os criotubos eram movidos para caixas de papelão convencionais pois as células já haviam sido congeladas lentamente e encontravam-se à -80°C.

Após essas etapas as células podiam ser armazenadas no freezer à -80°C por até 1 ano. Com isso, pude analisar todas as amostras ao mesmo tempo ao final do estudo independentemente de as coletas não terem ocorrido no mesmo dia.

Em resumo, foram congeladas células em PBS, células em PBS com mais 3 partes de TRIZOL (Life Technologies Europe Bv, Bleiswijk, South Holland, Netherlands), plasma e PBMC viável em meio RPMI+SFB com 10% de DMSO em dois tubos criogênicos de 1,5 ml.

Análise de Proteínas – A análise da AT do PBMC envolve a análise de proteínas específicas que nos permitem quantificar a AT nas células alvo. Para analisar as proteínas das amostras, essas devem passar por um processo que utiliza dois kits comerciais, sendo esses o TRAPeze XL (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) - específico para análise de AT - e o QuantiPro™ BCA Assay Kit (St Luis, MO, Estados Unidos) - específico para análise de proteínas. O QuantiPro™ BCA Assay Kit (BCA Assay) tem um protocolo específico, no entanto o protocolo do TRAPeze XL (TRAPeze) se sobrepôs a esse devido aos objetivos do trabalho. A análise das amostras se deu como descrito a seguir:

Passo 1 – Extração das proteínas de interesse:

- a) Descongelar um dos criotubos contendo células viáveis de cada amostra utilizando uma estufa a 37°C.

- b) Descongele o CHAPS LISIS BUFFER (tampão que acompanha o Kit TRAPeZe) em um isopor com gelo, de modo que o descongelamento ocorra lentamente e o reagente permaneça refrigerado ainda que descongelado.
- c) Transfira o conteúdo do criotubo para um tubo de centrifugação e centrifugue por 5 minutos à 20 graus na velocidade de 500 RCF e descarte o sobrenadante – Dessa forma pode-se de separar as células do meio de congelamento.
- d) Homogeneíze o precipitado (ressuspenda as células) em 1 ml de PBS. Centrifugue por 5 minutos à 20 graus na velocidade de 500 RCF e descarte o sobrenadante – Assim garante-se que as células foram separadas completamente de todo o meio de congelamento.
- e) Adicione 200 µl de CHAPS LISIS BUFFER em cada amostra.
- f) Homogeneíze a mistura e deixe no gelo por 30 minutos.
- g) Centrifugue por 20 minutos à 4°C na velocidade máxima da centrífuga.
- h) Faça 3 alíquotas coletando o sobrenadante e tomando cuidado para não coletar os detritos depositados ao fundo do tubo – Nesse momento as proteínas de interesse estão em suspensão e o que estiver precipitado deve ser descartado.
- i) Identifique os tubos pelo número do paciente, data do processamento, número da observação (dado que cada voluntário passou por 3 coletas, cada tubo foi identificado com o número do paciente e o número da coleta) e as letras BCA correspondentes à próxima etapa a ser realizada com o conteúdo desses tubos. Coloque os tubos imediatamente no gelo e leve para o freezer à -80°C o quanto antes.

Passo 2 – Diluição seriada:

O objetivo dessa etapa é criar uma curva com diferentes concentrações de BSA (acompanha o Kit BCA Assay) em CHAPS LISIS BUFFER (CHAPS) para que possamos avaliar a quantidade absoluta de proteínas em cada amostra. As quantidades descritas a seguir correspondem à diluição seriada para 900 µl de BSA que foi a diluição realizada para o presente estudo. Enumere 7 tubos do tipo Eppendorf de 2 ml cada e prepare-os da seguinte maneira:

1. 450 µl de BSA;
2. 450 µl de CHAPS + 450 µl de BSA;
3. 450 µl de CHAPS + 450 µl do conteúdo do tubo 2;
4. 450 µl de CHAPS + 450 µl do conteúdo do tubo 3;
5. 450 µl de CHAPS + 450 µl do conteúdo do tubo 4;
6. 450 µl de CHAPS + 450 µl do conteúdo do tubo 5;
7. 450 µl de CHAPS.

Como todas as amostras estão diluídas em CHAPS, o tubo 7 serve de controle para sabermos qual a quantidade de proteínas contidas no CHAPS, quantidade essa que deve ser extraída da quantidade total de proteínas apresentada na leitura da mistura de amostra + CHAPS.

Passo 3 – Quantificação de proteínas

- a) Descongelar as amostras e a curva em gelo.
- b) Homogeneizar as amostras e a curva com o uso de um Agitador de tubos tipo Vórtex.
- c) Centrifugar a curva e as amostras por 3 segundos.
- d) Pegar uma placa de 96 poços transparente e limpa de fundo achatado.
- e) Preparar poços em duplicata (colocar o mesmo material em dois poços seguidos), iniciando-se pela curva de concentração. Para montar a curva deve-se colocar 5 µl do conteúdo de cada um dos tubos preparados no passo 2 em dois poços respectivos. Se a preparação estiver correta os poços 1A e 2A devem conter material do tubo 1, os poços 3A e 4A devem conter material do tubo 2 e assim por diante até chegarmos ao 13º poço (1B) e ao 14º poço (2B) onde deve estar contido o material do último tubo (tubo 7) da diluição seriada. A partir daí coloque 5 µl de cada amostra a ser quantificada em cada dois poços seguidos. Isso é chamado de análise em duplicata e é utilizado para reduzir os erros causados por possíveis interferências no manuseio das amostras, principalmente pela falta de precisão das pipetas ou de pequenas variações causadas pela inabilidade manual, desatenção, entre outros possíveis erros por parte do pesquisador, além é claro de possíveis vieses causados pela placa.

- f) Preparar no mínimo 95 µl do reagente de trabalho para cada poço na seguinte proporção:

$$(25 \times \text{QA}) + (25 \times \text{QB}) + (1 \times \text{Cu})$$

Todos os reagentes acima citados acompanham o Kit BCA Assay. Os reagentes iniciam a reação logo após entrarem em contato uns com os outros, então esse passo deve ocorrer imediatamente antes do próximo passo e é aconselhável que se prepare um pouco a mais que 95 µl do reagente de trabalho para cada poço, pois se houver erro ao pipetar ou erro de cálculo, não haverá tempo hábil para preparar mais reagente de trabalho e as últimas amostras da placa correm o risco de não receber reagente de trabalho, ficando assim fora dessa análise.

- g) Adicionar 95 µl de reagente de trabalho em cada poço e agitar lentamente a placa em agitador de placas do tipo Vórtex por cerca de 2 minutos.
- h) Levar a placa à uma estufa pré-aquecida a 37°C e deixar a placa lá por 30 minutos.
- i) Levar a placa ao espectrofotômetro para fazer a leitura.
- j) No espectrofotômetro selecionar: Protocols / BCA Assay 560; marcar os poços que contém amostras; apertar o botão para abrir o compartimento; colocar a placa destampada atentando-se para o lado correto; fechar o compartimento e iniciar a leitura. Essa leitura pode ser exportada para o Excel no próprio espectrofotômetro e salva em um pen drive. Caso o espectrofotômetro não possua o protocolo, é possível fazer a análise selecionando a análise de absorbância e selecionando 560 nm.
- k) Exportar os dados para o Excel manualmente ou com o uso de um pen drive. Organizar os dados em uma Tabela da conforme a Tabela 3:

Tabela 3 - Absorbância da curva BSA vs CHAPS

Absorbância	(Duplicata)	Abs Média	Media - branco	concentração ug/ml
3,09E-01	3,62E-01	0,33548827	0,222	2000
2,07E-01	2,55E-01	0,231358115	0,118	1000
2,01E-01	2,08E-01	0,204610504	0,091	500
1,62E-01	1,68E-01	0,164890697	0,052	250
1,37E-01	1,48E-01	0,142608081	0,029	125
1,26E-01	1,23E-01	0,12448843	0,011	62,5
1,20E-01	1,06E-01	0,11317239	0,000	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

- I) Gerar uma regressão linear dos dados afim de obter a equação de regressão que será usada para o cálculo da concentração das amostras (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Regressão linear dos dados que gera a equação determinante para a concentração das amostras

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados acima (Figura 4) foram obtidos através de uma análise inicial de amostras válidas para o estudo (Anexo 9). Basicamente, o Gráfico deve ser obtido da correlação linear entre a média subtraída da média do branco⁵ e a concentração de

⁵ Branco é o valor médio obtido quando a concentração de BSA é igual a zero e, portanto, a substância consiste puramente de CHAPS (Tabela 4).

BSA em CHAPS, que é a curva que havia sido posicionada nos primeiros 14 poços da placa (Tabela 4). A partir dessa correlação obtém-se a equação da reta (fornecida pelo Excel quando se gera o Gráfico da reta), que no exemplo acima é:

$$y = 9156,3x - 123,45$$

Na equação, x consiste na absorbância média da amostra extraída da média do branco. As constantes são obtidas pela regressão linear entre a média do branco e a concentração da curva. Após isso, extrai-se a absorbância média das amostras e subtrai-se da média do branco. Coloca-se esse valor na equação acima descrita no lugar de x e, assim obtemos a concentração que na Tabela de exemplo é apresentada está em vermelho.

Tabela 4 - Dados do pré-teste obtidos no espectrofotômetro

Amostras	Absorbância	(Duplicata)	Concentração	Media - branco	Abs. Média	Sujeitos
Amostra 1	2,69E-01	2,63E-01	1523,1	0,153	0,266	35 (1)
Amostra 2	3,73E-01	3,75E-01	2514,7	0,261	0,374	35 (2)
Amostra 3	3,27E-01	3,34E-01	2111,7	0,217	0,330	35 (3)
Amostra 4	3,90E-01	4,03E-01	2714,9	0,283	0,396	48 (1)
Amostra 5	2,78E-01	2,78E-01	1632,9	0,165	0,278	48 (2)
Amostra 6	3,42E-01	3,29E-01	2156,4	0,222	0,335	48 (3)
Amostra 7	3,57E-01	3,55E-01	2348,2	0,243	0,356	51 (1)
Amostra 8	3,37E-01	3,37E-01	2172,8	0,224	0,337	51 (2)
Amostra 9	3,87E-01	3,89E-01	2637,2	0,275	0,388	51 (3)
Amostra 10	3,36E-01	3,50E-01	2224,3	0,229	0,343	75 (1)
Amostra 11	3,41E-01	3,33E-01	2174,6	0,224	0,337	75 (2)
Amostra 12	3,13E-01	3,18E-01	1974,6	0,202	0,315	75 (3)
Amostra 13	3,18E-01	3,09E-01	1957,9	0,200	0,314	78 (1)
Amostra 14	3,15E-01	3,44E-01	2104,6	0,216	0,330	78 (2)
Amostra 15	3,68E-01	3,76E-01	2495,0	0,259	0,372	78 (3)
Amostra 16	4,25E-01	4,32E-01	3010,1	0,315	0,428	87 (1)
Amostra 17	3,96E-01	3,87E-01	2668,9	0,278	0,391	87 (2)
Amostra 18	4,07E-01	4,14E-01	2849,0	0,298	0,411	87 (3)
Amostra 19	4,49E-01	4,37E-01	3144,6	0,330	0,443	99 (1)
Amostra 20	4,01E-01	4,02E-01	2764,6	0,288	0,402	99 (2)
Amostra 21	4,24E-01	4,28E-01	2988,6	0,313	0,426	99 (3)

Amostra 22	3,55E-01	3,56E-01	2342,5	0,242	0,356	109 (2)
Amostra 23	3,63E-01	3,51E-01	2355,3	0,244	0,357	109(2)
Amostra 24	3,79E-01	3,88E-01	2600,1	0,270	0,384	109 (3)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que a concentração da amostra seja aceitável ela deve estar entre limites dos valores da curva (Tabela 3), não podendo ser inferior a zero nem superior à concentração máxima de 2000ug/ml. Pelos dados da Tabela 4, apenas as amostras 1; 5; 12 e 13 podem ser diretamente incluídas na próxima etapa. As demais amostras devem passar por uma diluição em CHAPS formando um mix de 4 µl de amostra para 36 µl de CHAPS. Feita essa diluição o passo acima deve ser refeito para se obter novos valores de concentração das amostras que estejam dentro da curva.

Esse passo é necessário pois, para a execução adequada do protocolo de TRAPeZe XL é necessário fazer com que a concentração de todas as amostras seja a mesma, de forma que as amostras se tornem comparáveis. Uma vez conhecendo a concentração de cada amostra, foram feitas uma alíquota de cada amostra a uma concentração de 150ng/µl e um volume total de 30ul utilizando CHAPS para ajustar a concentração.

Para a padronização utilizamos a seguinte fórmula:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

Onde:

C_i = concentração inicial

V_i = volume inicial

C_f = concentração final

V_f = volume final

- Identifique tubos de PCR para cada amostra
- Coloque a quantidade necessária de CHAPS para a padronização das amostras em cada tubo

- c. Coloque a quantidade exata de amostra para realizar a padronização

Tais amostras podem ser utilizadas imediatamente ou congeladas à -80°C. No presente estudo, as amostras eram congeladas para ser analisadas a posteriori.

Medição da atividade da telomerase – Por uma questão de maior capacidade de comparação dos resultados com estudos anteriores, a AT do PBMC foi avaliada utilizando o Kit comercial TRAPeze XL (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), uma vez que esse é um dos protocolos mais utilizados para tal.

O kit entregue pela Labbran era composto de TSR8, CHAPS Lysis Buffer (CHAPS), Grade Water (dH₂O) e Reaction Mix. Deveriam ter vindo também no kit as células HeLa que são o controle positivo do kit, mas por um erro de fornecimento essas células não vieram e tiveram que ser obtidas por outros meios (Seção 7.6) cultivadas no laboratório para análise de 7 dos pacientes e para análise dos demais foram trazidas de outro laboratório da USP em Ribeirão Preto. O protocolo da forma como ele é realizado dentro do laboratório onde a etapa prática dessa pesquisa foi conduzida está descrito a seguir:

2- Prepare as diluições padrão do TSR8:

Marque 4 tubos de PCR: E1, E2, E3, E4.

- a. Coloque 20 µl de CHAPS em E2, E3 e E4;
- b. Coloque 10 µl de estoque TSR8 em E1;
- c. Faça diluições seriadas de 5 µl para cada tubo de forma que o tubo E4 seja o tubo com a menor concentração de TSR8.

Agite e centrifugue a cada passo. Essas diluições podem ser conservadas por até 2 semanas refrigeradas, mas nesse estudo foram preparadas momentos antes de seu uso para reduzir a possibilidade de erros ou de redução da ação dos reagentes, que poderia comprometer a validade interna do estudo.

3- Prepare o controle positivo (Controle 1)

Marque 1 tubo de PCR: D11

- a. Adicione 10 µl de CHAPS e 10 µl de alíquota de estoque de controle positivo HeLa⁶.
- b. Adicione 48 µl de Master Mix (item 5)

4- Prepare os controles negativos (Controles 2 e 3)

Controle negativo para Telomerase (Controle 2)

- a. Adicione 2 µl de tampão CHAPS
- b. Adicione 48 µl de Master Mix (item 5)

Controle negativo para Taq Polimerase (Controle 3)

- a. Adicione 2,4 µl de tampão CHAPS
- b. Adicione 10 µl de 5X TRAPeZe XL Reaction Mix + 37.6 µl de dH₂O

5- Preparação das amostras:

- a. Descongelar as amostras previamente preparadas para estar na concentração de 150ng/µl.
- b. Preparar controles inativados pelo calor - incubar 10 µL de cada extrato de cada amostra a 85 ° C por 10 min.

Agite e centrifugue a cada passo.

6- Preparação do *Master Mix*:

- a. Misture os reagentes descritos abaixo fazendo o cálculo para obter 48ul de Master Mix por poço.

		x(2n+8)
5X TRAPeZe XL Reaction Mix ⁷	10 µl	
Taq Polimerase (5 unidades/ µl)	0.4 µl (2 unidades)	
dH ₂ O	37.6 µl	
<hr/>		
Master Mix Total	48.0 µl	

⁶ O controle positivo pode também sofrer extração de proteínas e ser tratado como uma amostra convencional, sem que isso influencie os resultados. Tal procedimento foi adotado para metade dos pacientes.

Antes de usar, descongele todos os reagentes, misture bem e guarde no gelo. Serão utilizados 48 µl de Master Mix em cada poço da placa exceto no controle 3.

b. Para o controle 3:

5X TRAPeZe XL Reaction Mix ⁸	10 µl
dH ₂ O	37.6 µl
<hr/>	
Total	47.6 µl

7- Preparação da Placa:

- a. Prepare a placa colocando 2 µl da curva de TSR8 em cada poço conforme a Tabela 5. Adicione 2 µl dos controles 1 e 2, 2,4 µl* (CHAPS + Master Mix sem Taq Polimerase) no poço destinado ao controle 3. Adicione 2µl de cada uma das amostras em duplicata com seus respectivos controles inativados pelo calor, todos conforme apontado na Tabela 5.

Tabela 5 - Preparação da placa

TSR8_1	TSR8_2	TSR8_3	TSR8_4	Controle 1	Controle 2	Controle 3
Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7
Amostra 1*	Amostra 2*	Amostra 3*	Amostra 4*	Amostra 5*	Amostra 6*	Amostra 7*

Fonte: Elaborado pelo autor.

- b. Adicione 48 µl de Master Mix em cada poço, exceto no poço do controle 3.

*Amostras controle inativadas pelo calor a 85° C por 10 min.

- c. Vede a placa e coloque em um agitador para homogeneizar o conteúdo dos poços.
- d. Incube a placa no termociclador à 30°C por 30 min.
- e. Faça uma PCR em 4 passos:

Passo 1: 94°C por 30s; 59°C por 30s; 72°C por 1 min [36 ciclos];

Passo 2: 72°C por 3 min;

Passo 3: 55°C por 25 minutos;

Passo 4: 4°C Espera.

- f. Retire a placa imediatamente após o termociclador finalizar seu ciclo.

8- Prepare uma microplaca Corning ou similar de 96 poços. A placa deve ser preta de fundo achatado preto. Foi feito um pré-teste utilizando placas transparentes de fundo chato e os resultados foram insatisfatórios. Assim sendo, foram utilizadas no estudo as placas pretas propostas pelo protocolo original.

- a. Coloque 150 µl de tampão para mensurar fluorescência por poço (Tabela 6).

Tabela 6 – Preparação do tampão para mensurar fluorescência

Componentes	Volume	Concentração Final
Tris HCl pH 7.4 (1M)	1 ml	10mM
NaCl (5M)	3 ml	0.15M
MgCl ₂ (2M)	100 µl	2mM
MBG water	95.9 ml -	-
Volume Total	100 ml	

Fonte: Protocolo do Kit TRAPeZe XL

Como nenhum desses itens é fornecido nos kits existem algumas a considerações a serem feitas no preparo desse tampão e as mesmas estão dispostas no Anexo 8.

- b. Agite a placa no agitador

- c. Transfira o volume de *Telomere Repeat Amplification Protocol* (TRAP) que restou das reações de PCR (aproximadamente 45 µl) para os poços da placa estéril.
- d. Leia usando um Leitor de Microplacas em Fluorescência.
- e. Ajuste os parâmetros de leitura (Tabela 7) e execute o programa.

Tabela 7 - Faixas de leitura que devem ser usadas no equipamento

	Excitação	Emissão
Fluoresceína	485nm	535nm
Sulforrodamina	585nm	620nm

Fonte: Protocolo do Kit TRAPeZe XL

O equipamento utilizado para a leitura foi o Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Uusimaa, Finland). Mais detalhes no Anexo 5.

5.9 Expectativas

Caso houvesse alguma diferença na atividade de telomerase entre os grupos, seriam utilizados questionários para controlar os efeitos da expectativa CAPAFONS (2008). Tais questionários (Anexo 2) foram adaptados tanto para a cultura brasileira (Seção 5.7), quanto para as técnicas de meditação e relaxamento guiado.

6. RESULTADOS

6.1 - Arcabouço amostral

Dadas as razões expostas na seção de discussão (Seção 7.1), o índice de desistência do estudo foi muito acima dos 10% esperados, sendo 71,8%. Esses números consideram apenas os sujeitos que desistiram após a primeira coleta de sangue. Ao todo foram cerca de 10.000 pessoas expostas à comunicação do estudo via redes sociais e divulgações por indicação e cartazes. Dessas, cerca de 700 pessoas entraram em contato para saber mais sobre o estudo. O questionário com perguntas-filtro obteve 156 respostas.

Esse estudo contou com a participação efetiva de 65 pessoas das quais 18 chegaram até o final do tratamento, sendo que, por razões expostas na discussão (Seção 7.2), 14 sujeitos foram considerados de fato como aptos e tiveram a evolução da AT analisada. O material biológico dos demais participantes permanece congelado à -80°C para futuras análises.

6.2 - Questionário Preparatório

Inicialmente obtivemos 124 respostas do questionário preparatório. Foi perguntado se os participantes tinham alguma doença nervosa ou psiquiátrica e 13 pessoas afirmaram ter depressão, 13 pessoas afirmaram ter ansiedade, 7 disseram ter problemas psiquiátricos, mas não quiseram identificar quais seriam esses problemas e 6 pessoas afirmaram ter outros transtornos (Tabela 7). As pessoas que faziam uso de medicamentos de uso controlado para o tratamento de seus transtornos e aquelas que não quiseram revelar quais transtornos sofriam tiveram sua participação no estudo impedida. Das 124 pessoas que preencheram esse questionário, 78 não faziam nem nunca haviam feito o uso de medicamentos de uso controlado. Porém, eu deixei espaço para que explicassem suas respostas e 13 pessoas responderam que fizeram uso apenas no passado, de forma que poderiam participar do estudo, mas não teriam sido incluídas se não tivessem relatado isso espontaneamente. Além disso, o número de pessoas que se declaravam saudáveis era superior ao número de pessoas que declarava não fazer uso de medicamentos de uso controlado.

Devido a isso, esse questionário foi revisto para que pessoas que já tivessem feito o uso de medicamentos de uso controlado, mas que não fizessem mais o uso, pudessem ser incluídas no estudo. Também tivemos que filtrar participantes com pânico de agulhas e coleta de sangue pois tivemos um voluntário que chegou a desmaiar de medo da agulha durante a coleta.

Após a revisão 32 pessoas foram submetidas ao questionário das quais 22 nunca fizeram uso de nenhum medicamento de uso controlado e 30 não faziam uso desses medicamentos no momento. Isso significa que se esse questionário não tivesse sofrido a correção que sofreu, 8 pessoas teriam sido erroneamente impedidas de participar do estudo. 1 pessoa sinalizou ter problemas com coletas de sangue e não pode participar do estudo.

Ainda com a revisão, identificamos que o questionário não era uma boa forma de filtro, visto que algumas pessoas estavam mentindo ou omitindo transtornos e o uso de medicamentos na tentativa de forçar sua participação no estudo. Por isso o questionário deu lugar a uma entrevista pessoal e após ter certeza de que o candidato era apto, ele ainda deveria manifestar tal aptidão no TCLE, onde ele declarava não fazer uso de medicamentos de uso controlado nem possuir transtornos psiquiátricos que demandavam ajuda profissional.

Tabela 8 – Resultados do Questionário Preparatório

	Saudáveis	Depressão	Ansiedade	Não quiseram expor seu caso	Outros
Questionário 1	85	13	13	7	6
Questionário 2	24	3	2	0	3

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 - Questionário de expectativas

A seguir seguem os resultados dos questionários de expectativas, comparando as expectativas acerca das 3 técnicas às quais os sujeitos poderiam vir a ser expostos (Anexo 2) ao optarem por participar do estudo. Esse questionário foi aplicado de forma eletrônica e 1 dos questionários era enviado por sorteio para cada pessoa interessada na pesquisa. Algumas pessoas tiveram interesse em responder mais de um questionário.

O questionário de expectativas acerca do relaxamento guiado obteve 11 respostas (Tabela 8).

O questionário de expectativas acerca da meditação obteve 10 respostas (Tabela 9).

O questionário de expectativas acerca da hipnose obteve 30 respostas (Tabela 10).

Tabela 9 - Resultado das expectativas acerca do relaxamento guiado

Questões\Concordância	Discordo Totalmente	Discordo Bastante	Discordo	Concordo	Concordo Bastante	Concordo Totalmente
1	0	0	0	1	2	8
2	0	0	1	2	3	5
3	2	2	2	2	3	0
4	5	1	4	0	1	0
5	2	4	2	1	2	0
6	7	1	0	2	1	0
7	7	1	1	1	1	0
8	1	1	1	4	3	1
9	6	0	2	2	1	0
10	1	0	0	4	2	4
11	2	3	3	3	0	0
12	1	0	0	5	1	4
13	1	0	1	3	2	4
14	1	0	3	2	1	4
15	1	0	3	3	1	3
16	1	0	0	5	4	1
17	1	1	0	4	3	2
18	5	2	0	2	2	0
19	4	3	2	1	1	0
20	7	0	1	0	2	1
21	2	2	2	1	2	2
22	6	0	3	0	2	0
23	0	0	0	4	2	5
24	0	1	2	3	2	3
25	0	0	1	4	2	4
26	0	0	2	2	1	6
27	0	0	1	2	2	6
28	0	0	3	1	3	4
29	0	1	0	6	1	3
30	0	2	2	4	1	2
31	3	1	2	2	1	2
32	1	0	3	4	1	2
33	1	0	2	5	1	2
34	3	1	4	1	1	1
35	6	1	1	1	1	1
36	6	0	2	1	1	1
37	0	0	0	2	2	7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 - Resultados das expectativas acerca da Meditação

Questões\Concordância	Discordo Totalmente	Discordo Bastante	Discordo	Concordo	Concordo Bastante	Concordo Totalmente
1	0	0	0	3	3	4
2	0	0	0	4	3	3
3	2	0	4	3	1	0
4	4	0	5	0	1	0
5	3	1	4	0	1	1
6	5	0	3	1	0	1
7	4	3	2	1	0	0
8	1	2	0	3	2	2
9	2	0	5	2	1	0
10	0	1	1	4	2	2
11	2	2	0	5	0	1
12	0	0	1	3	2	4
13	0	0	1	4	3	2
14	0	1	1	5	1	2
15	0	0	2	6	1	1
16	0	0	1	6	1	2
17	0	0	1	2	2	5
18	5	1	2	2	0	0
19	4	1	5	0	0	0
20	6	2	2	0	0	0
21	3	1	4	2	0	0
22	7	0	3	0	0	0
23	0	1	0	4	1	4
24	1	0	0	6	2	1
25	1	0	1	6	0	2
26	0	1	1	3	2	3
27	0	1	0	3	3	3
28	0	1	0	3	3	3
29	0	1	1	6	0	2
30	1	1	2	4	1	1
31	5	0	3	2	0	0
32	2	1	2	4	1	0
33	2	2	1	4	1	0
34	2	2	4	1	0	1
35	5	2	0	2	1	0
36	5	2	2	0	1	0
37	0	0	0	2	3	5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11 - Resultados das expectativas acerca da Hipnose

Questões\Concordância	Discordo Totalmente	Discordo Bastante	Discordo	Concordo	Concordo Bastante	Concordo Totalmente
1	2	0	0	16	6	6
2	1	1	1	15	7	5
3	3	0	6	12	7	2
4	6	2	10	7	1	4
5	3	6	14	5	2	0
6	12	3	12	3	0	0
7	6	6	12	2	3	1
8	0	3	5	19	2	1
9	9	5	10	4	1	1
10	0	1	0	17	8	4
11	0	2	12	10	5	1
12	1	0	1	16	7	5
13	1	0	1	18	7	3
14	0	2	18	9	1	0
15	3	3	16	7	1	0
16	1	2	7	15	3	2
17	0	2	8	14	3	3
18	5	3	11	6	4	1
19	4	3	15	5	2	1
20	5	5	17	1	2	0
21	2	5	16	5	1	1
22	4	6	14	5	1	0
23	0	1	1	20	4	4
24	0	2	9	14	3	2
25	2	3	13	11	1	0
26	2	1	2	15	5	5
27	1	2	2	15	5	5
28	1	4	5	14	3	3
29	2	2	12	9	3	2
30	4	3	12	9	2	0
31	3	4	10	8	2	3
32	2	2	8	13	5	0
33	2	1	3	17	3	4
34	5	7	12	5	0	1
35	9	6	11	4	0	0
36	4	4	15	6	1	0
37	1	1	0	16	4	8

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.4 - Análises laboratoriais

Foram feitas inicialmente duas baterias de testes com material biológico de 7 voluntários em cada uma das baterias. Os resultados dos testes estão expostos a seguir. A atividade de telomerase é medida com o estabelecimento de um parâmetro de medição e diversos mecanismos de controle dos resultados. O parâmetro de medição é estabelecido pela curva (Tabelas 12, 14 e 16) criada pela diluição seriada do TSR8 em CHAPS (Seção 5.8), sendo o parâmetro máximo de atividade da telomerase estabelecido pelo TSR8 em sua forma pura e o mínimo obtido da concentração mínima de TSR8 em CHAPS.

Bateria 1

Tabela 12 - Curva Controle de TSR8 (bateria 1)

R8 (amole/rxn)	R8 (TPG unit)	Log[TPG]	FL (RFU)	ΔFL	R (RFU)	ΔR	$\Delta FL/\Delta R$	$\log[\Delta FL/\Delta R]$
TSR8 1 (0,4)	400	2,602059991	1,217	0,7807	6,404	6,0108	0,129883	-0,8864481
TSR8 2 (0,08)	80	1,903089987	1,240	0,8037	10,440	10,0468	0,079996	-1,0969338
TSR8 3 (0,016)	16	1,204119983	0,585	0,1489	11,170	10,7768	0,013817	-1,8595951
TSR8 4 (0,0032)	3,2	0,505149978	0,448	0,0121	11,430	11,0368	0,001096	-2,9600578

Fonte: Elaborado pelo autor.

A coluna *R8 (TPG unit)* é dada por protocolo e representa a concentração de TSR8 em CHAPS após a diluição seriada. *FL (RFU)* é a leitura obtida no Varioskan Lux de fluorescência na faixa de 485/535nm, apontada pelo protocolo de TRAPeze XL como sendo a leitura de fluoresceína. *R (RFU)* é a leitura obtida no Varioskan Lux de fluorescência na faixa de 585/620nm, apontada pelo protocolo de TRAPeze XL como sendo a leitura de sulforrodamina. ΔFL é a variação da fluoresceína da curva em relação à fluoresceína do controle 2 (controle negativo para telomerase). ΔR é a variação de sulforrodamina da curva em relação à sulforrodamina do controle 3 (controle negativo para Taq Polimerase). Em seguida faz-se uma regressão linear entre o Logaritmo da concentração de TSR8 e $\log[\Delta FL/\Delta R]$ (Gráfico 2) por onde pode-se obter a equação para o cálculo da atividade de telomerase nas amostras (Gráfico 3). Quanto mais próximo de 0,99 o R^2 , maior a validade interna do experimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nessa curva estão representados TSR8 2, TSR8 3 e TSR8 4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da regressão linear da curva da primeira bateria, foi obtida a equação:

$$y = 1,336x - 3,5352$$

Essa equação é aplicada para definir o valor do Log [TPG], sendo:

$$y = \text{Log [TPG]}$$

$$x = - \text{Log } [\Delta\text{FL}/\Delta\text{R}]$$

Descoberto o valor de Log [TPG], extrai-se a potência desse valor e se obtêm a valor de produto gerado total (TPG) de atividade de telomerase. Ao colocar os dados da equação da reta foram obtidos os resultados apresentados nos Gráficos 4 e 5, obtidos a partir da Tabela 23 (Anexo 10).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Bateria 2

Os Gráficos 6, obtido a partir da Tabela 24 (Anexo 10) e 7, evidenciam o erro na obtenção da curva de TSR8, visto que os valores de sulforrodamina de TSR8 2 e TSR8 3 estão inferiores aos valores de TSR8 4. O esperado era que tais valores aumentassem proporcionalmente à concentração de TSR8.

Devido a tais limitações, o Gráfico da curva de TSR8 teve apenas dois pontos (TSR8 1 e TSR8 4), comprometendo a validade interna dessa bateria.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da regressão linear da curva da segunda bateria, apresentada no Gráfico 7, foi obtida a equação:

$$y = -0,4124x + 1,5784$$

Ao colocar os dados da equação da reta foram obtidos os resultados dispostos nos Gráficos 8 e 9, obtidos a partir da Tabela 25 (Anexo 10).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como os resultados da segunda bateria não foram satisfatórios devido aos problemas apontados na curva de controle, foi realizada uma terceira bateria com as amostras dos mesmos sujeitos da segunda bateria.

Bateria 3

Tabela 133 - Curva Controle de TSR8 (bateria 3)

R8 (amole/rxn)	R8 (TPG unit)	Log[TPG]	FL (RFU)	ΔFL	R (RFU)	ΔR	$\Delta FL/\Delta R$	$\log[\Delta FL/\Delta R]$
TSR8 1 (0,4)	400	2,602059991	5,797	5,250	8,249	6,3160	0,831238125	-0,08027455
TSR8 2 (0,08)	80	1,903089987	4,921	4,374	7,315	5,3820	0,812727611	-0,09005499
TSR8 3 (0,016)	16	1,204119983	4,167	3,620	12,410	10,4770	0,3455283	-0,46151638
TSR8 4 (0,0032)	3,2	0,505149978	2,232	1,685	14,370	12,4370	0,135490874	-0,86808996

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados apresentados na Tabela 13, resumidos no Gráfico 10, foram criados alguns cenários, sendo que a curva representada no Gráfico 11 foi a que mais elevou o R^2 sem comprometer a validade interna dessa bateria. Nessa curva estão representados TSR8 2, TSR8 3 e TSR8 4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da regressão linear da curva da terceira bateria, apresentada no Gráfico 11, foi obtida a equação:

$$y = 0,5566x - 1,1434$$

Ao colocar os dados da equação da reta foram obtidos os resultados apresentados nos Gráficos 12 e 13 obtidos a partir da Tabela 17 (Anexo 10).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto mais próximos esses valores estiverem do controle positivo, maior a atividade de telomerase observada, ou seja, quanto mais baixos os valores, maior a atividade de telomerase apresentada na amostra analisada. Todas as operações até então realizadas resumem-se na seguinte equação:

Os resultados das duas baterias de testes válidas (1 e 3) estão resumidos nas Tabelas 14 e 25 (ANEXO 10) e apresentados nos Gráficos 14 e 15. Os voluntários que tiveram aumento da atividade de telomerase em PBMC ao longo de sua participação no estudo estão em laranja e os pacientes com queda na atividade de telomerase em PBMC estão em azul. As amostras de controle inativadas por calor não foram destacadas por serem apenas controle.

Tabela 14 - Resumo dos resultados da bateria 1 (valores de TPG)

Paciente	Grupo	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Data de participação
35	1	2,235133696	#NÚM!	#NÚM!	Fev/2019 - Jul/2019
35i	1	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
78	2	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	Jun/2019 - Out/2019
78i	2	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
91	2	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	Jul/2019 - Nov/2019
91i	2	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
43	3	2,076287066	#NÚM!	0,024757	Jul/2019 - Nov/2019
43i	3	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
98	3	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	Jul/2019 - Nov/2019
98i	3	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
48	4	24,84603481	#NÚM!	#NÚM!	Jun/2019 - Out/2019
48i	4	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
101	4	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	Jul/2019 - Nov/2019
101i	4	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!	
Controle Positivo		0,00033051			16 de Julho de 2020

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados apresentados na Tabela 15 não foram extraídos dos resultados do controle inativado pelo calor, porém se os controles inativados por calor tiverem a atividade da telomerase superior à de sua respectiva amostra não inativada (dados em vermelho na Tabela 15), isso invalida aquela amostra, pois o controle inativado deveria apresentar uma atividade de telomerase inferior à amostra, visto que o calor inativa a telomerase. Se esse valor for superior é devido a alguma fonte de contaminação. Seguindo esse critério, as amostras 17(coletas 2 e 3), 27(coletas1, 2 e 3), 51(coleta 3), 87(coletas1 e 2), 99(coleta 3) e 75 (coletas1, 2 e 3) foram invalidadas por seu controle inativado. Os Gráficos 16 e 17 tornam ainda mais fácil a comparação entre o resultado das amostras comparado ao seu controle inativado pelo calor. Quando a barra laranja é maior do que a azul, isso indica que aquela amostra apresentou resultados válidos.

Tabela 15 - Resumo dos resultados da bateria 3 (valores de TPG)

Paciente	Grupo	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Data de participação
17	1	0,476413516	1,25518 8	1,529264	Ago/2018 - Dez/2018
17i	1	1,069620682	0,58334 8	0,46509	
27	2	3,761814195	0,78274 5	0,950979	Dez/2018 - Maio/2019
27i	2	0,431292235	0,45972 9	0,436781	
51	2	#NÚM!	1,09053 4	1,514003	Out/2018 - Maio/2019
51i	2	1,187138596	4,67735 8	0,665405	
109	2	0,976603804	1,19843 3	0,710904	Jun/2019 - Out/2019
109i	2	1,755912997	#NÚM!	#NÚM!	
87	3	0,913264815	1,59932	1,327597	Out/2018 - Fev/2019
87i	3	0,431613006	0,57787 8	1,396348	
99	3	0,696864693	0,85030 5	2,483225	Out/2018 - Fev/2019
99i	3	1,163059088	3,11777 9	0,832779	
75	4	0,947161692	1,17658	3,777571	Jun/2019 - Out/2019
75i	4	0,462966401	0,625	0,329363	
Controle Positivo		0,13701804			23 de Setembro de 2020
Controle Positivo Inat.		0,406522291			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.5 - Auto percepção dos resultados do tratamento

Os benefícios dos tratamentos e, até mesmo da música aplicada ao grupo controle, podem ir além de seus efeitos na atividade da telomerase em PBMC. Esses tratamentos podem surtir efeitos de ordem psicológica nos sujeitos tratados. Para entender tais benefícios, foi aplicado em todos os voluntários que concluíram sua participação no estudo o “questionário para a avaliação da percepção dos resultados do tratamento” (Anexo 7). A escala de respostas utilizada foi a Centimax (Borg 2007) que vai de 0 a 120, sendo 120 o máximo grau de concordância possível (Anexo 7). Os resultados das percepções de cada paciente estão expostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Avaliação da percepção dos resultados do tratamento usando a escala de Centimax (Anexo 7).

Participante	Questões*				Grupo	Término da participação
	1	2	3	4		
35	95	90	95	95	1	12-jul-19
17	50	60	60	60	1	2-dez-18
27	70	60	60	60	2	2-mai-19
51	60	70	50	120	2	2-mai-19
57	70	80	50	85	2	10-nov-19
91	120	90	100	100	2	17-nov-19
78	65	80	27	65	2	15-out-19
109	70	100	50	75	2	15-out-19
43	110	80	60	80	3	10-nov-19
98	120	70	70	100	3	6-nov-19
66	90	95	75	90	3	6-nov-19
99	100	80	70	100	3	15-fev-19
87	60	80	70	110	3	15-fev-19

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os participantes estão aqui identificados pelo seu número pois alguns não queriam ter seus nomes expostos.

6.6 - Relatos

Os relatos a seguir foram obtidos durante os encontros ou por meios eletrônicos após os participantes encerrarem sua participação no estudo. Todos os relatos que estão aqui listados foram incluídos na tese com autorização prévia por parte dos voluntários aqui citados.

6.5.1 Tamara, 41 anos – Grupo Hipnose (21/11/2019)

“Acredito que de fato, após participar do estudo, sinto me menos ansiosa, voltei a praticar esportes, e de alguma forma tornei me uma pessoa mais confiante”

6.5.2 Rosangela, 40 anos - Grupo Hipnose (22/09/2019)

Essa voluntária experienciou conscientemente um efeito para o qual a técnica foi projetada. Esse é o efeito de treino, ou seja, a cada dia que ela aplicava a hipnose, ela sentia um efeito mais forte e uma capacidade mais vívida de imaginação, além de ser capaz de ouvir mais detalhes do áudio. Esse efeito era potencializado pela instalação do signo sinal e ela disse que chegava a um estado de hipnose profunda cada vez mais rápido, evidenciando a efetividade desse mecanismo.

Ainda assim, essa voluntária não concluiu sua participação no estudo dizendo não ter tempo para ouvir o áudio diariamente.

6.5.3 Priscila, 37 anos - Grupo de Relaxamento (22/11/2019)

“Me senti bem após o término do tratamento, mas depois de uns 2 meses sem fazer o relaxamento, acho que já voltei a ficar mais tensa e estressada”

“Então tipo esse após o tratamento é imediatamente após, seria 70, mas o benefício acabou rápido”

6.5.4 Rebelc, 27 anos – Grupo de Relaxamento (22/11/2019)

“Gostei muito de fazer parte desse estudo, em poder colaborar com a pesquisa sabendo da importância de encontrar métodos de tratamento eficazes em nosso país considerado subdesenvolvido, onde muitos países ainda têm visão de um país dominado pelos índios onde "não" se tem profissionais qualificados. Eu como profissional da área da saúde, fisioterapeuta me senti privilegiada em conhecer um método de tratamento onde evitamos medicamentos que podem apresentar "risco-benefícios", pensando num estilo de vida preventiva para não cairmos na Zona do tratamento curativo. Estilo de meditar, cuidar do corpo e mente, aliviando tensões e estresses por um relaxamento guiado, num curto período de 30min que pode mudar toda uma rotina de apenas acúmulos de pontos gatilhos para uma estafe corporal e mental. Parabéns ao Dr. Anderson em pensar, traçar uma pesquisa bacana, para colaborar em nossa sociedade e nossa área da saúde. E propiciar uma melhora na qualidade de vida de muitos brasileiros”

6.5.5 Giovane, 21 anos – Grupo de Relaxamento (21/11/2019)

“Com uma duração tão longa do experimento, cada dia era de um jeito diferente. Alguns eram muito bons, eu me sentia muito bem após a prática, mas em outros eu ficava agitado, o resultado acabava indo um pouco ao contrário do esperado. Esse é um problema que eu sempre tive quando tentava fazer meditação ou relaxamento por conta própria, o que me

desmotivava a continuar. Com esse experimento fiquei motivado a ver se mesmo com esses dias mais difíceis eu conseguiria ter resultados positivos”

6.5.6 Celso, 34 anos – Grupo Relaxamento (21/11/2019)

“Eu gostei bastante do processo de relaxamento. Foi um hábito interessante. Espero vez os resultados dos exames para ver o quanto a mente influencia o corpo”

6.5.7 Isa, 32 anos – Grupo Relaxamento (25/09/2019)

A voluntária afirma que ouvir o áudio como parte de sua rotina aumentou sua capacidade de foco e concentração em outras atividades.

Apesar de estar no grupo relaxamento, essa paciente percebeu que estava realizando uma meditação. Isso ficou claro em nosso último encontro, no qual perguntei em qual grupo a paciente estava e apesar de ter sido instruída de que estava no grupo relaxamento, a paciente alegou estar no grupo meditação.

“Foi uma experiência muito agradável e ajudou muito na minha concentração”.

6.5.8 Karina, 33 anos - Grupo Meditação (22/09/2019)

A voluntária disse ter um aumento da sua capacidade imaginativa, porém em alguns momentos descreveu uma certa inquietação e desejo de que o áudio terminasse rapidamente.

6.5.9 Rubens, 55 anos - Grupo Meditação (23/11/2019)

“Gostei da experiência, embora não tenha seguido com assiduidade, sei que é muito bom pra minha ansiedade”

6.5.10 Maria, 75 anos – Grupo Controle (22/09/2019)

A paciente afirma ter tido uma melhora em sua capacidade motora e que suas dores acabaram graças ao áudio em conjunto com fisioterapia. Já vinha fazendo fisioterapia antes, porém sem resultados.

“Agora consigo subir e descer escadas sem dor nem dificuldade” – ela afirma.

6.5.11 Mariana, 26 anos – Grupo Controle (25/09/2019)

A voluntária afirma ter tido uma melhora na qualidade de seu sono, e que nunca mais ficou doente desde que começou a ouvir ao áudio. Além disso, sentiu melhora na sua capacidade de tomar decisões.

6.5.12 Fernanda, 37 anos - Grupo Controle (25/09/2019)

A voluntária não gostou da música, dizendo que a deixa impaciente e ansiosa para que acabe.

6.5.13 Gisele, 32 anos – Grupo Controle (20/11/2019)

A voluntária declara ter tido aumento da sua concentração e foco para iniciar os estudos ao ouvir a música diariamente.

6.5.14 Sandra, 45 anos – Grupo Controle (15/10/2019)

A voluntária declarou gostar muito do áudio e no primeiro encontro disse que ouvia diversas vezes, mas depois a instrui a se limitar a ouvir uma vez ao dia para não gerar viés nos resultados.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo gerou diversas informações relevantes sobre a temática para estudos e análises da ciência, uma vez que este trabalho define um protocolo experimental para abordagens futuras. Esta é, por si só, uma importante contribuição para o estudo científico nas áreas de hipnose, relaxamento e demais técnicas denominadas coloquialmente de “holísticas”. No aspecto Metodológico, para as medidas e intervenções psicológicas foi demonstrado em detalhe os cuidados no processo de seleção amostral, o estabelecimento de um desenho experimental controlado e a sua aplicação. Para a determinação de biomarcadores psicofisiológicos, foram apresentados detalhadamente os procedimentos laboratoriais para o congelamento de amostras sanguíneas, extração de proteínas e análise da atividade de telomerase com os devidos kits comerciais. Tal revisão detalhadas de métodos dificilmente é exposta na literatura (SCHUTTE & MALOUFF, 2013; BLACK &

SLAVICH, 2016 e.g.), sendo acessível apenas para aqueles que fazem treinamentos específicos em laboratório. O benefício desta sistematização de conteúdo, mostrando uma descrição tão detalhada é, fomentar futuros estudos transdisciplinares, visto que encoraja não especialistas em biologia a propor estudos relacionados à atividade da telomerase.

7.1 - Desenho Experimental

Um dos primeiros trabalhos que este doutoramento demandou, foi o desenvolvimento de metodologia específica. Esta contribuição inédita para a literatura da área apesar de trabalhosa permitirá futuros estudos com maior padronização metodológica, o que facilitará comparações entre resultados obtidos em diferentes grupos de pesquisa.

O desenho experimental inicial buscava obter um estudo com alta validade interna e externa, ou seja, com métodos de alta fidedignidade e resultados conclusivos, capazes de serem extrapolados para outros grupos. Porém, o tamanho da amostra inicialmente almejado não foi alcançado. Este desafio metodológico é uma importante caracterização da condição de obtenção de participantes para estas linhas de pesquisa. Tal fato comprometeu a validade externa do estudo, mas a validade interna foi preservada. Dessa forma esse estudo deixou de ser um estudo conclusivo, capaz de confirmar hipóteses, para tornar-se um estudo exploratório. Assim, os resultados que obtivemos são capazes de trazer conhecimentos valiosos para futuros estudos de hipnose, meditação ou para os que pretenderem usar a atividade de telomerase como biomarcador.

Adicionalmente, esse estudo gerou a coleta de centenas de amostras de material biológico que são muito relevantes para futuros estudos complementares. Tais materiais permanecem armazenados nos laboratórios do Hospital Israelita Albert.

7.2 - Atividade da Telomerase

A amostra 35 foi a única que mostrou um aumento na atividade da telomerase. A amostra 99 foi a única que mostrou queda na atividade da telomerase. Ambos os pacientes pertenceram ao grupo meditação, não sendo possível afirmar que a técnica

influenciou de qualquer forma a atividade da telomerase nas baterias de testes realizados.

Quanto ao material biológico dos demais pacientes, não houve uma tendência de queda ou crescimento da atividade de telomerase em seu PBMC, independentemente do tratamento ao qual foram expostos. A falta de resultados em favor das técnicas não invalida o estudo. Pode ser que os protocolos dos tratamentos precisem ser reelaborados ou que os testes de atividade de telomerase possam ser refeitos pelas razões apontadas na Seção 7.5. Além disso poderiam ser utilizados outros biomarcadores para complementar os resultados, como por exemplo, a medida de comprimento dos telômeros, já que o comprimento do telômero é diretamente impactado pela atividade da telomerase. Caso a telomerase não estivesse ativa apenas no momento da coleta dada sua janela de atividade de 72 horas (VALENZUELA et al., 2002).

O tempo exíguo para a finalização deste doutoramento que incluiu o desenvolvimento de metodologia e ainda, a coleta de dados experimentais, não permitiu que avançássemos nestas análises, mas certamente a faremos em um futuro próximo. A disponibilidade do material biológico, como mencionado, permitirá a exploração de mais variáveis genéticas.

7.3 - Auto percepção dos resultados do tratamento

Ainda que a atividade psicofisiológica medida pela telomerase seja um item importante para esse estudo, ele não é o único item relevante. Aspectos psicológicos relacionados a consciência de mudança de estado interno foram avaliados e mostraram-se importantes. Muitos voluntários desse estudo relataram ser beneficiados pelas práticas empregadas, seja de meditação, relaxamento ou hipnose terapêutica ao longo desse estudo. Ainda, diversos outros dados acerca de expectativas, sensações acerca do tratamento, entre outros puderam ser coletados.

Como o propósito principal das técnicas empregadas no estudo era promover melhoria em saúde, a pergunta 3 (três) do questionário para a avaliação da percepção dos resultados do tratamento (Anexo 7) se torna essencial para esse estudo, visto que a percepção da melhora em saúde pode alterar os resultados. Com base nos dados aqui apresentados, apenas dois sujeitos sentiram melhora significativa em sua saúde

após o estudo e esses sujeitos já tinham uma atitude muito positiva em relação à técnica ao qual foram expostos. Ainda assim, atitude positiva em relação à técnica não significou que eles dariam notas altas para a pergunta 3 (três). Apenas 1 pessoa relatou não sentir melhora em sua saúde, porém ela não tinha uma atitude positiva em relação à técnica empregada e ainda assim ela pontuou uma nota elevada para a sua sensação de bem-estar em participar do estudo e criou um relato positivo quanto à sua participação no estudo.

Esse questionário foi aplicado para todos os participantes em 22 de novembro de 2019 e os voluntários terminaram sua participação no estudo em tempos diferentes (Tabela 8). Visto que a pergunta 3 (três) faz uma reflexão sobre o estado de saúde atual dos sujeitos e sobre a influência da participação no estudo em seu estado atual de saúde, essa pergunta acabou medindo momentos diferentes e sensações diferentes em relação aos efeitos pós-estudo.

Para entender como estavam as expectativas dos sujeitos em relação ao efeito do estudo e como se sentiam na ocasião do término do estudo, foi necessário incluir uma questão que comparasse o estado atual de saúde do sujeito ao seu estado ao sair do estudo. É demonstrado na Tabela 20 que houve diferença significativa na concordância com a afirmação 3 em relação à concordância com a afirmação 4. Isso indica que os efeitos sentidos na saúde logo após finalizar sua participação no estudo foram se atenuando ao longo do tempo. Por essa razão, considerou-se a pergunta 4 como sendo a pergunta que de fato mostra como estavam as expectativas dos sujeitos em relação à melhoria de sua saúde graças ao estudo.

É importante considerar que o arcabouço amostral desse questionário sofre viés de seleção, pois todos que responderam a esse questionário permaneceram no estudo por 4 meses e alguém que pontuaria muito baixo nos itens desse questionário dificilmente teria aguentado passar 4 meses participando do estudo.

7.4 - Relatos

Relatos como os descritos no item 6.5, são de extrema importância pois motivam a comunidade científica a continuar esse trabalho tão importante e muitas vezes pouco reconhecido. Tais relatos servem também como fonte de feedback para que os métodos científicos possam melhorar cada vez mais. Além disso, para o

participante, relatar sua experiência faz com que ele se sinta ouvido e ainda promove uma autorreflexão, que pode motivar sua participação em estudos futuros, beneficiando a comunidade científica como um todo, caso a prática de colher relatos assim se torne amplamente difundida. Todos estes aspectos levantados no presente estudo são de grande importância para o desenho de estudos futuros, buscando uma sistematização e objetivação científica da área, ainda pouco encontrada na literatura.

Em termos de benefícios para esse estudo, graças a esses relatos, pôde-se verificar que, surpreendentemente, participantes do grupo controle estavam também tendo experiências interessantes e muitas vezes similares aos resultados obtidos por pessoas dos grupos experimentais.

Por exemplo o relato da participante F.X. (Seção 6.5.12), no qual relata que sentia uma inquietação ao ouvir o áudio, mesmo sendo do grupo de controle positivo no qual ela apenas ouvia a música de fundo das induções que servia de base para os áudios que estavam sendo aplicados nos grupos de tratamento. Ela disse que a música a incomodava.

Tal relato foi muito relevante para entender o relato do voluntário G.S. (Seção 6.5.5), que fez parte do grupo de relaxamento. Ele relata que a duração das sessões era um problema e que havia dias em que ele se sentia incomodado enquanto realizava o relaxamento. Ele atribui esse desconforto ao tempo de duração da técnica. Como tanto o G.S. que foi do grupo de tratamento quanto F.X. que foi do grupo controle relataram uma sensação de desconforto, é possível se levantar os elementos comuns para ambos e assim aprimorar o método em uma pesquisa futura, visando reduzir a desistência dos voluntários ao longo do estudo. Elementos em comum entre os dois grupos (F.X e G.S.) são a música, mas além dessa, o tempo de execução por Seção, a frequência, a duração do estudo como um todo, as coletas, além de variáveis não controladas pelo estudo, como economia, política, etc. O fato de participar de um estudo científico de 4 meses já pode ser capaz de tirar os sujeitos de seu estado basal.

É relevante salientar que, assim como houve relatos em ambos os grupos (tratamento e controle) de desconforto com a música, também houve relatos positivos em todos os grupos. O importante é entender o quanto dessas experiências relatadas tem relação direta com o tratamento, o que faremos em momento posterior ao desta Tese. Assim pode-se melhorar os processos além de considerar tais experiências na hora de analisar os resultados finais.

7.5 - Limitações

7.6.1 – Desenho experimental: A quem quer que deseje realizar um trabalho experimental semelhante a esse, é válido que se faça algumas considerações. Esse estudo foi conduzido em um grande centro urbano e isso facilitava a exposição dos sujeitos de interesse à divulgação do estudo. Entretanto, o tempo de deslocamento dentro da cidade fazia com que muitos dos interessados não chegassem ao final do estudo e fazia também com que muitos não passassem do contato inicial por meios eletrônicos. Fora isso muitas pessoas alegaram falta de tempo para continuar ouvindo os áudios e acabaram por desistir da prática. Houve muitos casos de desistência devido a participantes iniciando algum tratamento psiquiátrico ao longo do estudo. O desenho experimental não contemplava a participação de pessoas em tratamento psiquiátrico medicamentoso, no entanto, a quantidade de interessados que apareceram que faziam tal tipo de tratamento, mostrou uma possível carência desse público por esse tipo de tratamento e seria relevante conduzir estudos do tipo nesse público se proporcionadas as condições necessárias para que esses sujeitos participassem com segurança.

O experimento foi projetado para um arcabouço amostral de 120 participantes, sendo 30 participantes por grupo. Tal tamanho de amostra se mostrou muito ambicioso devido aos altos índices de desistência e à quantidade de pessoas que foram eliminadas na pergunta filtro. Para um estudo dessa magnitude seria necessário atrair muito mais pessoas interessadas e desenvolver mecanismos para reduzir consideravelmente os níveis de desistência.

O nível de desistência esperado era de 10%, mas em realidade, o nível apresentado passou dos 70%. A taxa de desistência foi próxima de 78,4%. Para esse nível de desistência, considerando que de 10.000 pessoas expostas a comunicação apenas 65 de fato conseguiram iniciar no estudo e que desses, apenas 14 finalizaram sua participação no estudo, seria necessário atrair cerca de 85.000 participantes para alcançar a amostra desejada (120 voluntários). Ainda que a desistência fosse de 10%, seriam necessários aproximadamente 20.000 interessados para que as ambições do projeto inicial fossem alcançadas. Para alcançar tal amostra, seria necessária uma

equipe, de forma a aumentar a conversão dos interessados em voluntários ou uma verba exclusiva destinada a divulgação do estudo.

As coletas foram precisamente programadas para ocorrer a cada dois meses. O estudo enfrentou diversos obstáculos para chegar próximo de tal feito. Era desafiador encontrar profissionais qualificados com disponibilidade de horário que coincidissem com a disponibilidade de horário dos voluntários para realizarem a coleta. Talvez fosse prudente em estudos futuros buscar biomarcadores menos complexos de coletar, que possam ser encontrados por exemplo na saliva, de forma que a própria pessoa ou o pesquisador pudesse realizar a coleta de maneira segura.

Os voluntários ouviriam o áudio na íntegra por meia hora e com assiduidade diária, sendo aceitável uma frequência mínima de 4 vezes por semana. Tal exigência demanda que o voluntário seja capaz de focar sua atenção por 30 min por dia, além de demandar que ele tenha tal disponibilidade de tempo. Apesar de o tempo de sessão já ter sido reduzido em relação às técnicas originais, isso pode ter sido a razão para tanta desistência. Seriam necessários estudos complementares para verificar o tempo ideal de tratamento, visto que o sujeito aplicaria o tratamento em si mesmo e que o tempo e qualidade do tratamento estão diretamente ligados à assiduidade, que reflete no comprometimento com o estudo. O desafio está em gerar engajamento para que os voluntários, visto que o estudo compete inclusive, com outras atividades remuneradas.

7.6.2 – Kit TRAPeZe: Nos sites onde é vendido, o kit TRAPeZe é anunciado como sendo capaz de fazer 112 análises (Figura 5), mas ao receber o kit e ler seu manual, identifica-se que dessas 112 reações, apenas 42 são análises das amostras, sendo todas as outras, análises de controles do próprio desenho experimental do kit. Isso limitou o kit a analisar apenas 14 participantes do presente estudo, uma vez que cada um fez 3 coletas de material. A amostra alvo era de 120 participantes de ambos os sexos. Cada grupo teria um número de no máximo 30 indivíduos. Notou-se o alto grau de desistência e a dificuldade em se captar voluntários e portanto foi adquirido 1 kit na esperança de que esse cobriria quase o dobro dos 65 participantes que o estudo havia sido capaz de coletar.

Figura 4 - Site da Merck onde o KIT TRAPeZe XL é vendido

Fonte: Site de vendas da Merck (https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/TRAPeZe-XL-Telomerase-Detection-Kit,MM_NF-S7707?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F acessado em dezembro de 2019)

O Kit demorou 6 (seis) meses para chegar e veio faltando as células do controle positivo, pois o SKU comercializado no Brasil é apenas um refil e tais células precisam ser adquiridas separadamente. A equipe de vendas desconhece tal informação e caso as células sejam encomendadas após a chegada do kit elas não chegam antes da data de vencimento do mesmo. Isso causou um atraso de quase 1 mês para o cultivo de células HeLa aptas a serem usadas como controle positivo. Para a análise do material dos demais sujeitos foram trazidas células HeLa de outro laboratório da USP em Ribeirão Preto que pertenciam a outro Kit TRAPeZe adquirido por aquele laboratório.

O equipamento usado na primeira tentativa de leitura foi um espectrofotômetro que tinha o programa para ler sulforrodamina, mas que não funcionava quando solicitada tal leitura. Devido a esse problema com o equipamento, a primeira leitura foi perdida, desperdiçando assim metade do kit. Foi necessário encomendar outro kit que levou mais 6 (seis) meses para chegar. Nesse meio tempo o laboratório adquiriu o equipamento Varioskan Lux que de fato seria adequado para a análise de sulforrodamina. O kit restante somado ao kit que chegou permitiu a realização das 3 (três) baterias de testes apresentadas no presente trabalho (Seção 6.4).

7.6.2 – Atividade de telomerase: Os controles inativados pelo calor apresentados na Tabela 18 (Seção 6.4) não apresentaram atividade mensurável de telomerase, assim como a maioria das amostras. As duas implicações disso são que não é necessário comparar os valores expressados pelas amostras experimentais aos controles inativados pelo calor. A segunda implicação é que tal quantidade proporcionalmente

elevada de amostras sem expressão significativa na bateria 1 comparado com a proporção elevada de amostras retornando valores na bateria 3, pode indicar um erro de validade interna na primeira bateria de testes. Isso sugere que tal bateria de testes poderia ser refeita para garantir a qualidade dos resultados obtidos. A terceira bateria de testes, embora tenha tido resultados melhores do que a segunda bateria de testes, poderia ser refeita afim de buscar-se a redução da quantidade de amostras que tiveram de ser desconsideradas por apresentarem atividade de telomerase inferior ao controle inativado por calor (Tabela 19).

8. CONCLUSÕES

O presente estudo desenvolveu um protocolo sistematizado e completo que buscou analisar aspectos psicológicos e psicofisiológicos em voluntários submetidos à meditação e hipnose com base nos resultados aqui apresentados e discutidos (Seções 6.4, 7.1 e 7.2), não é possível afirmar que a meditação pode causar um impacto significativo na atividade da telomerase nas PBMCs. Ainda com base nesses mesmos resultados, também não é possível afirmar que a hipnose seja capaz de impactar a atividade de telomerase nas PBMCs.

As expectativas acerca da meditação também não puderam ser comprovadas como relevantes para os resultados anteriormente mostrados na literatura (SCHUTTE & MALOUFF, 2013; BLACK & SLAVICH, 2016), uma vez que nenhum dos tratamentos aqui aplicados retornou resultados significativos no que diz respeito a atividade da telomerase nas PBMCs. É recomendado que sejam feitos outros estudos posteriores para solidificar os resultados desse estudo, como a análise do comprimento do telômero das células ou a repetição da análise da atividade de telomerase das PBMCs.

Ainda que não tenham impactado no biomarcador utilizado pelo presente trabalho, as técnicas de tratamento aqui empregadas mostraram-se impactantes na sensação de bem-estar dos participantes e o presente estudo pôde causar diversas melhorias nas vidas de seus voluntários, como demonstrado nas Seções 6.5 e 6.6. Os tratamentos aqui desenvolvidos foram compartilhados publicamente com todos que mostraram interesse pelo estudo, podendo vir a beneficiar outras pessoas.

O estudo gerou ainda, adaptações do questionário de atitudes e crenças do CAPAFONS (2008) para a cultura brasileira, expandindo tal questionário, que antes era limitado à área da hipnose, para as áreas de meditação e relaxamento guiado, podendo tornar-se um instrumento útil para os pesquisadores dessas áreas no Brasil.

Tendo em vista que um dos grandes objetivos de um curso de doutorado é a formação de um pesquisador completo, capaz de trabalhar em equipe, elaborar questões complexas e empreender descobertas, esse trabalho foi de grande contribuição para a formação do presente aluno como pesquisador, visto que a realização do mesmo trouxe o aprendizado das rotinas de um laboratório de ponta, como o do Hospital Israelita Albert Einstein, tendo o presente aluno trabalhado inclusive em uma sala com Nível de Biossegurança 2 (NB-2), que é um padrão de

segurança extremamente rigoroso, no qual poucas pessoas da biomedicina têm a oportunidade de atuar. Ainda durante esse período, o presente aluno teve a oportunidade de trabalhar de perto com diversos profissionais altamente qualificados da Biomedicina e aprender a executar o protocolo TRAPeze XL que é de extrema complexidade e é um protocolo pouco explorado no Brasil, sendo esse, um grande diferencial do ponto de vista profissional, que certamente fará com que esse futuro doutor possa agregar muito à ciência do Brasil.

Dentro do mundo acadêmico, um doutor deve também ser capaz de guiar seus orientandos, oferecendo além de conhecimento técnico, a motivação para trilhar o caminho da ciência, de forma que seus alunos aprendam a ter autonomia e possam alcançar feitos superiores aos do próprio orientador. Nos quesitos acima citados os orientadores desse trabalho foram extremamente efetivos, pois esse trouxe uma formação de alta qualidade para o presente aluno, além de motivar na continuação pelo caminho da ciência, que embora desafiador, é capaz de trazer um conhecimento único e altamente relevante.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2015.552p.

American Psychological Association (APA). **Hypnosis**. Disponível em: <http://www.apa.org/topics/hypnosis/>. Acesso em 16 mai. 2016.

ANDREWS, B.. **Telomere Shortening Brick Analogy**. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=C0On_8Vn-BE. Acesso em 12 nov. 2019.

ANDREWS, N.P.; FUJII, H.; GORONZY, J.J.; WEYAND, C.M.. **Telomeres and immunological diseases of aging**. Gerontology, 56 (4), pp. 390-403, 2010.

ATTRACTION. Hipnose e DNA. Disponível em: <https://www.youtube.com/playlist?list=PLZI3NyMX3YITTwxjdPHCjoFWaz28GOIfG>. Acesso em 26 nov. 2020a.

ATTRACTION. Biokinesis. Disponível em: https://www.youtube.com/playlist?list=PLZI3NyMX3YIRAi8-VUh4Uce_tztRZC06e. Acesso em 26 nov. 2020b.

BORG, E. **On Perceived Exertion and its Measurement**. Department of Psychology, Stockholm University, 2007.

BLACK, D. S.; SLAVICH, G. M. **Mindfulness meditation and the immune system: a systematic review of randomized controlled trials**. New York. Annals of The New York Academy of Sciences. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde/SNVS. Portaria nº344 de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 31 de dez. de 1998.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU, Edusp, 1979.

CAPAFONS, A.; MENDOZA, M.E.; ESPEJO, B.; GREEN, J.P.; LOPES-PIRES, C.; SELMA, M.L.; FLORES, D.; MORARIU, M.; CRISTEA, I.; DAVID, D.; PESTANA, J. **Attitudes and beliefs about hypnosis: A multicultural study**. Valência: Contemporary Hypnosis. 2008.

CORBY, J.C.; et al. **Psychophysiological Correlates of the Practice of Tantric Yoga Meditation**. Stanford: Arch Gen Psychiatry. 1978. Vol. 35.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. **Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. São Paulo: Rev. Bras. Reumatol., 2010, vol.50, n.4, pp.434-447. ISSN 0482-5004.

DAUBENMIER, J.; LIN, J.; BLACKBURN, E.; HECHT, F.M.; KRISTELLER, J.; MANINGER, N.; KUWATA, M.; BACCHETTI, P.; HAVEL, P.J.; EPEL, E.; **Changes in stress, eating, and metabolic factors are related to changes in telomerase activity in a randomized mindfulness intervention pilot study**. San Francisco: Psychoneuroendocrinology. 2012 Jul;37(7):917-28.

DONATE, L. E.; BLASCO, M. A. **Telomeres in cancer and aging**. Philosophical Transactions of Royal Society B, 2011, 366, 76–84. DOI: 10.1098/rstb.2010.0291.

ELKINS, G. R.; BARABASZ, A. F.; COUNCIL, J. R.; SPIEGEL, D. **Advancing Research and Practice: The Revised APA Division 30 Definition of Hypnosis**. Waco: International Journal of Clinical and Experimental Hypnosis, 63:1, 1-9, 2015. DOI: 10.1080/00207144.2014.961870.

ELMAN, D.. Hypnotherapy. Glendale: Westwood Publishing Co., 1984. 336p.ISBN: 9780930298043

ESCOSTEGUY, C. C. **Tópicos Metodológicos e Estatísticos em Ensaios Clínicos Controlados Randomizados**. Rio de Janeiro: Arq. Bras. Card. volume 72, (nº 2), 1999.

FLICK, U. **Uma introdução à pesquisa qualitativa**. Porto Alegre: Bookman, 2ed. 2004.

HO, R. T.; CHAN, J. S.; WANG, C. W.; LAU, B. W.; SO, K. F.; YUEN, L. P.; SHAM, J. S.; CHAN, C. L. **A randomized controlled trial of qigong exercise on fatigue symptoms, functioning, and telomerase activity in persons with chronic fatigue or chronic fatigue syndrome**. Hong Kong: Annals of behavioral medicine: a publication of the Society of Behavioral Medicine, 44(2), 160–170. 2012. DOI: 10.1007/s12160-012-9381-6.

JACOBS, T. L., EPEL, E. S., LIN, J., BLACKBURN, E. H., WOLKOWITZ, O. M., BRIDWELL, D. A., ZANESCO, A. P., AICHELE, S. R., SAHDRA, B. K., MACLEAN, K. A., KING, B. G., SHAVER, P. R., ROSENBERG, E. L., FERRER, E., WALLACE, B. A., & SARON, C. D. **Intensive meditation training, immune cell telomerase activity, and psychological mediators.** Davis: Psychoneuroendocrinology, 36(5), 664–681. 2011.

JOO, S. L. **Vijñāna Bhairava: The Practice of Centring Awareness.** New Delhi: Indica, 2002. 197p.

LAVRETSKY, H.; EPEL, E. S.; SIDDARTH, P.; NAZARIAN, N.; CYR, N. S.; KHALSA, D. S.; LIN, J.; BLACKBURN, E.; IRWIN, M. R. **A pilot study of yogic meditation for family dementia caregivers with depressive symptoms: effects on mental health, cognition, and telomerase activity.** Los Angeles: International journal of geriatric psychiatry. 2013. pp. 57-65

LIN, J.; EPEL, E.; CHEON, J.; KROENKE, C.; SINCLAIR E.; BIGOS, M.; WOLKOWITZ, O.; MELLON S.; BLACKBURN, E. **Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: Insights for the epidemiology of telomere maintenance.** San Francisco: J Immunol Methods, 2010.

LUCE, R. D.; GALANTER, E. **Handbook of Mathematical Psychology.** University of Pennsylvania: Wiley, 1963.491p.

Relaxing Music for Deep Sleep. Delta Waves. Calm Background for Sleeping, - Meditation, Yoga". 2015. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=njHvGxZgTPk&t=63s>. Acesso em 10 out. 2019.

LUSH, P.; DIENES, Z.. **Time perception and the experience of agency in meditation and hypnosis.** PsyCh journal, 8(1), 36–50. <https://doi.org/10.1002/pchj.276>, 2019.

MENDER, I.; SHAY, J. W. **Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP).** Dallas: Bio-protocol. 2015. Vol 5, Iss 22.

OSPINA, M. B.; BOND, K.; KARKHANEH, M.; TJOSVOLD, L.; VANDERMEER, B.; LIANG, Y.; Bialy, L.; Hooton. N.; Buscemi, N.; Dryden, D.M.; Klassen, T.P. **Meditation practices for health: state of the research.** Evid Rep Technol Assess (Full Rep). 2007.155:1–263p.

PENG, C.-K., HENRY, I. C., MIETUS, J. E., HAUSDORFF, J. M. KHALSAA, G. BENSONB, H., GOLDBERGER, A. L. **Heart rate dynamics during three forms of meditation**. Boston: International Journal of Cardiology 95, 2004. 19 – 27p.

PINTAR, J.; LYNN, S. J. **Hypnosis: A brief history**. Chinchester: John Wiley & Sons, 2008. 240p. ISBN 1444305301.

RAZGONOVA, M.P.; ZAKHARENKO, A.M.; GOLOKHVAST, K.S.; THANASOULA, M.; SARANDI, E.; NIKOLOUZAKIS, K.; FRAGKIADAKI, P.; TSOUKALAS, D.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A.. **Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory**. Molecular Medicine Reports, 22, 1679-1694. 11274, 2020.

RUZYLA-SMITH, P.; BARABASZ, A.; BARABASZ, M.; WARNER, D. **Effects of Hypnosis on the Immune Response: B-Cells, T-Cells, Helper, and Suppressor Cells**. Gonzaga University: The Australian Journal of Clinical and Experimental Hypnosis, 1998.

SAPOLSKY, R. M. **Endocrinology of the stress-response**. In BECKER, J. B.; BREEDLOVE, S. M.; CREWS, MCCARTHY, M.M. **Behavioral Endocrinology**. 2 ed. MIT, 2002.

SCHUTTE, N. S.; MALOUFF, J. M. **A meta-analytic review of the effects of mindfulness meditation on telomerase activity**. Armidale: University of New England, 2013.

SHOR, R. E.; ORNE, E. C. **Harvard Group Scale of Hypnotic Susceptibility: Form A. Consulting Psychologists**. California: Press INC., 1962.

SKVORTSOV, D. A.; ZVEREVA, M. E.; SHPANCHENKO, O.V.; DONTSOVA, O. A. **Assays for Detection of Telomerase Activity**. Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 2011. ACTA NATURAE | VOL. 3 № 1 (8).

TA-Science. **Telomeres, Telomerase Activation and TA-65**. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=C0On_8Vn-BE. Acesso em 12 nov. 2019.

TEMPAKU, P. F.; MAZZOTTI, D. R.; TUFIK, S. **Telomere length as a marker of sleep loss and sleep disturbances: a potential link between sleep and cellular senescence**. São Paulo: Sleep Medicine, 2015. 559–563p

THOMAS, J. W.; COHEN, M. **A methodological review of meditation research.** Bundoora: Frontiers in Psychiatry, 2014.

VERHOECKX, K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; KLEIVELAND, C.; LEA, T.; MACKIE, A.; REQUENA, T.; SWIATECKA, D.; WICHERS, H. **The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.** Cham (CH): Springer; 2015.

VALENZUELA, H. F.; EFFROS, R. B. **Divergent Telomerase and CD28 Expression Patterns in Human CD4 and CD8 T Cells Following Repeated Encounters with the Same Antigenic Stimulus.** University of California: Clinical Immunology Vol. 105, No. 2, pp. 117–125, 2002.

WAHBEH, H.; ELSAS, S-M.; OKEN, B. S. **Mind-body interventions: Applications in neurology.** Portland: Neurology, 2008. 70(24): 2321–2328

10. APÊNDICE

Anexo 1 – TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Hipnose

Muito obrigado pelo seu interesse em participar desse ensaio clínico sobre “Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade de telomerase dos leucócitos”. Este trabalho está vinculado ao Departamento de Psicologia Experimental da USP e é produzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo F. Costa.

Antes de tomar sua decisão quanto a participar do presente estudo, é importante que você entenda os objetivos desta pesquisa e os seus procedimentos e etapas. Por favor, reserve algum tempo para ler as seguintes informações atentamente e sinta-se à vontade para me contatar se quiser mais informações ou se tiver alguma dúvida. Gostaríamos de enfatizar que você não é obrigado(a) a aceitar este convite e deve participar apenas se desejar.

O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob a numeração CAAE: 73462317.0.0000.5561.

a) Qual o propósito do estudo?

Um dos principais objetivos desta pesquisa é avaliar a influência da hipnose sobre o sistema imune das pessoas, podendo nos possibilitar o estabelecimento de futuras relações entre hipnose e saúde, levando a novas possibilidades de tratamentos clínicos. Este experimento é uma das principais etapas do estudo conduzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, orientado pelo Professor Dr. Marcelo Costa e supervisionado pelos psicólogos André Renato Rizzi (CRP 06/131868) e Professor Dr. Wellington Zangari.

b) Qual o seu papel no estudo?

Você tem um papel fundamental para um estudo que pode trazer grandes benefícios à saúde da população. Esse estudo é possível graças à participação voluntária de pessoas como você.

c) Quais são suas obrigações no estudo?

A sua participação é voluntária. Sinta-se livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem a necessidade de se explicar e sem qualquer forma de repressão. Só lhe pedimos para que seja sincero em seus relatos ao longo do estudo e siga as instruções que lhe serão passadas ao longo do estudo. Pedimos a gentileza de não revelar nenhum aspecto dessa pesquisa para ninguém até o momento de sua publicação.

d) Quais os procedimentos pelos quais você irá passar?

Uma vez lido e aceito o termo de consentimento, você irá passar por uma coleta de sangue para medirmos como está o seu sistema imune. Tal coleta será realizada com material descartável e o processo é seguro, sendo conduzido por um profissional habilitado. Ao longo de todo o estudo lhe serão aplicados alguns questionários para entender melhor o seu perfil e estado emocional. Você irá passar por mais duas coletas de sangue, similares à primeira, ao longo de quatro meses.

Pelos próximos quatro meses você será exposto a sessões diárias de hipnose. Cada sessão tem a duração de 30 (trinta) minutos. Hipnose é uma técnica terapêutica na qual, clínicos aplicam sugestões a indivíduos e tais sugestões podem provocar mudanças na mente (psicológicas) provocando, conseqüentemente, mudanças no corpo (fisiológicas). Tais mudanças podem ser superficiais, como estimular a imaginação ou provocar relaxamento, ou mais profundas como a anestesia e a melhora na saúde.

Ocorrerão também sessões presenciais para troca de experiências, mas você será exposto(a) a técnica diariamente através de um áudio que lhe será fornecido no início do estudo, o qual você deverá escutar uma vez por dia. É importante que não comente sobre a técnica empregada com qualquer pessoa que não esteja no mesmo grupo que você para não prejudicar os resultados da pesquisa. Na primeira sessão você receberá instruções sobre como aplicar a técnica em você mesmo(a) quando estiver em sua casa e lhe será solicitado que aplique a técnica uma vez por dia em um lugar tranquilo e livre de interrupções. Você não terá que memorizar a técnica, pois trata-se de um processo guiado pelo terapeuta. Ao final do estudo todos os participantes terão acesso ao treinamento para aplicar todos tipos de tratamento utilizados por esse estudo, para

que possam aplicar em si mesmos em casa e receberão os áudios para que possam se beneficiar das práticas mesmo após o término do estudo.

e) O que acontecerá com os dados?

Todas as suas respostas serão armazenadas de forma anônima (conforme número de participação), eletrônica e segura. Ainda que venha a ocorrer análise individual dos dados, essa jamais será ligada ao seu nome. O mesmo é válido para as amostras de sangue, que ficarão congeladas e identificadas apenas pelo código e servirão apenas à propósitos científicos sem qualquer ligação pessoal com o seu doador. Os resultados da pesquisa serão publicados sem qualquer menção a identidade de qualquer participante da pesquisa. Caso deseje, você poderá obter os resultados da pesquisa, quando essa estiver completa.

f) Há algum risco em participar?

Não há riscos conhecidos para os procedimentos propostos nesse estudo em sujeitos em boas condições de saúde, que não façam uso de medicamentos que afetem o sistema nervoso central. Se você precisar fazer uso de tais medicamentos enquanto estiver participando do estudo, comunique imediatamente o pesquisador responsável. Se você sentir algum desconforto ou incômodo gerados por qualquer procedimento, comunique imediatamente a qualquer um dos responsáveis pela pesquisa e sinta-se à vontade para interromper a sessão a qualquer momento. Pode ocorrer eventuais riscos de dor e/ou equimose decorrente da punção venosa.

g) Em média, quanto tempo esta pesquisa durará?

A pesquisa tem duração de quatro meses sendo que cada sessão diária dura em torno de 30 minutos. Acontecerá quinzenalmente uma sessão presencial com a aplicação de um questionário de avaliação emocional antes e depois da sessão e grupos de discussão dos resultados após algumas sessões chave. As demais sessões serão em casa com o uso de uma gravação que tem a duração de 30 minutos.

Considerações finais

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução do CNS no466/2012, item IV.3 e você receberá uma via do mesmo antes de ingressar no experimento.

Por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato por e-mail:

Mestre Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

E-mail: andersoncorrea@usp.br Telefone: (11) 971870026

Endereço institucional: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bloco F, 1º andar, sala 35 - CEP 05508-030 – Cidade Universitária – São Paulo/SP.

Esclarecimentos éticos: Comitê de ética em pesquisa com seres humanos do IPUSP - ceph.ip@usp.br Telefone/fax: (11) 3091-4182

Sua participação será iniciada assim que aceitar o Termo de Consentimento:

Confirmando que li e entendi a Folha de Informações do estudo acima referido. Entendo que minha participação é voluntária não sendo, portanto, remunerada e que estou livre para abandonar a pesquisa ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar dar qualquer razão e sem ter meus direitos afetados. Os eventuais benefícios obtidos através da participação nesse estudo não demandarão nenhum pagamento em troca. Eu concordo em deixar meus dados serem usados para os propósitos mencionados acima. Ao assinar confirmo estar ciente e de acordo com todas as informações acima apresentadas e confirmo estar assinando esse termo de livre e espontânea vontade.

Declaro não fazer uso de antidepressivos ou medicamentos psicoativos de uso controlado (tarja preta) Sim () Não ()

Declaro que não participarei de outros grupos de meditação, nem passar por relaxamento guiado ou hipnose sem o conhecimento do responsável por esse estudo
Sim () Não ()

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

Participante:

Relaxamento e Meditação

Em ambos os grupos de relaxamento e de meditação será aplicado o mesmo TCLE, com a única diferença de que haverá a menção da técnica empregada como sendo relaxamento ou meditação. Segue abaixo o TCLE de relaxamento:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Relaxamento

Muito obrigado pelo seu interesse em participar desse ensaio clínico sobre “Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade de telomerase dos leucócitos”. Este trabalho está vinculado ao Departamento de Psicologia Experimental da USP e é produzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo F. Costa.

Antes de tomar sua decisão quanto a participar do presente estudo, é importante que você entenda os objetivos desta pesquisa e os seus procedimentos e etapas. Por favor, reserve algum tempo para ler as seguintes informações atentamente e sinta-se à vontade para me contatar se quiser mais informações ou se tiver alguma dúvida. Gostaríamos de enfatizar que você não é obrigado(a) a aceitar este convite e deve participar apenas se desejar.

O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob a numeração CAAE: 73462317.0.0000.5561.

a) Qual o propósito do estudo?

Um dos principais objetivos desta pesquisa é avaliar a influência de técnicas de relaxamento sobre o sistema imune das pessoas, podendo nos possibilitar o estabelecimento de futuras relações entre relaxamento e saúde, possibilitando a criação de novos tratamentos clínicos. Este experimento é uma das principais etapas do estudo conduzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, orientado pelo Professor Dr. Marcelo Costa e supervisionado pelos psicólogos André Renato Rizzi (CRP 06/131868) e Professor Dr. Wellington Zangari.

b) Qual o seu papel no estudo?

Você tem um papel fundamental para um estudo que pode trazer grandes benefícios à saúde da população. Esse estudo é possível graças à participação voluntária de pessoas como você.

c) Quais são suas obrigações no estudo?

A sua participação é voluntária. Sinta-se livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem a necessidade de se explicar e sem qualquer forma de repressão. Só lhe pedimos para que seja sincero em seus relatos ao longo do estudo e siga as instruções que lhe serão passadas ao longo do estudo. Pedimos a gentileza de não revelar nenhum aspecto dessa pesquisa para ninguém até o momento de sua publicação.

d) Quais os procedimentos pelos quais você irá passar?

Uma vez lido e aceito o termo de consentimento, você irá passar por uma coleta de sangue para medirmos como está o seu sistema imune. Tal coleta será realizada com material descartável e o processo é seguro, sendo conduzido por um profissional habilitado. Ao longo de todo o estudo lhe serão aplicados alguns questionários para entender melhor o seu perfil e estado emocional. Você irá passar por mais duas coletas de sangue, similares à primeira, ao longo de quatro meses.

Pelos próximos quatro meses você será exposto a sessões diárias de relaxamento. Cada sessão tem a duração de 30 (trinta) minutos.

Ocorrerão também sessões presenciais para troca de experiências, mas você será exposto(a) a técnica diariamente através de um áudio que lhe será fornecido no início do estudo, o qual você deverá escutar uma vez por dia. É importante que não comente sobre a técnica empregada com qualquer pessoa que não esteja no mesmo grupo que você para não prejudicar os resultados da pesquisa. Na primeira sessão você receberá instruções sobre como aplicar a técnica em você mesmo(a) quando estiver em sua casa e lhe será solicitado que aplique a técnica uma vez por dia em um lugar tranquilo e livre de interrupções. Você não terá que memorizar a técnica, pois trata-se de um processo guiado pelo terapeuta. Ao final do estudo todos os participantes terão acesso ao treinamento para aplicar todos tipos de tratamento utilizados por esse estudo, para

que possam aplicar em si mesmos em casa e receberão os áudios para que possam se beneficiar das práticas mesmo após o término do estudo.

e) O que acontecerá com os dados?

Todas as suas respostas serão armazenadas de forma anônima (conforme número de participação), eletrônica e segura. Ainda que venha a ocorrer análise individual dos dados, essa jamais será ligada ao seu nome. O mesmo é válido para as amostras de sangue, que ficarão congeladas e identificadas apenas pelo código e servirão apenas à propósitos científicos sem qualquer ligação pessoal com o seu doador. Os resultados da pesquisa serão publicados sem qualquer menção a identidade de qualquer participante da pesquisa. Caso deseje, você poderá obter os resultados da pesquisa, quando essa estiver completa.

f) Há algum risco em participar?

Não há riscos conhecidos para os procedimentos propostos nesse estudo em sujeitos em boas condições de saúde, que não façam uso de medicamentos que afetem o sistema nervoso central. Se você precisar fazer uso de tais medicamentos enquanto estiver participando do estudo, comunique imediatamente o pesquisador responsável. Se você sentir algum desconforto ou incômodo gerados por qualquer procedimento, comunique imediatamente a qualquer um dos responsáveis pela pesquisa e sinta-se à vontade para interromper a sessão a qualquer momento. Pode ocorrer eventuais riscos de dor e/ou equimose decorrente da punção venosa.

g) Em média, quanto tempo esta pesquisa durará?

A pesquisa tem duração de quatro meses sendo que cada sessão diária dura em torno de 30 minutos. Acontecerá quinzenalmente uma sessão presencial com a aplicação de um questionário de avaliação emocional antes e depois da sessão e grupos de discussão dos resultados após algumas sessões chave. As demais sessões serão em casa com o uso de uma gravação que tem a duração de 30 minutos.

Considerações finais

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução do CNS no466/2012, item IV.3 e você receberá uma via do mesmo antes de ingressar no experimento.

Por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato por e-mail:

Mestre Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

E-mail: andersoncorrea@usp.br Telefone: (11) 971870026

Endereço institucional: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bloco F, 1º andar, sala 35 - CEP 05508-030 – Cidade Universitária – São Paulo/SP.

Esclarecimentos éticos: Comitê de ética em pesquisa com seres humanos do IPUSP - cepi.ip@usp.br Telefone/fax: (11) 3091-4182

Sua participação será iniciada assim que aceitar o Termo de Consentimento:

Confirmando que li e entendi a Folha de Informações do estudo acima referido. Entendo que minha participação é voluntária não sendo, portanto, remunerada e que estou livre para abandonar a pesquisa ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar dar qualquer razão e sem ter meus direitos afetados. Os eventuais benefícios obtidos através da participação nesse estudo não demandarão nenhum pagamento em troca. Eu concordo em deixar meus dados serem usados para os propósitos mencionados acima. Ao assinar confirmo estar ciente e de acordo com todas as informações acima apresentadas e confirmo estar assinando esse termo de livre e espontânea vontade.

Declaro não fazer uso de antidepressivos ou medicamentos psicoativos de uso controlado (tarja preta) Sim () Não ()

Declaro que não participarei de outros grupos de meditação, nem passar por relaxamento guiado ou hipnose sem o conhecimento do responsável por esse estudo
Sim () Não ()

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

Participante:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Meditação

Muito obrigado pelo seu interesse em participar desse ensaio clínico sobre “Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade de telomerase dos leucócitos”. Este trabalho está vinculado ao Departamento de Psicologia Experimental da USP e é produzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo F. Costa.

Antes de tomar sua decisão quanto a participar do presente estudo, é importante que você entenda os objetivos desta pesquisa e os seus procedimentos e etapas. Por favor, reserve algum tempo para ler as seguintes informações atentamente e sinta-se à vontade para me contatar se quiser mais informações ou se tiver alguma dúvida. Gostaríamos de enfatizar que você não é obrigado(a) a aceitar este convite e deve participar apenas se desejar.

O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob a numeração CAAE: 73462317.0.0000.5561.

a) Qual o propósito do estudo?

Um dos principais objetivos desta pesquisa é avaliar a influência da meditação sobre o sistema imune das pessoas, podendo nos possibilitar o estabelecimento de futuras relações entre meditação e saúde, aumentando o escopo dos tratamentos clínicos. Este experimento é uma das principais etapas do estudo conduzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, orientado pelo Professor Dr. Marcelo Costa e supervisionado pelos psicólogos André Renato Rizzi (CRP 06/131868) e Professor Dr. Wellington Zangari.

b) Qual o seu papel no estudo?

Você tem um papel fundamental para um estudo que pode trazer grandes benefícios à saúde da população. Esse estudo é possível graças à participação voluntária de pessoas como você.

c) Quais são suas obrigações no estudo?

A sua participação é voluntária. Sinta-se livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem a necessidade de se explicar e sem qualquer forma de repressão. Só lhe pedimos para que seja sincero em seus relatos ao longo do estudo e siga as instruções que lhe serão passadas ao longo do estudo. Pedimos a gentileza de não revelar nenhum aspecto dessa pesquisa para ninguém até o momento de sua publicação.

d) Quais os procedimentos pelos quais você irá passar?

Uma vez lido e aceito o termo de consentimento, você irá passar por uma coleta de sangue para medirmos como está o seu sistema imune. Tal coleta será realizada com material descartável e o processo é seguro, sendo conduzido por um profissional habilitado. Ao longo de todo o estudo lhe serão aplicados alguns questionários para entender melhor o seu perfil e estado emocional. Você irá passar por mais duas coletas de sangue, similares à primeira, ao longo de quatro meses.

Pelos próximos quatro meses você será exposto a sessões diárias de meditação. Cada sessão tem a duração de 30 (trinta) minutos. Meditação é uma prática milenar oriental altamente difundida no ocidente pelos seus fins terapêuticos. A meditação pode provocar mudanças na mente (psicológicas) provocando, consequentemente, mudanças no corpo (fisiológicas). Tais mudanças podem ser superficiais, como estimular a imaginação ou provocar relaxamento, ou mais profundas como a redução do envelhecimento e outras melhorias de longo prazo.

Ocorrerão também sessões presenciais para troca de experiências, mas você será exposto(a) a técnica diariamente através de um áudio que lhe será fornecido no início do estudo, o qual você deverá escutar uma vez por dia. É importante que não comente sobre a técnica empregada com qualquer pessoa que não esteja no mesmo grupo que você para não prejudicar os resultados da pesquisa. Na primeira sessão você receberá instruções sobre como aplicar a técnica em você mesmo(a) quando estiver em sua casa e lhe será solicitado que aplique a técnica uma vez por dia em um lugar tranquilo e livre de interrupções. Você não terá que memorizar a técnica, pois trata-se de um processo guiado pelo terapeuta. Ao final do estudo todos os participantes terão acesso ao treinamento para aplicar todos tipos de tratamento utilizados por esse estudo, para que possam aplicar em si mesmos em casa e receberão os áudios para que possam se beneficiar das práticas mesmo após o término do estudo.

e) O que acontecerá com os dados?

Todas as suas respostas serão armazenadas de forma anônima (conforme número de participação), eletrônica e segura. Ainda que venha a ocorrer análise individual dos dados, essa jamais será ligada ao seu nome. O mesmo é válido para as amostras de sangue, que ficarão congeladas e identificadas apenas pelo código e servirão apenas à propósitos científicos sem qualquer ligação pessoal com o seu doador. Os resultados da pesquisa serão publicados sem qualquer menção a identidade de qualquer participante da pesquisa. Caso deseje, você poderá obter os resultados da pesquisa, quando essa estiver completa.

f) Há algum risco em participar?

Não há riscos conhecidos para os procedimentos propostos nesse estudo em sujeitos em boas condições de saúde, que não façam uso de medicamentos que afetem o sistema nervoso central. Se você precisar fazer uso de tais medicamentos enquanto estiver participando do estudo, comunique imediatamente o pesquisador responsável. Se você sentir algum desconforto ou incômodo gerados por qualquer procedimento, comunique imediatamente a qualquer um dos responsáveis pela pesquisa e sinta-se à vontade para interromper a sessão a qualquer momento. Pode ocorrer eventuais riscos de dor e/ou equimose decorrente da punção venosa.

g) Em média, quanto tempo esta pesquisa durará?

A pesquisa tem duração de quatro meses sendo que cada sessão diária dura em torno de 30 minutos. Acontecerá quinzenalmente uma sessão presencial com a aplicação de um questionário de avaliação emocional antes e depois da sessão e grupos de discussão dos resultados após algumas sessões chave. As demais sessões serão em casa com o uso de uma gravação que tem a duração de 30 minutos.

Considerações finais

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução do CNS no466/2012, item IV.3 e você receberá uma via do mesmo antes de ingressar no experimento.

Por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato por e-mail:

Mestre Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

E-mail: andersoncorrea@usp.br Telefone: (11) 971870026

Endereço institucional: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bloco F, 1º andar, sala 35 - CEP 05508-030 – Cidade Universitária – São Paulo/SP.

Esclarecimentos éticos: Comitê de ética em pesquisa com seres humanos do IPUSP - ceph.ip@usp.br Telefone/fax: (11) 3091-4182

Sua participação será iniciada assim que aceitar o Termo de Consentimento:

Confirmando que li e entendi a Folha de Informações do estudo acima referido. Entendo que minha participação é voluntária não sendo, portanto, remunerada e que estou livre para abandonar a pesquisa ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar dar qualquer razão e sem ter meus direitos afetados. Os eventuais benefícios obtidos através da participação nesse estudo não demandarão nenhum pagamento em troca. Eu concordo em deixar meus dados serem usados para os propósitos mencionados acima. Ao assinar confirmo estar ciente e de acordo com todas as informações acima apresentadas e confirmo estar assinando esse termo de livre e espontânea vontade.

Declaro não fazer uso de antidepressivos ou medicamentos psicoativos de uso controlado (tarja preta) Sim () Não ()

Declaro que não participarei de outros grupos de meditação, nem passar por relaxamento guiado ou hipnose sem o conhecimento do responsável por esse estudo Sim () Não ()

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

Participante:

Grupo Controle

As pessoas desse grupo participarão apenas preenchendo questionários e da venipuntura. Ao final do estudo os participantes desse grupo receberão instruções e os áudios para que possam obter os benefícios apontados por esse estudo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Muito obrigado pelo seu interesse em participar desse ensaio clínico sobre “Efeitos da meditação e da sugestão hipnótica na atividade de telomerase dos leucócitos”. Este trabalho está vinculado ao Departamento de Psicologia Experimental da USP e é produzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo F. Costa.

Antes de tomar sua decisão quanto a participar do presente estudo, é importante que você entenda os objetivos desta pesquisa e os seus procedimentos e etapas. Por favor, reserve algum tempo para ler as seguintes informações atentamente e sinta-se à vontade para me contatar se quiser mais informações ou se tiver alguma dúvida. Gostaríamos de enfatizar que você não é obrigado(a) a aceitar este convite e deve participar apenas se desejar.

O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob a numeração CAAE: 73462317.0.0000.5561.

a) Qual o propósito do estudo?

Um dos principais objetivos desta pesquisa é avaliar a influência da meditação e hipnose sobre o sistema imune das pessoas, podendo nos possibilitar o estabelecimento de futuras relações entre meditação, hipnose e saúde, aumentando o escopo dos tratamentos clínicos. Este experimento é uma das principais etapas do estudo conduzido pelo aluno de Doutorado Anderson Josué Corrêa de Paula Santos, orientado pelo Professor Dr. Marcelo Costa e supervisionado pelos psicólogos André Renato Rizzi (CRP 06/131868) e Professor Dr. Wellington Zangari.

b) Qual o seu papel no estudo?

Você tem um papel fundamental para um estudo que pode trazer grandes benefícios à saúde da população. Esse estudo é possível graças à participação voluntária de pessoas como você.

c) Quais são suas obrigações no estudo?

A sua participação é voluntária. Sinta-se livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem a necessidade de se explicar e sem qualquer forma de repressão. Só lhe pedimos para que seja sincero em seus relatos ao longo do estudo e siga as instruções que lhe serão passadas ao longo do estudo. Pedimos a gentileza de não revelar nenhum aspecto dessa pesquisa para ninguém até o momento de sua publicação.

d) Quais os procedimentos pelos quais você irá passar?

Uma vez lido e aceito o termo de consentimento, você irá passar por uma coleta de sangue para medirmos como está o seu sistema imune. Tal coleta será realizada com material descartável e o processo é seguro, sendo conduzido por um profissional habilitado. Ao longo de todo o estudo lhe serão aplicados alguns questionários para entender melhor o seu perfil e estado emocional. Você irá passar por mais duas coletas de sangue, similares à primeira, ao longo de quatro meses. Irá também ouvir a uma música específica diariamente.

Ao final do estudo todos os participantes terão acesso ao treinamento para aplicar todos tipos de tratamento utilizados por esse estudo em si mesmos em casa e receberão os áudios para que possam se beneficiar das práticas mesmo após o término do estudo.

e) O que acontecerá com os dados?

Todas as suas respostas serão armazenadas de forma anônima (conforme número de participação), eletrônica e segura. Ainda que venha a ocorrer análise individual dos dados, essa jamais será ligada ao seu nome. O mesmo é válido para as amostras de sangue, que ficarão congeladas e identificadas apenas pelo código e servirão apenas à propósitos científicos sem qualquer ligação pessoal com o seu doador. Os resultados

da pesquisa serão publicados sem qualquer menção a identidade de qualquer participante da pesquisa. Caso deseje, você poderá obter os resultados da pesquisa, quando essa estiver completa.

f) Há algum risco em participar?

Não há riscos conhecidos para os procedimentos propostos nesse estudo em sujeitos em boas condições de saúde, que não façam uso de medicamentos que afetem o sistema nervoso central. Se você precisar fazer uso de tais medicamentos enquanto estiver participando do estudo, comunique imediatamente o pesquisador responsável. Se você sentir algum desconforto ou incômodo gerados por qualquer procedimento, comunique imediatamente a qualquer um dos responsáveis pela pesquisa e sinta-se à vontade para interromper a sessão a qualquer momento. Pode ocorrer eventuais riscos de dor e/ou equimose decorrente da punção venosa.

g) Em média, quanto tempo esta pesquisa durará?

A pesquisa tem duração de quatro meses sendo que cada sessão diária dura em torno de 30 minutos. Acontecerá quinzenalmente uma sessão presencial com a aplicação de um questionário de avaliação emocional antes e depois da sessão e grupos de discussão dos resultados após algumas sessões chave. As demais sessões serão em casa com o uso de uma gravação que tem a duração de 30 minutos.

Considerações finais

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução do CNS no466/2012, item IV.3 e você receberá uma via do mesmo antes de ingressar no experimento.

Por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato por e-mail:

Mestre Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

E-mail: andersoncorrea@usp.br Telefone: (11) 971870026

Endereço institucional: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bloco F, 1º andar, sala 35 - CEP 05508-030 – Cidade Universitária – São Paulo/SP.

Esclarecimentos éticos: Comitê de ética em pesquisa com seres humanos do IPUSP - ceph.ip@usp.br Telefone/fax: (11) 3091-4182

Sua participação será iniciada assim que aceitar o Termo de Consentimento:

Confirmando que li e entendi a Folha de Informações do estudo acima referido. Entendo que minha participação é voluntária não sendo, portanto, remunerada e que estou livre para abandonar a pesquisa ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar dar qualquer razão e sem ter meus direitos afetados. Os eventuais benefícios obtidos através da participação nesse estudo não demandarão nenhum pagamento em troca. Eu concordo em deixar meus dados serem usados para os propósitos mencionados acima. Ao assinar confirmo estar ciente e de acordo com todas as informações acima apresentadas e confirmo estar assinando esse termo de livre e espontânea vontade.

Declaro não fazer uso de antidepressivos ou medicamentos psicoativos de uso controlado (tarja preta) Sim () Não ()

Declaro que não participarei de outros grupos de meditação, nem passar por relaxamento guiado ou hipnose sem o conhecimento do responsável por esse estudo Sim () Não ()

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

Participante:

Adaptações

Antes de as perguntas-filtro serem incluídas no TCLE, essa era a última página de todos os TCLE:

Considerações finais

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução do CNS no466/2012, item IV.3 e você receberá uma via do mesmo antes de ingressar no experimento.

Por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato por e-mail:

Mestre Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

E-mail: andersoncorrea@usp.br Telefone: (11) 971870026

Endereço institucional: Av. Prof. Mello Moraes, 1721 - Bloco F, 1º andar, sala 35 - CEP 05508-030 – Cidade Universitária – São Paulo/SP.

Esclarecimentos éticos: Comitê de ética em pesquisa com seres humanos do IPUSP - ceph.ip@usp.br Telefone/fax: (11) 3091-4182

Sua participação será iniciada assim que aceitar o Termo de Consentimento abaixo: Confirmando que li e entendi a Folha de Informações do estudo acima referido. Entendo que minha participação é voluntária não sendo, portanto, remunerada e que estou livre para abandonar a pesquisa ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar dar qualquer razão e sem ter meus direitos afetados. Os eventuais benefícios obtidos através da participação nesse estudo não demandarão nenhum pagamento em troca. Eu concordo em deixar meus dados serem usados para os propósitos mencionados acima. Ao assinar confirmo estar ciente e de acordo com todas as informações acima apresentadas e confirmo estar assinando esse termo de livre e espontânea vontade.

Anderson Josué Corrêa de Paula Santos

Participante:

Anexo 2 - Avaliação das expectativas acerca da técnica

No início do estudo e após os 4 meses de tratamento, será aplicado um questionário para entender as expectativas dos participantes acerca da técnica com a qual o sujeito está sendo tratado nesse estudo. Tal questionário advém de um estudo desenhado para compreender atitudes frente à hipnose (CAPAFONS, 2008) e foi adaptado para medir as expectativas em relação a técnicas de meditação e relaxamento, além ter sofrido adaptações no português para se ajustar ao português falado no Brasil. O questionário original, além de possuir uma anamnese, contém um questionário de perfil cujas perguntas serão retiradas dessa Seção e, se relevantes, serão incluídas no questionário de perfil. Seguem abaixo os questionários já separados e adaptados para cada tratamento.

Hipnose

Tradução para o português (BRA) da versão inglesa da escala de valência de atitudes e crenças frente a hipnose – Versão Cliente 1 – VSABH-C (2007)

A seguir, você encontrará algumas questões que nos ajudarão a conhecer a sua opinião sobre a hipnose. Você não precisa ter passado pelas experiências que são apresentadas nas perguntas, apenas que indique o que considera que poderia ocorrer em tais situações. Por favor, indique o seu grau de concordância com as afirmações apresentadas a seguir, fazendo um círculo no número que melhor reflete a sua opinião, de acordo com a escala de resposta que se apresenta.

LEMBRE-SE DE QUE NÃO HÁ RESPOSTAS CERTAS OU ERRADAS. ESTAMOS APENAS TENTANDO CONHECER A SUA OPINIÃO.

1	2	3	4	5	6
Discordo totalmente	Discordo bastante	Discordo	Concordo	Concordo bastante	Concordo totalmente

1. A hipnose pode ser de grande ajuda para os outros 1 2 3 4 5 6
2. A hipnose implica um esforço de cooperação entre hipnotista e paciente..... 1 2 3 4 5 6
3. O paciente necessita estar em transe hipnótico para conseguir obter benefícios da intervenção..... 1 2 3 4 5 6
4. A hipnose me assusta 1 2 3 4 5 6
5. Sob hipnose os resultados podem ser alcançados sem que haja nenhum esforço por parte do hipnotizado 1 2 3 4 5 6
6. A hipnose pode ser usada como uma solução mágica para resolver problemas 1 2 3 4 5 6
7. Creio que sob hipnose a pessoa é como um robô à mercê do hipnotizador 1 2 3 4 5 6
8. A hipnose requer esforço por parte da pessoa hipnotizada ... 1 2 3 4 5 6
9. A hipnose é, por si, todo o necessário para tratar a maioria dos problemas 1 2 3 4 5 6

10. A hipnose pode ser de grande ajuda para melhorar os efeitos dos tratamentos a que se associe 1 2 3 4 5 6
11. A pessoa quando hipnotizada é passiva 1 2 3 4 5 6
12. A hipnose é um complemento ou ferramenta para melhorar as psicoterapias 1 2 3 4 5 6
13. Para hipnotizar alguém é necessária a colaboração dessa pessoa 1 2 3 4 5 6
14. A pessoa hipnotizada pode “sair” da hipnose quando o desejar 1 2 3 4 5 6
15. Sob efeito da hipnose, a pessoa conserva a sua autonomia para fazer o que quiser 1 2 3 4 5 6
16. A hipnose é uma técnica segura, com poucos riscos 1 2 3 4 5 6
17. A hipnose melhora a capacidade de autocontrole 1 2 3 4 5 6
18. Tenho medo de ficar "preso" num transe hipnótico 1 2 3 4 5 6
19. Creio que sob hipnose, se pode chegar a perder o controle ... 1 2 3 4 5 6
20. A hipnose é, por si só, perigosa 1 2 3 4 5 6
21. Tudo o que ocorre sob hipnose é provocado pelo paciente 1 2 3 4 5 6
22. Sob hipnose pode-se obrigar uma pessoa a fazer coisas que ela não deseja 1 2 3 4 5 6
23. A hipnose facilita o sucesso terapêutico 1 2 3 4 5 6
24. Se a pessoa não concordar com uma sugestão, ela pode ignorá-la completamente..... 1 2 3 4 5 6
25. A pessoa hipnotizada mantém o controle sobre si mesma ... 1 2 3 4 5 6
26. Eu gostaria de ser hipnotizado 1 2 3 4 5 6
27. Se surgisse a oportunidade, eu me deixaria ser hipnotizado . 1 2 3 4 5 6
28. Eu gostaria de ser muito hipnotizável 1 2 3 4 5 6
29. Aprende-se mais depressa sob hipnose 1 2 3 4 5 6
30. O que é lembrado sob efeito da hipnose é sempre verdade ... 1 2 3 4 5 6
31. É impossível mentir sob hipnose, mesmo que a pessoa hipnotizada o queira..... 1 2 3 4 5 6
32. Uma forma de confirmar que um evento ocorreu é a pessoa recordando isso sob hipnose 1 2 3 4 5 6
33. A hipnose envolve um estado de transe 1 2 3 4 5 6

34. A hipnose não é investigada pela ciência 1 2 3 4 5 6
35. Em geral, algumas das características fundamentais das
pessoas muito hipnotizáveis são: ingenuidade, ignorância e
dependência psicológica 1 2 3 4 5 6
36. A pessoa hipnotizada encontra-se fora de si 1 2 3 4 5 6
37. A hipnose é um complemento ou ferramenta para ajudar
às terapias médicas 1 2 3 4 5 6

POR FAVOR, CERTIFIQUE-SE DE TER RESPONDIDO TODAS AS QUESTÕES.

Disponível em <https://goo.gl/forms/xWIMoY9HIffF2XGy2> (acessado em 10 de julho de 2017)

Meditação guiada

Adaptação para o português (BRA) da versão inglesa da escala de valência de atitudes e crenças frente a hipnose – Versão Cliente 1 – VSABH-C (2007)

A seguir, você encontrará algumas questões que nos ajudarão a conhecer a sua opinião sobre a meditação guiada. Você não precisa ter passado pelas experiências que são apresentadas nas perguntas, apenas que indique o que considera que poderia ocorrer em tais situações. Por favor, indique o seu grau de concordância com as afirmações apresentadas a seguir, fazendo um círculo no número que melhor reflete a sua opinião, de acordo com a escala de resposta que se apresenta.

LEMBRE-SE QUE NÃO HÁ RESPOSTAS CERTAS OU ERRADAS. ESTAMOS APENAS TENTANDO CONHECER A SUA OPINIÃO.

1	2	3	4	5	6
Discordo totalmente	Discordo bastante	Discordo	Concordo	Concordo bastante	Concordo totalmente

1. A meditação pode ser de grande ajuda para os outros 1 2 3 4 5 6
2. A meditação guiada implica um esforço de cooperação entre quem guia e quem é guiado 1 2 3 4 5 6
3. O paciente necessita estar em transe para conseguir obter benefícios da intervenção 1 2 3 4 5 6
4. A meditação me assusta 1 2 3 4 5 6
5. Em uma meditação guiada os resultados podem ser alcançados sem que haja nenhum esforço por parte de quem medita 1 2 3 4 5 6
6. A meditação guiada pode ser usada como uma solução mágica para resolver problemas 1 2 3 4 5 6
7. Creio que em uma meditação guiada a pessoa é como um robô à mercê de quem a guia 1 2 3 4 5 6
8. A meditação guiada requer esforço por parte de quem medita... 1 2 3 4 5 6
9. A meditação guiada é, por si, todo o necessário para tratar a

- maioria dos problemas 1 2 3 4 5 6
10. A meditação guiada pode ser de grande ajuda para melhorar os efeitos dos tratamentos a que se associe 1 2 3 4 5 6
11. A pessoa é passiva quando está sendo guiada em uma meditação 1 2 3 4 5 6
12. A meditação guiada é um complemento ou ferramenta para melhorar as psicoterapias 1 2 3 4 5 6
13. Para guiar alguém ao estado meditativo, é necessária a colaboração dessa pessoa 1 2 3 4 5 6
14. A pessoa quando medita pode "sair" do estado meditativo quando desejar 1 2 3 4 5 6
15. Durante a meditação guiada, a pessoa conserva a sua autonomia para fazer o que quiser 1 2 3 4 5 6
16. A meditação guiada é uma técnica segura, com poucos riscos 1 2 3 4 5 6
17. A meditação melhora a capacidade de autocontrole 1 2 3 4 5 6
18. Tenho medo de ficar "preso" num transe durante a meditação. 1 2 3 4 5 6
19. Creio que durante a meditação guiada, se pode chegar a perder o controle 1 2 3 4 5 6
20. A meditação guiada é, por si só, perigosa 1 2 3 4 5 6
21. Tudo o que ocorre nas sessões de meditação guiada é provocado pelo paciente 1 2 3 4 5 6
22. Durante a meditação guiada pode-se obrigar uma pessoa a fazer coisas que ela não deseja 1 2 3 4 5 6
23. A meditação facilita o sucesso terapêutico 1 2 3 4 5 6
24. Se a pessoa não concordar com uma sugestão, ela pode ignorá-la completamente..... 1 2 3 4 5 6
25. A pessoa guiada em meditação mantém o controle sobre si ... 1 2 3 4 5 6
26. Eu gostaria de ser guiado em uma meditação 1 2 3 4 5 6
27. Se surgisse a oportunidade, eu me deixaria ser guiado em uma meditação 1 2 3 4 5 6
28. Eu gostaria de ser muito suscetível as técnicas de meditação guiada 1 2 3 4 5 6
29. Aprende-se mais depressa em estado meditativo 1 2 3 4 5 6

30. O que é lembrado quando meditamos é sempre verdade 1 2 3 4 5 6
31. É impossível mentir quando guiado em uma meditação, mesmo
que a pessoa que medita o queira 1 2 3 4 5 6
32. Uma forma de confirmar que um evento ocorreu é a pessoa
recordando isso enquanto medita 1 2 3 4 5 6
33. A meditação guiada envolve um estado de transe 1 2 3 4 5 6
34. A meditação não é investigada pela ciência 1 2 3 4 5 6
35. Em geral, algumas das características fundamentais das
pessoas muito suscetíveis às técnicas de meditação guiada são:
ingenuidade, ignorância e dependência psicológica 1 2 3 4 5 6
36. A pessoa enquanto medita, encontra-se fora de si 1 2 3 4 5 6
37. A meditação é um complemento ou ferramenta para
ajudar nas terapias médicas 1 2 3 4 5 6

POR FAVOR, CERTIFIQUE-SE DE TER RESPONDIDO TODAS AS QUESTÕES.

Disponível em <https://goo.gl/forms/mIFRVDdywKV2rFat1> (acessado em 10 de julho de 2017)

Relaxamento guiado

Adaptação para o português (BRA) da versão inglesa da escala de valência de atitudes e crenças frente a hipnose – Versão Cliente 1 – VSABH-C (2007)

A seguir, você encontrará algumas questões que nos ajudarão a conhecer a sua opinião sobre o relaxamento guiado. Você não precisa ter passado pelas experiências que são apresentadas nas perguntas, apenas que indique o que considera que poderia ocorrer em tais situações. Por favor, indique o seu grau de concordância com as afirmações apresentadas a seguir, fazendo um círculo no número que melhor reflete a sua opinião, de acordo com a escala de resposta que se apresenta.

LEMBRE-SE QUE NÃO HÁ RESPOSTAS CERTAS OU ERRADAS. ESTAMOS APENAS TENTANDO CONHECER A SUA OPINIÃO.

1	2	3	4	5	6
Discordo totalmente	Discordo bastante	Discordo	Concordo	Concordo bastante	Concordo totalmente

1. O relaxamento guiado pode ser de grande ajuda para os outros. 1 2 3 4 5 6
2. O relaxamento guiado implica um esforço de cooperação entre quem guia e quem é guiado 1 2 3 4 5 6
3. O paciente necessita estar em transe para conseguir obter benefícios da intervenção 1 2 3 4 5 6
4. O relaxamento guiado me assusta 1 2 3 4 5 6
5. Em um relaxamento guiado os resultados podem ser alcançados sem que haja nenhum esforço por parte de quem relaxa 1 2 3 4 5 6
6. O relaxamento guiado pode ser usada como uma solução mágica para resolver problemas 1 2 3 4 5 6
7. Creio que em um relaxamento guiado a pessoa é como um robô à mercê de quem a guia 1 2 3 4 5 6
8. O relaxamento guiado requer esforço por parte de quem relaxa. 1 2 3 4 5 6
9. O relaxamento guiado é, por si, todo o necessário para tratar a

- maioria dos problemas 1 2 3 4 5 6
10. O relaxamento guiado pode ser de grande ajuda para melhorar os efeitos dos tratamentos a que se associe 1 2 3 4 5 6
11. A pessoa é passiva quando está sendo guiada em uma meditação 1 2 3 4 5 6
12. O relaxamento guiado é um complemento ou ferramenta para melhorar as psicoterapias 1 2 3 4 5 6
13. Para guiar alguém ao relaxamento, é necessária a colaboração dessa pessoa 1 2 3 4 5 6
14. A pessoa quando relaxa pode "sair" do estado de relaxamento quando desejar 1 2 3 4 5 6
15. Durante o relaxamento guiado, a pessoa conserva a sua autonomia para fazer o que quiser 1 2 3 4 5 6
16. O relaxamento guiado é uma técnica segura, com poucos riscos 1 2 3 4 5 6
17. O relaxamento guiado melhora a capacidade de autocontrole 1 2 3 4 5 6
18. Tenho medo de ficar "preso" num transe durante o relaxamento guiado 1 2 3 4 5 6
19. Creio que durante o relaxamento guiado, pode-se chegar a perder o controle 1 2 3 4 5 6
20. O relaxamento guiado é, por si só, perigoso 1 2 3 4 5 6
21. Tudo o que ocorre nas sessões de relaxamento guiado é provocado pelo paciente 1 2 3 4 5 6
22. Durante o relaxamento guiado pode-se obrigar uma pessoa a fazer coisas que ela não deseja 1 2 3 4 5 6
23. O relaxamento guiado facilita o sucesso terapêutico 1 2 3 4 5 6
24. Se a pessoa não concordar com uma sugestão, ela pode ignorá-la completamente..... 1 2 3 4 5 6
25. A pessoa guiada em um relaxamento mantém o controle sobre si mesma 1 2 3 4 5 6
26. Eu gostaria de ser guiado em um relaxamento 1 2 3 4 5 6
27. Se surgisse a oportunidade, eu me deixaria ser guiado em um

- relaxamento 1 2 3 4 5 6
28. Eu gostaria de ser muito suscetível as técnicas de relaxamento guiado 1 2 3 4 5 6
29. Aprende-se mais depressa em um estado de relaxamento 1 2 3 4 5 6
30. O que é lembrado quando fazemos relaxamento guiado é sempre verdade 1 2 3 4 5 6
31. É impossível mentir quando guiado em um relaxamento, mesmo que a pessoa que relaxa o queira 1 2 3 4 5 6
32. Uma forma de confirmar que um evento ocorreu é a pessoa recordando isso enquanto é guiada em um relaxamento 1 2 3 4 5 6
33. O relaxamento guiado envolve um estado de transe 1 2 3 4 5 6
34. O relaxamento guiado não é investigada pela ciência 1 2 3 4 5 6
35. Em geral, algumas das características fundamentais das pessoas muito suscetíveis à técnicas de relaxamento são: ingenuidade, ignorância e dependência psicológica 1 2 3 4 5 6
36. A pessoa em estado de relaxamento encontra-se fora de si 1 2 3 4 5 6
37. O relaxamento guiado é um complemento ou ferramenta para ajudar nas terapias médicas 1 2 3 4 5 6

POR FAVOR, CERTIFIQUE-SE DE TER RESPONDIDO TODAS AS QUESTÕES.

Disponível em <https://goo.gl/forms/CEgkuqD624dy2yFF2> (acessado em 10 de julho de 2017)

Anexo 3 – Protocolo de indução hipnótica

O protocolo de indução hipnótica apresentado foi desenvolvido especificamente para o estudo em questão, de forma que foi desenhado para maximizar a efetividade da hipnose em aumentar a AT e consequentemente o comprimento dos telômeros de PBMC e, ao mesmo tempo, aumentar o engajamento dos sujeitos ao estudo.

ESTABELECENDO RAPPORT PREVIAMENTE À INDUÇÃO INICIAL

Os participantes foram notificados da testagem hipnótica no momento em que assinaram o TCLE. Esse processo em si pode servir para nutrir expectativas que podem potencializar o efeito do tratamento. Para ajudar os participantes a visualizarem os telômeros de seus leucócitos sendo restaurados pelo aumento da AT, foram exibidos dois vídeos sobre o assunto que foram encaminhados para os participantes desse grupo (ANDREWS, 2019; TA-Science, 2019). Esses vídeos foram retirados do YouTube por tratar-se de uma fonte pública de pesquisa, não demandando pagamento para o seu uso. O único propósito desses vídeos foi prover instrumentos para que cada participante seja capaz de imaginar mais precisamente o que está sendo sugestionado.

O protocolo foi dividido da seguinte forma:

I. Indução ao relaxamento profundo:

Os (as) participantes devem estar sentados (as) ou deitados. As acomodações físicas devem ser seguras de maneira a evitar riscos de queda em caso de relaxamento extremo.

Inicia-se pelo relaxamento de músculos menores, portanto, iniciamos pelas pálpebras e espalhamos tal relaxamento para os demais músculos do rosto. Para produzir o relaxamento das pálpebras a indução começa com olhos abertos. A partir daí conectamos um relaxamento ao outro até produzir o efeito relaxante pelo corpo todo.

II. Sugestão específica

A partir desse ponto a indução faz referência ao vídeo previamente assistido e há uma sugestão repetitiva do alongamento dos telômeros por cerca de 8 minutos.

III. Presente hipnótico

Nessa etapa o sujeito recebe uma recompensa por ter se permitido entrar em transe ao mesmo tempo em que recebe a indução principal do tratamento.

Com todas as pausas necessárias, esse procedimento dura cerca de 3 minutos.

IV. Instalação do signo sinal

O signo sinal é um gatilho que permite que o sujeito alcance mais rapidamente o mesmo estado que havia alcançado no ponto alto da sessão anterior, facilitando uma entrega mais profunda e amplificando os resultados a cada sessão. O signo sinal utilizado aqui foi a palavra “Chirrim”. É importante não realizar a instalação de signo sinal utilizando palavras frequentes do idioma falado pelo sujeito para evitar o risco de o sujeito entrar em transe involuntariamente fora do estudo por ter ouvido essa palavra de comando em sua rotina cotidiana.

Transcrição na íntegra

Segue a transcrição do áudio ouvido pelos membros do grupo hipnose:

Sente-se em uma posição confortável, com a coluna ereta. Você pode ou não usar um apoio. Coloque as suas mãos sobre as suas pernas e foque a sua atenção em um único ponto. Pode ser as costas da sua mão, pode ser uma marca na parede, um objeto à sua frente ou qualquer outro ponto fixo.

Preste atenção à sua respiração. Respirando profunda e lentamente, e a cada respiração, você fica mais relaxado. E a cada respiração, você relaxa mais e mais e seus olhos começam a pesar. A vontade de piscar torna-se cada vez mais frequente e mais forte e a cada piscada, seus olhos ficam ainda mais pesados.

Relaxe.

A cada respiração você relaxa ainda mais e seus olhos ficam ainda mais pesados. A vontade de piscar torna-se cada vez mais frequente e a cada piscada, seus olhos ficam mais e mais pesados.

Feche os olhos e relaxe profundamente. Relaxe profundamente permitindo que o relaxamento se espalhe por todo seu rosto.

Relaxe.

Imagine à sua frente uma escada. Uma escada a qual você pode descer, e apenas descer. Comece a descer os degraus em seu próprio ritmo e na medida que desce, permita-se relaxar cada vez mais.

Relaxe.

Desce mais um degrau, e outro. E a cada degrau, relaxe uma nova parte de seu corpo, começando da cabeça e relaxando o pescoço, mas mantendo ainda ereto, porém relaxado.

Seus passos seguem na mesma...

Seus passos seguem no mesmo...

Os seus passos seguem no mesmo ritmo da sua respiração, e a cada passo novos músculos são relaxados. Você relaxa os ombros e esse relaxamento vai descendo para os braços, o tórax. Embora você relaxe, você permanece com postura.

Estar ereto é muito confortável! E você continua descendo, descendo os degraus e ampliando o seu relaxamento.

Relaxe as mãos, permita que elas fiquem bem pesadas sobre as suas pernas. Relaxe a cintura. Relaxe as pernas deixando que o relaxamento vá da coxa para a parte inferior. Relaxe os pés. Relaxe também a sua mente. Esvazie a mente deixando espaço apenas para boas sensações.

Preste bastante atenção a este comando de relaxamento: “Chirrim”, relaxe profundamente, “Chirrim”, relaxe mais e mais profundamente, “Chirrim”, totalmente relaxado, fundo, fundo no relaxamento, totalmente relaxado, músculos totalmente desligados. “Chirrim”. Agora você alcançou o estado profundo suficiente para começar a obter controle sobre as suas funções fisiológicas. Aqui é possível controlar a sua respiração, de forma a alterar a sua liberação de hormônios. Neste estado, um simples pensamento pode causar grandes mudanças no funcionamento de seu organismo a nível celular.

É justamente neste estado que nós somos capazes de melhorar a saúde do corpo, que a mente influencia o físico.

Agora quero que você se lembre do vídeo que assistiu mais cedo. Naquele vídeo, havia uma enzima, a telomerase, capaz de restaurar o DNA para um estado antes de sofrer qualquer dano, capaz de tornar a célula ainda mais jovem. Lembre-se daquela cena.

Eu quero que você visualize exatamente a cena em que a telomerase repara o final do DNA. Cena em que a telomerase repara os telômeros. Pense na reconstrução do DNA, pense que isso pode estar ocorrendo inclusive dentro das suas próprias células. Aquelas células voltam ao estado anterior, quando elas ainda não haviam sofrido nenhuma divisão. Concentre-se, relaxe e visualize. Visualize a cena do DNA sendo reconstruído, preste atenção nos detalhes, tenha uma imagem bem vívida daquele vídeo.

Agora iremos focar em seu sistema imunológico. Você irá visualizar seu sistema imunológico ficando mais forte, mais preparado para qualquer tipo de ataque. Você vai visualizar inclusive que se seu sistema imunológico está ficando mais jovem, que o DNA das suas células está se recuperando. Uma a uma, as suas células vão ficando mais saudáveis. O DNA delas vai ficando cada vez mais regenerado, voltando cada vez mais ao estado de juventude. Como no filme, você irá visualizar a telomerase. Ela está ativa e está reparando todo o DNA de suas células. Todas as células que antes estavam com defeito, vão sendo gradativamente reparadas pelas suas telomerasas.

Na medida em que você visualiza a sua telomerase atuando, seus telômeros ficam mais compridos, você fica mais saudável e uma sensação incontrolável de bem-estar invade o seu corpo. Você inspira e se sente mais saudável. Você expira e sente as suas células totalmente regeneradas. Você permite que esta sensação se intensifique ainda mais a cada respiração. Seus telômeros ficam mais longos e você se sente cada vez melhor e mais saudável. Essa sensação prazerosa, irá permanecer mesmo após você sair do transe.

Foque em sua respiração. A cada vez que o ar entra, essa sensação se intensifica ainda mais. A cada vez que o ar sai, esta sensação se intensifica ainda mais. O ar entra, e você se sente bem. O ar sai, e você se sente ainda melhor. Perceba as suas células ficando mais e mais saudáveis.

Preste atenção também na música. A medida em que as notas ecoam elas vibram nas suas células. Fazendo com que o seu DNA fique cada vez mais restituído, novo, saudável, tudo a sua volta contribui para esta sensação de bem-estar. Dentro dessa sensação podemos incluir aí a saúde, segurança, acolhimento, conforto e prazer.

Relaxamento... concentre-se em relaxamento e prazer. Essas duas sensações são fáceis de você intensificar. Eu quero que você permita-se sentir dez vezes mais relaxado. Sinta-se dez vezes mais relaxado. Eu quero que você permita-se, sinta-se bem, muita a sensação de prazer. Você se sente muito bem, muito relaxado, com muita segurança, o prazer se intensifica dez vezes mais e as suas células se regeneram mais e mais, a sua saúde melhora a cada respiração.

Preste atenção aos seus batimentos cardíacos. A cada pulsar do seu sangue, suas células e seu sistema imune se tornam melhores do que eram antes. Melhores do que no segundo anterior e ainda que você não esteja ouvindo este áudio este efeito irá continuar. Todos os dias que você ouvir este áudio, você passará o dia todo bem, o dia todo se regenerando. Seu sistema imune passará o dia todo tornando-se mais jovem, mais eficaz e mais efetivo. Preste atenção à música. Ela irá intensificar ainda mais o seu estado de relaxamento e prazer. Por um tempo, haverá apenas a música e a pura sensação de auto cura, de prazer e de relaxamento.

Você irá continuar com esta sensação prazerosa por vários dias. Você também irá continuar com a sensação de que a sua telomerase continua ativa e reparando seu

sistema imunológico, mesmo se essa sensação passar, você terá lembranças de como é bom ser hipnotizado e de como essa sensação é prazerosa.

Logo em seguida, você irá notar que a minha voz começa a ficar mais e mais distante. Mais e mais distante e com isso você vai mais e mais profundo. E com isso você vai mais e mais profundo.

Eu ficarei em silêncio por um momento para que você possa fazer a sua reparação de seu próprio DNA com o poder da sua mente. Mais e mais distante e de como essa sensação é prazerosa e te faz sentir mais saudável. Permita que esse prazer se intensifique e com isso a atuação de sua telomerase, reparando seu DNA.

Preste bastante atenção neste estado de transe profundo. Preste bastante atenção a essa sensação de bem-estar. Preste bastante atenção a essa atual capacidade de aceitar sugestões. Toda vez que você escutar a palavra “Chirrim” irá fechar os olhos imediatamente e retornar exatamente a esse estado. Ao ouvir “Chirrim” você retornará a esse estado imediatamente. Ao ouvir “Chirrim” você fechará os olhos e retornará a esse estado imediatamente. ” Chirrim” de volta ao estado profundo de relaxamento, bem-estar e saúde. Abra os olhos. “Chirrim”, olhos fechados e de volta ao estado de relaxamento e bem-estar. Abra os olhos. “Chirrim”, olhos fechados de volta ao estado de relaxamento e bem-estar. Abra os olhos. “Chirrim”. Feche os olhos e de volta ao estado de relaxamento e bem-estar.

Agora preste atenção: irei contar até três e quando abrir os olhos estará totalmente desperto. Porém o efeito da palavra “Chirrim”, exerce sobre você um poder muito forte e permanece forte por muitos dias. Mesmo que você desperte, “Chirrim” te fará fechar os olhos e voltar a esse estado de profundo bem-estar, relaxamento e saúde.

Um: você começa a despertar com a forte sensação de bem-estar, mas permanece sobre os efeitos das sugestões aplicadas aqui;

Dois: um pouco mais desperto, sentindo-se ainda melhor e as sugestões aplicadas aqui durarão por dias;

Três: Totalmente desperto. Acorde.

Os quatro passos descritos nesse protocolo serão gravados e entregues em formato mp3 para todos os participantes desse grupo ao final do primeiro dia de tratamento com instruções para que seja executado uma vez ao dia em condições de conforto e privacidade similares às encontradas na prática presencial.

Anexo 4 – Protocolo de Meditação e Relaxamento

Para ambos os grupos foi entregue a mesma indução, no entanto uma era chamada de relaxamento e outra de meditação. Os indivíduos foram instruídos para não compartilhar o áudio com ninguém nem comentar sobre a indução com outras pessoas. Isso deve ter sido suficiente para que os voluntários não percebam que ambos os grupos foram expostos ao mesmo áudio.

Transcrição na íntegra

Segue a transcrição do áudio ouvido pelos membros dos grupos de relaxamento e de meditação:

Sente-se em uma posição confortável, com a coluna ereta. Você pode ou não usar um apoio. Coloque as suas mãos sobre as suas pernas e foque a sua atenção em um único ponto. Pode ser as costas da sua mão, pode ser uma marca na parede, um objeto à sua frente ou qualquer outro ponto fixo.

Preste atenção à sua respiração. Respirando profunda e lentamente, e a cada respiração, você fica mais relaxado. E a cada respiração, você relaxa mais e mais. E seus olhos começam a pesar. A vontade de piscar torna-se cada vez mais frequente e mais forte e a cada piscada, seus olhos ficam ainda mais pesados.

Relaxe.

A cada respiração você relaxa ainda mais e seus olhos ficam ainda mais pesados. A vontade de piscar torna-se cada vez mais frequente e a cada piscada, seus olhos ficam mais e mais pesados. Feche os olhos e relaxe profundamente. Relaxe profundamente permitindo que o relaxamento se espalhe por todo seu rosto.

Relaxe.

Imagine à sua frente uma escada. Uma escada a qual você pode descer, e apenas descer. Comece a descer os degraus em seu próprio ritmo e na medida que desce, permita-se relaxar cada vez mais.

Relaxe.

Desce mais um degrau, e outro. E a cada degrau, relaxe uma nova parte de seu corpo, começando da cabeça e relaxando o pescoço, mas mantendo ainda ereto, porém relaxado.

Seus passos seguem na mesma...

Seus passos seguem no mesmo...

Os seus passos seguem no mesmo ritmo da sua respiração, e a cada passo novos músculos são relaxados. Você relaxa os ombros e esse relaxamento vai descendo para os braços, o tórax. Embora você relaxe, você permanece com postura. Estar ereto é muito confortável! E você continua descendo, descendo os degraus e ampliando o seu relaxamento. Relaxe as mãos, permita que elas fiquem bem pesadas sobre as suas pernas. Relaxe a cintura. Relaxe as pernas deixando que o relaxamento vá da coxa para a parte inferior. Relaxe os pés. Relaxe também a sua mente. Esvazie a mente deixando espaço apenas para boas sensações.

Tomando contato com a sua própria respiração, percebendo o ar entrando e preenchendo os pulmões, entrando. Tome consciência de como esse ar penetra pelas narinas, desce através da garganta e preenche os pulmões. E na expiração você sente o ar saindo, seguindo o caminho inverso. Gradualmente permita que o ar preencha um pouco mais os seus pulmões, deixando a respiração um pouco mais profunda, um pouco mais lenta. Profunda e lenta. Encha o seu abdômen e depois o tórax e na expiração, perceba o inverso. Enquanto você inspira, você sente o ar preenchendo seu corpo de cima para baixo. Enche primeiro os pulmões e depois o abdômen, enquanto você respira, você sente o pulmão esvaziando e depois o abdômen. Você pode agora incluir uma pequena pausa entre inspiração e expiração. Da próxima vez que você inspirar com os pulmões cheios, você irá reter o ar por dois segundos e depois expirar lentamente. E quando os pulmões estiverem vazios, você vai reter os pulmões sem ar por dois segundos. Em seguida você inicia um novo ciclo. Respirando, retendo o ar, expirando e retendo o ar. Então inspire, segure o ar por dois segundos, e expire, segure o ar por mais dois segundos, inspire. Expire, Inspire, Expire.

A respiração de uma forma bem profunda e relaxada. Permita agora, que a respiração adquira um ritmo natural. Você vai direcionar a sua atenção para o alto da sua cabeça, com os olhos fechados. E em seguida, vai direcionar a sua atenção para o centro de sua testa. Depois traz a atenção para o seu olho direito, olho esquerdo, olho esquerdo, narina direita, narina esquerda, orelha direita, orelha esquerda, orelha

esquerda, lábio superior, lábio inferior, língua. Na medida você, na medida em que você coloca atenção nestas partes, você permite que elas relaxem um pouco mais. Garganta, pescoço, a coluna vertebral, desce atenção pela região cervical, torácica e lombar, permitindo a região dos seus ombros, que relaxem um pouco mais, braço e mão direita, braço e mão esquerda, a região do seu tórax também o abdômen, pélvis, perna direita como um todo e a perna esquerda.

Agora volte atenção para a região do seu tórax e concentre-se no pulsar de seu próprio coração. Volte atenção para região do seu tórax. Concentre-se nas suas batidas cardíacas, perceba também a sua respiração. Se você perceber que sua mente se dispersou, divagou em pensamentos que não nesta prática, você apenas volta a sua atenção para a sua respiração e repete mentalmente a palavra paz, sempre que se distrair, “paz”, “paz”, “paz”. Quando algum pensamento surgir em sua mente, você apenas se dá conta de sua existência e volta a prestar atenção em sua respiração.

“Paz”... “Paz”... “ Paz”.

Atenção à sua respiração, permita com que sua mente naturalmente se esvazie, trazendo a sua atenção novamente para o seu corpo, deixe ao mesmo tempo a sua coluna ao mesmo tempo ereta e relaxada. Permita que o ar que entra preencha a região do abdômen e do tórax. Deixe a respiração ao mesmo tempo profunda e relaxada.

“Paz”.

Se algum pensamento aparecer na sua mente, permita apenas que ele desapareça, da mesma forma que uma nuvem surge no céu e depois de alguns momentos desaparece sozinha, sem nenhum esforço. De uma forma natural, os pensamentos simplesmente desaparecem e você novamente volta atenção para o seu corpo e para sua respiração.

“Paz”.

Você percebe o ar entrando e saindo, naturalmente. Você se dá conta de que existe um espaço, um intervalo entre a sua respiração e a sua expiração. O ar entra, naturalmente ocorre uma pequena pausa e o ar sai, outra pequena pausa para que o ar entre. Direcione sua atenção a estas pequenas pausas, a estes dois intervalos entre uma respiração e uma expiração e entre uma expiração e uma inspiração. Perceba esse vazio entre os dois, quando você não está nem expirando, nem inspirando. Se a sua mente se dispersar, você apenas a traz de volta para sua respiração, trazendo sua

consciência novamente para o seu corpo, mantendo a coluna ereta e relaxada. Se permitindo relaxar um pouco mais. Se permitindo relaxar um pouco mais nessa posição.

Você pode também observar seus próprios pensamentos. Entre um pensamento e outro, também existe esta pausa. Um pensamento que surge, desaparece, surge outro e desaparece. Se o pensamento está em forma de palavras, há um vazio entre uma palavra e outra. Se está em forma de imagens, existe o intervalo entre uma e outra. Se está em forma de sons, pode haver um intervalo entre cada som. Esse intervalo, neste vazio, ocorre da mesma forma que com a respiração e você pode permitir que este intervalo aumente. Aumentando cada vez mais o seu tempo em vazio, em não-pensamentos. A qualquer momento, irei parar de falar e deixar você seguir o seu próprio ritmo de auto exploração. Relaxe.

Relaxe.

Relaxe.

Se qualquer ruído externo vier a te distrair, você rapidamente retorna a atenção para sua respiração e lembre da palavra paz.

Relaxe.

Qualquer ruído externo apenas contribui para o seu relaxamento.

De uma atenção tranquila aos seus pensamentos e perceba o intervalo que ocorre entre eles. Sincronize-os com a sua respiração e pense em paz. A respiração profunda e suave. Dê uma atenção tranquila ao seu próprio coração. Os próximos momentos, você irá começar a trazer a sua atenção para o mundo exterior. Ouvindo os sons que acontecem ao seu redor, sentindo contato do seu corpo com a cadeira e dos seus pés com o chão. Lentamente, movimente os dedos dos pés e das mãos fazendo algumas respirações profundas, movimentando lentamente o seu pescoço e girando os ombros. Movimente lentamente a sua coluna, começando a espreguiçar e alongar seus braços e pernas. Abra os olhos lentamente e você está pronta para encerrar.

Abra os olhos lentamente e retorne.

Anexo 5 – Protocolo de medição da atividade da telomerase de PBMC

Antes de analisar a telomerase das células, é necessário manusear as amostras de sangue periférico extraídas dos sujeitos. O primeiro passo é a extração das células mononucleadas do sangue periférico (do inglês, PBMC), DNA e RNA e o posterior congelamento dessas amostras para que possam todas serem analisadas ao mesmo tempo ao final das intervenções. As amostras foram mantidas a - 80°C até o fim dos experimentos por congelamento instantâneo para DNA e RNA com o uso de nitrogênio ou deixando no gelo por 30 minutos antes de levar ao freezer, seguindo o protocolo de Mender & Shay (2015) e por congelamento lento para células viáveis para posterior análise quando todas as amostras forem obtidas.

Extração de PBMC: O sangue periférico é composto de diversos tipos de células e substâncias, portanto, é preciso que sejam realizados alguns passos para separar as células viáveis antes do congelamento. Felizmente trata-se de um procedimento comumente realizado, de forma que existem kits comerciais para realizar tal extração. Um método bastante apontado pela revisão de Black & Slavich (2016) foi o Ficoll que é um método patenteado e comercializado pela GE Healthcare. Dentre as diversas opções de kits que a empresa oferece, para esse estudo destaca-se o Ficoll-Paque Plus® que é um método descrito como sendo específico para o isolamento de linfócitos e monócitos.

Para isolar as PBMCs das demais células foi utilizado o protocolo do KIT comercial Ficoll-Paque Plus®.

Para a extração de células viáveis, tal protocolo necessita dos seguintes reagentes por amostra:

3 ml de Ficoll-Paque Plus®

10,3 ml de PBS

2 ml de tampão de lise

0,5 ml de RPMI

0,5 ml de SFB + 10% DMSO

Fora os reagentes também são necessários:

- 1 Fluxo
- 1 Centrífuga
- 2 Tubos Falcon de 15 ml por amostra
- Ponteiras e 1 pipeta de 1000 µl
- 1 Freezer -80°C
- 1 Mr Frosty ou algum sistema alternativo para congelamento lento.

Atividade da telomerase: o método para avaliar AT será o que está presente no kit comercial TRAPeze Detection Kit, comercializado por algumas empresas. Trata-se de um método já estabelecido e amplamente utilizado, o que facilita a comparação com outros estudos (Schutte e Malouff, 2013). A coleta do sangue periférico será realizada três dias após o tratamento alvo da detecção. A literatura aponta que uma intervenção demora de 2 (dois) a 5 (cinco) dias após um tratamento para ser mensurável, ocorrendo o seu pico máximo 3 (três) dias após o tratamento (Valanzuela & Effross, 2002).

Para a análise será utilizada PCR de tempo real (qPCR). A primeira coleta irá ocorrer antes da formação dos grupos. A segunda coleta ocorrerá 45 (quarenta e cinco) dias após o início do tratamento. A última coleta ocorrerá após 3 (três) meses após o início do tratamento.

Para quantificar a população de células será utilizado um oligonucleotídeo de um gene de cópia única (fonte), possibilitando assim, o cálculo da quantidade de telomerase presente em cada célula. O gene de cópia única é um gene presente uma única vez em todo o código genético de uma célula, voltando a se repetir apenas se houver material de outra célula na medição.

Com relação à montagem da placa para ser analisada pela qPCR, todos os poços foram feitos em triplicata para evitar assim erros na montagem dos poços, seja por erro nas dosagens ou por possíveis contaminações. Ao final, é esperado que ao analisar as saídas do programa, triplicatas livres de erros apresentem resultados muito similares. Caso haja algum erro em um dos poços, esse irá se mostrar como sendo um outlier. Para estabelecer um julgamento objetivo, calcula-se a média da triplicata e seu desvio padrão. Se alguma das unidades da triplicata se mostrar divergente a uma distância superior ao módulo de um desvio padrão da média, essa será excluída e a

média será recalculada com o resultado dos poços restantes. Esse procedimento é capaz de aumentar consideravelmente a validade interna do estudo.

O protocolo para a medição da AT será extraído do kit comercial TRAPeze Detection Kit. Caso seja necessário e possível replicar o protocolo sem que seja preciso realizar a compra de kits comerciais para tal, o protocolo do kit ainda será extraído da internet e seguido. Qualquer adaptação que se faça necessária será relatada e devidamente justificada, de forma a não comprometer a credibilidade do estudo.

O KIT TRAPeze contém CHAPS, TSR8, Grade water (devem ser conservados a -20°C) e deveria conter, mas não veio, células HeLa (conservada a -80°C). Esses reagentes são suficientes para analisar 40 amostras segundo seu manual, mas no limite é possível analisar até 44 amostras.

Para padronizar as concentrações das amostras é necessário um KIT comercial BCA Assay.

Para realizar a etapa final da amostra são necessários os reagentes não fornecidos no kit:

Taq Polimerase

TrisHCl pH 7,4 (1M)

NaCl (5M)

MgCl₂ (2M)

Equipamentos e materiais

Ponteiras e pipetas de 1000 µl, 200 µl e 10 µl

Placas translúcidas de 96 poços e fundo chato (placa branca da Corning melhora a precisão, mas é substituível pelas placas translúcidas)

Estufa ou sistema de aquecimento a seco para elevar a temperatura das placas e amostras a 37°C

Agitador de placa e de amostras

Centrífuga

Tubos Eppendorf de 1,5 ml ou 2 ml.

Victor 3 ou espectrofotômetro capaz de ler a Absorbância a 570nm, Fluoresceína à 485nm de excitação e 535nm de emissão e Sulforrodamina 585nm (faixa da fluorescência de emissão) de excitação e 620nm de emissão.

Considerações finais

Os métodos aqui descritos têm respaldo não apenas da literatura, mas também nos protocolos já utilizados pelo Hospital Israelita Albert Einstein, onde tive a oportunidade de realizar um treinamento. Todas as etapas de análise de material biológico, desde o desenvolvimento do protocolo até a compra de materiais e a análise das amostras, estão sendo supervisionadas pela co-orientadora desse projeto, a Professora Dra. Daniela Bonci do departamento de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo.

Anexo 6 – Questionário de preparatório

Conhecer o perfil dos participantes do estudo é importante, uma vez que percepções importantes podem emergir após o cruzamento dos dados de perfil com os resultados obtidos a partir dos mecanismos de biofeedback. Como o estudo considera a expectativa como uma variável fundamental, entender traços de personalidade torna-se muito estratégico, uma vez que diferentes visões de mundo e diferentes realidades podem influenciar nas. Além disso outros traços de personalidade poderiam estar por trás dos resultados observados, ampliando a explicação dos resultados obtidos para além de uma pura correlação direta entre as técnicas empregadas e os resultados obtidos. Caso a técnica empregada seja mais importante do que as expectativas, o traço de personalidade deve influenciar os resultados menos do que a técnica empregada no experimento.

As questões a seguir são questões filtro e foram adicionadas ao Google Forms <https://forms.gle/RY9KaUUSPgiRaA5p6> (acessado em 20 de Novembro de 2019) para

serem preenchidas pelos pacientes antes que esses sejam chamados para um contato pessoal.

Questionário preparatório

Olá, obrigado pelo seu interesse em participar dessa pesquisa. Sua participação é fundamental para esse projeto. É importantíssimo que você responda todas as questões que lhe forem apresentadas da maneira mais sincera possível. Não certo ou errado. Caso você se sinta desconfortável com alguma questão sinta-se à vontade para contatar o organizador dessa pesquisa pelo WhatsApp 11 96268-0026 ou pelo e-mail andersoncorrea@usp.br

Data: Automaticamente preenchida

E-mail*: _____

Nome*: _____

Telefone*: _____

Você faz ou já fez o uso de remédios com ação sobre o sistema nervoso central?

Você toma algum medicamento de uso controlado atualmente (tarja preta)? Qual medicamento? Qual a frequência do uso?⁹

Você tem alguma doença nervosa ou psiquiátrica?

Você faz uso de alguma droga legal ou ilegal? Em caso afirmativo, com que frequência? Quando foi o último uso?

Tem restrições quanto a coleta de sangue?⁵

** Preenchimento obrigatório

⁹ Perguntas incluídas após a revisão do questionário em setembro de 2019.

Declaração

Declaro serem verdadeiras todas as informações acima, isentando os pesquisadores e instituições envolvidas de qualquer consequência decorrente de informações por mim omitidas.

Ao clicar em concordo você aceita também ser contatado para as próximas etapas.

- ☐ Concordo
- ☐ Discordo

Anexo 7 – Questionário para a avaliação da percepção dos resultados do tratamento

O questionário a seguir busca medir a auto percepção dos sujeitos acerca do relaxamento pois tal percepção pode influenciar os resultados obtidos nesse estudo. Para aumentar a precisão do estudo, a escala de intensidade foi obtida a partir de uma adaptação da escala Centimax de Borg (2007) para aumentar a validade interna do estudo e aumentar o poder do teste, facilitando também as análises quantitativas. Adaptamos a escala CR100 (Borg, 2007) para uma escala de concordância.

Gostaríamos que você atribuísse um valor para cada afirmativa abaixo utilizando a Tabela a seguir: Lembramos que não existe resposta certa ou errada. Você pode atribuir o valor que desejar no intervalo de 0 (zero) a 120 (cento e vinte).

- 1- Eu gosto de hipnose / meditação /relaxamento guiado.
- 2- Me sinto melhor após o tratamento.
- 3- Me sinto mais saudável após o tratamento.
- 4- E caso eu trocasse essa pergunta 3 para:

“3. Me SENTI mais saudável logo após o tratamento.”¹⁰

Obrigado por sua participação!

¹⁰ Pergunta criada com base no relato da participante Priscila Pavoni Faraco (seção 6.5) e aplicada apenas aos participantes que já haviam terminado o estudo há mais de um mês

Anexo 8 – Tampão para mensurar Fluorescência

Os componentes do tampão (Tabela 8) devem ser preparados para ficar exatamente como descrito, visto que não vêm com essas concentrações nem pH. Em todas as embalagens dos sais vem descrita a concentração de cada um e geralmente essa concentração está para 1M. Assim para chegar na concentração desejada, basta fazer cálculos de relação. A preparação de cada componente está descrita a seguir:

a. Tris-HCl pH 7.4 (1M):

Ingredientes:

- Tris Base (121,14g)
- HCl (cuidado ao manusear)
- H₂O (água ultrapura Milli-Q®)

Caso façamos a diluição de 121,14g de Tris Base em 1L de água teremos uma solução à 1M. Iremos produzir 50 ml de solução e ainda precisamos ajustar o pH. Proporcionalmente, devemos utilizar 6,05g de Tris Base e 30 ml de H₂O. Após isso adicione HCl até chegar no pH de 7,4 e adicione H₂O até completar 50 ml.

b. NaCl (5M)

- NaCl (58,44g)
- H₂O (água ultrapura Milli-Q®)

Cada 58,44g se dissolvido em 1L de água, produz uma solução de 1M. Para produzir uma solução 5 vezes mais concentrada basta adicionar cinco vezes mais que 58,44g por litro (292,2g). Iremos produzir 50 ml então basta adicionar uma quantidade proporcional ao volume final desejado e misturar bem.

c. MgCl₂ (2M):

- MgCl_2 (203,3g)
- H_2O (água ultrapura Milli-Q®)

Seguindo a mesma lógica do item b desse Anexo 8, adicionaremos 4,07g do reagente a 10ml de H_2O .

d. Grade water – Acompanha o Kit TRAPeZe XL

Anexo 9 – Diluições

A seguir seguem as Tabelas com as concentrações das amostras e as diluições que foram necessárias para que obtivéssemos a concentração de proteína de 150 ng/ml e volume final de 30 µl.

Tabela 17 - Curva para o cálculo da concentração das amostras medida em 10/11/2019

Absorbancia	(Duplicata)	Abs Média	Media - branco	concentracao ug/ml
3,09E-01	3,62E-01	0,33548827	0,222	2000
2,07E-01	2,55E-01	0,231358115	0,118	1000
2,01E-01	2,08E-01	0,204610504	0,091	500
1,62E-01	1,68E-01	0,164890697	0,052	250
1,37E-01	1,48E-01	0,142608081	0,029	125
1,26E-01	1,23E-01	0,12448843	0,011	62,5
1,20E-01	1,06E-01	0,11317239	0,000	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 15 - Equação para a obtenção da concentração das amostras do ensaio de 10/11/2019

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 18 - Concentração final e diluição necessária para atingir a contração desejada

Absorbância	(Duplicata)	Concentração	Media - branco	Abs Média	Sujeitos	Quantidade de amostra	quantidade de chaps
2,69E-01	2,63E-01	1523,07	0,153	0,266	35 (1)	3,0	27,0
3,73E-01	3,75E-01	2514,66	0,261	0,374	35 (2)	1,8	28,2
3,27E-01	3,34E-01	2111,66	0,217	0,330	35 (3)	2,1	27,9
3,90E-01	4,03E-01	2714,85	0,283	0,396	48 (1)	1,7	28,3
2,78E-01	2,78E-01	1632,91	0,165	0,278	48 (2)	2,8	27,2
3,42E-01	3,29E-01	2156,37	0,222	0,335	48 (3)	2,1	27,9
3,57E-01	3,55E-01	2348,21	0,243	0,356	51 (1)	1,9	28,1
3,37E-01	3,37E-01	2172,78	0,224	0,337	51 (2)	2,1	27,9
3,87E-01	3,89E-01	2637,21	0,275	0,388	51 (3)	1,7	28,3
3,36E-01	3,50E-01	2224,35	0,229	0,343	75 (1)	2,0	28,0
3,41E-01	3,33E-01	2174,65	0,224	0,337	75 (2)	2,1	27,9
3,13E-01	3,18E-01	1974,55	0,202	0,315	75 (3)	2,3	27,7
3,18E-01	3,09E-01	1957,87	0,200	0,314	78 (1)	2,3	27,7
3,15E-01	3,44E-01	2104,59	0,216	0,330	78 (2)	2,1	27,9
3,68E-01	3,76E-01	2495,05	0,259	0,372	78 (3)	1,8	28,2
4,25E-01	4,32E-01	3010,06	0,315	0,428	87 (1)	1,5	28,5
3,96E-01	3,87E-01	2668,90	0,278	0,391	87 (2)	1,7	28,3
4,07E-01	4,14E-01	2849,04	0,298	0,411	87 (3)	1,6	28,4
4,49E-01	4,37E-01	3144,56	0,330	0,443	99 (1)	1,4	28,6
4,01E-01	4,02E-01	2764,63	0,288	0,402	99 (2)	1,6	28,4
4,24E-01	4,28E-01	2988,65	0,313	0,426	99 (3)	1,5	28,5
3,55E-01	3,56E-01	2342,47	0,242	0,356	109 (2)	1,9	28,1
3,63E-01	3,51E-01	2355,26	0,244	0,357	109 (2)	1,9	28,1
3,79E-01	3,88E-01	2600,07	0,270	0,384	109 (3)	1,7	28,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 19 - Curva para o cálculo da concentração das amostras medida em 16/11/2019

Absorbância	(Duplicata)	Abs Média	Media - branco	concentração ug/ml
4,03E-01	4,26E-01	0,414647494	0,304	2000
2,70E-01	2,76E-01	0,272756238	0,162	1000
2,10E-01	2,01E-01	0,205242048	0,094	500
1,58E-01	1,58E-01	0,157939725	0,047	250
1,30E-01	1,18E-01	0,123937067	0,013	125
1,09E-01	1,07E-01	0,108163434	-0,003	62,5
1,12E-01	1,10E-01	0,110834434	0,000	0

Fonte: Elaborado pelo autor

Gráfico 16 - Equação para a obtenção da concentração das amostras do ensaio de 16/11/2019

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 19 - Concentração final e diluição necessária para atingir a contração desejada.

Absorbancia	(Duplicata)	Concentração	Media - branco	Abs Média	Sujeito	Quantidade de amostra	quantidade de chaps
5,90E-01	5,85E-01	2734,8	0,451	0,587	17 (1)	1,6	28,4
5,38E-01	5,40E-01	2442,7	0,402	0,539	17 (2)	1,8	28,2
4,37E-01	4,74E-01	1936,4	0,319	0,455	17 (3)	2,3	27,7
4,76E-01	4,26E-01	1908,5	0,314	0,451	27 (1)	2,4	27,6
3,79E-01	3,43E-01	1364,0	0,224	0,361	27 (2)	3,3	26,7
4,40E-01	4,22E-01	1788,7	0,294	0,431	27 (3)	2,5	27,5
2,72E-01	2,53E-01	767,2	0,126	0,262	43 (1)	5,9	24,1
3,16E-01	3,11E-01	1077,3	0,177	0,314	43 (2)	4,2	25,8
3,52E-01	3,55E-01	1318,9	0,217	0,353	43 (3)	3,4	26,6
2,48E-01	2,60E-01	718,1	0,118	0,254	91 (1)	6,3	23,7
2,63E-01	2,34E-01	683,6	0,112	0,249	91 (2)	6,6	23,4
3,52E-01	3,44E-01	1284,7	0,211	0,348	91 (3)	3,5	26,5
3,02E-01	2,95E-01	986,5	0,162	0,299	98 (1)	4,6	25,4
3,46E-01	3,41E-01	1256,7	0,207	0,343	98 (2)	3,6	26,4
3,54E-01	3,38E-01	1275,9	0,210	0,346	98 (3)	3,5	26,5
2,57E-01	2,59E-01	739,9	0,121	0,258	101 (1)	6,1	23,9
2,79E-01	2,69E-01	836,4	0,137	0,274	101 (2)	5,4	24,6
3,96E-01	3,91E-01	1563,2	0,257	0,394	101 (3)	2,9	27,1

Amostras com concentração acima de 2000 tiveram que ser diluídas novamente pois suas concentrações estavam além dos valores da curva de forma a comprometer a precisão dos resultados.

Fonte.: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 -Curva para o cálculo da concentração das amostras medida em 26/11/2019.

Absorbância	(Duplicata)	Abs Média	Media - branco	concentração ug/ml
4,30E-01	5,10E-01	0,470037715	0,330	2000
3,34E-01	3,61E-01	0,347602262	0,207	1000
2,62E-01	2,80E-01	0,270659199	0,130	500
2,01E-01	2,10E-01	0,205397006	0,065	250
1,70E-01	1,63E-01	0,166338725	0,026	125
1,52E-01	1,50E-01	0,150806905	0,010	62,5
1,41E-01	1,40E-01	0,140390532	0,000	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 17 - Equação para a obtenção da concentração das amostras do ensaio de 26/11/2019

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 21 - Concentração final e diluição necessária para atingir a contração desejada

Absorbancia	(Duplicata)	Concentração	Media - branco	Abs Média	Sujeito	Quantidade de amostra	quantidade de chaps
1,85E-01	1,76E-01	308,1	0,040	0,180	35(3)	14,6	15,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

Anexo 10 – TrapEZE – Resultados

Tabela 22 - Resultados e análises básicas das amostras da bateria 1

Amostra	FL (RFU)	Δ FL	R (RFU)	Δ R	Δ FL/ Δ R	log[Δ FL/ Δ R]	log [TPG]	TPG
35-1	0,4491	0,0128	11,8	10,346	0,001237193	-2,9075625	0,349304	2,2351337
35-1-Inativada	0,422	-0,0143	10,85	9,396	-0,001521924	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
35-2	0,4205	-0,0158	12,38	10,926	-0,001446092	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
35-2-Inativada	0,4116	-0,0247	11,94	10,486	-0,002355522	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
35-3	0,4163	-0,0200	11,57	10,116	-0,001977066	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
35-3-Inativada	0,4052	-0,0311	11,2	9,746	-0,003191053	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
43-1	0,4498	0,0135	11,78	10,326	0,001307379	-2,88359835	0,317287	2,07628707
43-1-Inativada	0,4318	-0,0045	11,42	9,966	-0,000451535	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
43-2	0,4285	-0,0078	11,58	10,126	-0,000770294	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
43-2-Inativada	0,423	-0,0133	11,46	10,006	-0,001329202	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
43-3	0,822	0,3857	12,17	10,716	0,035992908	-1,44378307	-1,606306	0,02475678
43-3-Inativada	0,4283	-0,0080	12,08	10,626	-0,00075287	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
48-1	0,435	-0,0013	12,19	10,736	-0,000121088	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
48-1-Inativada	0,4383	0,0020	11,26	9,806	0,000203957	-3,69046189	1,395257	24,8460348
48-2	0,4158	-0,0205	11,5	10,046	-0,002040613	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
48-2-Inativada	0,3986	-0,0377	10,67	9,216	-0,004090712	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
48-3	0,4269	-0,0094	11,49	10,036	-0,000936628	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
48-3-Inativada	0,416	-0,0203	11,38	9,926	-0,002045134	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
78-1	0,4171	-0,0192	11,41	9,956	-0,001928485	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
78-1-Inativada	0,4152	-0,0211	11,45	9,996	-0,002110844	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
78-2	0,4355	-0,0008	11,36	9,906	-8,07591E-05	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
78-2-Inativada	0,4317	-0,0046	11,27	9,816	-0,000468623	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
78-3	0,4011	-0,0352	11,44	9,986	-0,003524935	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!

78-3-Inativada	0,4211	-0,0152	10,74	9,286	-0,001636873	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
91-1	0,4022	-0,0341	11,09	9,636	-0,003538813	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
91-1-Inativada	0,4172	-0,0191	10,95	9,496	-0,002011373	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
91-2	0,4052	-0,0311	10,85	9,396	-0,003309919	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
91-2-Inativada	0,4207	-0,0156	10,9	9,446	-0,001651493	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
91-3	0,4179	-0,0184	11,51	10,056	-0,001829753	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
91-3-Inativada	0,4198	-0,0165	10,78	9,326	-0,001769247	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
98-1	0,4168	-0,0195	10,74	9,286	-0,002099935	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
98-1-Inativada	0,4009	-0,0354	10,41	8,956	-0,003952657	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
98-2	0,4005	-0,0358	10,01	8,556	-0,004184198	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
98-2-Inativada	0,4072	-0,0291	9,98	8,526	-0,003413089	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
98-3	0,4243	-0,0120	10,7	9,246	-0,001297859	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
98-3-Inativada	0,388	-0,0483	10,52	9,066	-0,005327598	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
101-1	0,3434	-0,0929	8,545	7,091	-0,013101114	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
101-1-Inativada	0,3731	-0,0632	9,431	7,977	-0,007922778	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
101-2	0,4297	-0,0066	17,47	16,016	-0,000412088	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
101-2-Inativada	0,3955	-0,0408	10,48	9,026	-0,004520275	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
101-3	0,3557	-0,0806	8,363	6,909	-0,011665943	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
101-3-Inativada	0,414	-0,0223	10,41	8,956	-0,002489951	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
Ctrl Positivo	2,953	2,5167	4,218	2,764	0,91052822	-0,04070659	-3,480816	0,00033051

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 23 - Curva Controle de TSR8 (bateria 2)

R8 (amole/rxn)	R8 (TPG unit)	Log[TPG]	FL (RFU)	Δ FL	R (RFU)	Δ R	Δ FL/ Δ R	log[Δ FL/ Δ R]
TSR8 1 (0,4)	400	2,60206	8,156	5,762	3,191	0,5090	11,3202	1,05385547
TSR8 2 (0,08)	80	1,90309	5,456	3,062	1,651	-1,0310	-2,9699	#NÚM!
TSR8 3 (0,016)	16	1,20412	4,683	2,289	2,103	-0,5790	-3,9534	#NÚM!
TSR8 4 (0,0032)	3,2	0,50515	3,466	1,072	2,759	0,0770	13,9221	1,14370406

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 24 - Resultados e análises básicas das amostras da bateria 2

Amostra	FL (RFU)	ΔFL	R (RFU)	ΔR	ΔFL/ΔR	log[ΔFL/ΔR]	log [TPG]	TPG
17-1	2,374	-0,020	22,29	19,608	-0,001019992	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
17-2	2,793	0,399	23,05	20,368	0,019589552	-1,70797549	0,874031	7,48222748
17-3	1,801	-0,593	21,69	19,008	-0,031197391	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
17-1 Inativada	4,133	1,739	21,26	18,578	0,09360534	-1,02869938	1,154164	14,2614728
17-2 Inativada	2,546	0,152	22,34	19,658	0,007732221	-2,11169574	0,707537	5,09960661
17-3 Inativada	2,03	-0,364	24,1	21,418	-0,016995051	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
27-1	3,189	0,795	19,12	16,438	0,048363548	-1,31548185	1,035895	10,861637
27-2	2,945	0,551	20,75	18,068	0,030495904	-1,51575848	0,953301	8,98051415
27-3	2,339	-0,055	23,15	20,468	-0,002687121	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
27-1 Inativada	1,573	-0,821	19,4	16,718	-0,049108745	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
27-2 Inativada	0,873	-1,521	21,52	18,838	-0,080741055	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
27-3 Inativada	1,73	-0,664	21,52	18,838	-0,035247903	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
51-1	2,047	-0,347	21,74	19,058	-0,018207577	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
51-2	3,473	1,079	22,01	19,328	0,055825745	-1,25316547	1,061595	11,5237694
51-3	2,318	-0,076	21,73	19,048	-0,00398992	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
51-1 Inativada	1,692	-0,702	18,13	15,448	-0,045442776	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
51-2 Inativada	3,598	1,204	22,11	19,428	0,061972411	-1,20780161	1,080303	12,0310247
51-3 Inativada	1,885	-0,509	18,99	16,308	-0,031211675	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
75-1	3,127	0,733	21,59	18,908	0,03876666	-1,41154162	0,99628	9,91471503
75-2	2,262	-0,132	20,84	18,158	-0,007269523	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
75-3	2,278	-0,116	20,89	18,208	-0,006370826	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
75-1 Inativada	2,1	-0,294	22,8	20,118	-0,014613779	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
75-2 Inativada	1,817	-0,577	14,49	11,808	-0,048865176	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
75-3 Inativada	2,249	-0,145	20,86	18,178	-0,007976675	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
87-1	2,898	0,504	21,22	18,538	0,027187399	-1,56563234	0,932733	8,56511547
87-2	3,529	1,135	23,38	20,698	0,054836216	-1,26093252	1,058391	11,4390887
87-3	3,388	0,994	20,86	18,178	0,054681483	-1,26215971	1,057885	11,4257662
87-1 Inativada	2,267	-0,127	21,05	18,368	-0,006914199	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
87-2 Inativada	2,139	-0,255	20,27	17,588	-0,014498522	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
87-3 Inativada	2,283	-0,111	20,72	18,038	-0,006153676	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
99-1	1,291	-1,103	22,31	19,628	-0,056195231	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
99-2	3,613	1,219	26,13	23,448	0,051987376	-1,2841021	1,048836	11,1901599
99-3	2,764	0,370	17,79	15,108	0,024490336	-1,61100525	0,914021	8,20392033

99-1 Inativada	2,132	-0,262	21,43	18,748	-0,013974824	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
99-2 Inativada	1,902	-0,492	18,86	16,178	-0,03041167	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
99-3 Inativada	2,498	0,104	19,02	16,338	0,006365528	-2,19616555	0,672701	4,70653536
109-1	3,206	0,812	20	17,318	0,046887631	-1,32894171	1,030344	10,7236947
109-2	2,982	0,588	20,4	17,718	0,03318659	-1,47903737	0,968445	9,29918715
109-3	2,182	-0,212	20,91	18,228	-0,011630459	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
109-1 Inativada	1,751	-0,643	20,27	17,588	-0,036559018	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
109-2 Inativada	2,29	-0,104	21,25	18,568	-0,005601034	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
109-3 Inativada	2,302	-0,092	15,12	12,438	-0,007396688	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
Ctrl Positivo	3,596	1,202	6,05	3,368	0,356888361	-0,44746762	1,393864	24,766484

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 25 - Resultados e análises básicas das amostras da bateria 3

Amostra	FL (RFU)	Δ FL	R (RFU)	Δ R	Δ FL/ Δ R	$\log[\Delta$ FL/ Δ R]	$\log$ [TPG]	TPG
17-1	0,9909	0,444	15,21	13,277	0,033441289	-1,475716985	-0,404125179	0,394343622
17-2	0,6333	0,086	16,66	14,727	0,005866775	-2,231600544	-0,014240439	0,967741935
17-3	0,6114	0,065	17,61	15,677	0,004114308	-2,385703244	0,065245733	1,162105972
17-1 Inativada	0,6634	0,117	16,83	14,897	0,007820367	-2,106772892	-0,078626542	0,834398391
17-2 Inativada	0,8785	0,332	16,20	14,267	0,023242448	-1,633718139	-0,322628184	0,475742353
17-3 Inativada	1,0360	0,489	15,9	14,007	0,034918255	-1,456947466	-0,413806497	0,385650148
27-1	0,5569	0,010	14,18	12,247	0,000816526	-3,088029718	0,427505728	2,676120892
27-2	0,7231	0,176	14,79	12,857	0,013704597	-1,86313374	-0,204295617	0,624747293
27-3	0,6766	0,130	15,36	13,427	0,009659641	-2,015039013	-0,125942877	0,748267914
27-1 Inativada	1,1030	0,556	15,8	13,907	0,039987057	-1,39808056	-0,444170047	0,359608503
27-2 Inativada	1,0520	0,505	16,10	14,167	0,035653279	-1,447900525	-0,418472909	0,381528593
27-3 Inativada	1,0780	0,531	15,52	13,587	0,039088835	-1,407947274	-0,439080796	0,36384734
51-1	0,5069	-0,040	15,07	13,137	-0,003044835	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
51-2	0,6499	0,103	15,57	13,637	0,007552981	-2,121881616	-0,070833463	0,84950617
51-3	0,5990	0,052	14,37	12,437	0,004189113	-2,377877911	0,061209427	1,151355464
51-1 Inativada	0,6341	0,087	15,38	13,447	0,006484718	-2,18810892	-0,036673419	0,919023424
51-2 Inativada	0,5537	0,007	14,25	12,317	0,000552082	-3,257996029	0,515174352	3,274721353
51-3 Inativada	0,7817	0,235	14,73	12,797	0,01834805	-1,736410077	-0,269659682	0,537452785
75-1	0,6754	0,129	15,14	13,207	0,009729689	-2,01190105	-0,127561438	0,745484403
75-2	0,6336	0,087	15,09	13,157	0,006589648	-2,181137777	-0,040269135	0,911445837
75-3	0,5586	0,012	16,37	14,437	0,000810418	-3,091291095	0,429187947	2,686506815

75-1 Inativada	1,0080	0,461	15,0	13,097	0,035206536	-1,453376705	-0,415648295	0,384018109
75-2 Inativada	0,8031	0,256	14,41	12,477	0,020533782	-1,68753105	-0,294871485	0,507140758
75-3 Inativada	1,4340	0,887	15,60	13,667	0,064908173	-1,187700615	-0,552684023	0,28010185
87-1	0,6869	0,140	15,41	13,477	0,010388069	-1,983465193	-0,142228654	0,72072792
87-2	0,5992	0,052	15,71	13,777	0,003796182	-2,42065297	0,083272802	1,211358809
87-3	0,6247	0,078	16,60	14,667	0,005304425	-2,275361695	0,008331562	1,019369329
87-1 Inativada	1,1370	0,590	16,71	14,777	0,039933681	-1,398660659	-0,443870832	0,359856348
87-2 Inativada	0,8383	0,291	14,26	12,327	0,023639166	-1,626367849	-0,326419464	0,471607319
87-3 Inativada	0,6165	0,070	16,30	14,367	0,004844435	-2,314756852	0,028651584	1,068197567
99-1	0,7912	0,244	16,40	14,467	0,016886708	-1,772455014	-0,251067704	0,560960519
99-2	0,7030	0,156	15,15	13,217	0,011810547	-1,927729987	-0,170976873	0,674563949
99-3	0,5740	0,027	17,67	15,737	0,001722056	-2,763952654	0,260346779	1,821154448
99-1 Inativada	0,6443	0,097	16,41	14,477	0,006727913	-2,172119618	-0,044920701	0,901735772
99-2 Inativada	0,5624	0,016	15,48	13,547	0,001144165	-2,941511433	0,351931597	2,248700399
99-3 Inativada	0,7244	0,178	16,41	14,477	0,012260828	-1,911480217	-0,179358504	0,661670079
109-1	0,6688	0,122	15,17	13,237	0,009209035	-2,035785863	-0,115241652	0,76693463
109-2	0,6267	0,080	14,5	12,517	0,00637533	-2,195497361	-0,032862461	0,927123392
109-3	0,7681	0,221	15,51	13,577	0,016292259	-1,788018695	-0,243039957	0,571426061
109-1 Inativada	0,5925	0,046	16,14	14,207	0,003209685	-2,493537538	0,120866662	1,320890029
109-2 Inativada	0,5103	-0,037	12,16	10,227	-0,003578762	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
109-3 Inativada	0,4647	-0,082	14,36	12,427	-0,006614629	#NÚM!	#NÚM!	#NÚM!
Ctrl Positivo	3,8940	3,347	12,60	10,667	0,313780819	-0,503373607	-0,905659893	0,124262506
Ctrl Positivo Inativado	1,1400	0,593	15,27	13,337	0,044470271	-1,351930227	-0,467974389	0,340428265

Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras com resultado #NÚM! apresentaram um valor de fluorescência inferior ao valor de fluorescência de TSR8 4, ou seja, sua atividade estaria inferior à mínima aceitável nesse experimento, indicando não haver atividade significativa de telomerase naquela amostra. Os dados apresentados no penúltimo campo (TPG) das Tabelas 23, 24, 25 e 26 são os resultados da atividade de telomerase.