



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO**

DCA

1ª REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE 2018

Data: 06 de fevereiro de 2018 (Terça-feira)

Horário: 15:45min às 17h30min

Local: CENTRAL DE AULAS I (SALA 07)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIARIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS – DCA

CONVOCAÇÃO

O Chefe do Departamento de Ciências Animais (DCA) **CONVOCA** os professores, os representantes estudantis, o representante técnico-administrativo e demais convidados relacionados na lista anexa, a se fazerem presentes na **1ª Reunião Extraordinária de 2018 do DCA**, com data, local e horário abaixo determinados para cumprir a seguinte pauta:

1. Aprovação da ata da **1ª Reunião Extraordinária de 2017 do DCA**;
2. Aprovação da ata da **2ª Reunião Extraordinária de 2017 do DCA**;
3. Deliberação e aprovação dos seguintes projetos de pesquisa:
 - a. *Análises de Abelhas Africanizadas mortas em apiários comerciais por agrotóxicos* – Prof. Kátia Peres Gramacho;
 - b. *Formação e Manutenção do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Morada Nova, Variedade branca* – Prof. Débora Andréa Evangelista Façanha;
 - c. *Pesquisa de novos agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas em cadelas e gatas* – João Marcelo Azevedo de Paula Antunes;
 - d. *Inovação e redução de custos na tecnologia de produção in vitro de embriões de bovinos criados no semiárido* – Marcelo Barbosa Bezerra;
 - e. *Implantação acadêmica do Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão (PSF CAMARÃO) na UFERSA, através do modelo de Base Acadêmica Avançada.* – Pedro Carlos Cunha Martins;
4. Deliberação e aprovação do seguinte projeto de extensão;

- a. *Pontes de Mediação: A relação entre a unidade e a singularidade.* – Prof. José Albenes de Bezerra Júnior (CCSAH/ Departamento de Ciências Sociais e Aplicadas);

Data: 06 de fevereiro de 2017 (Terça-feira)

Local: Central de Aulas I (SALA 07)

Horário: 15h45min

Mossoró-RN, 02 de fevereiro de 2018.

Ivanilson de Souza Maia

Chefe do Departamento de Ciências Animais (DCA)



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
1ª Reunião Extraordinária de 2018

1. Aprovação da ata da **1ª Reunião Extraordinária de 2017 do DCA;**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DA PRIMEIRA REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE DOIS MIL E DEZESSETE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

1 No vigésimo oitavo dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezessete, às quatorze
2 horas e trinta minutos, no auditório do Departamento de Ciências Exatas e Naturais, foi
3 realizada a primeira reunião extraordinária de dois mil e dezessete do Departamento de
4 Ciências Animais. Estiveram presentes os seguintes membros: **José Torres Filho** (Diretor
5 do centro), **Genilson Fernandes de Queiroz**, **Guelson Batista da Silva**, **Ivanilson de**
6 **Souza Maia**, **Kátia Peres Gramacho**, **Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis**,
7 **Marcelo Augusto Bezerra**, **Raimundo Alves Barreto**, **Sthênia dos Santos Albano**
8 **Amora**, **Valéria Veras de Paula** e **Wirton Peixoto Costa**. Justificaram ausência os
9 docentes **Alex Augusto Gonçalves**, **Alexandre Rodrigues Silva**, **Carlos Campos**
10 **Câmara**, **Carlos Eduardo Bezerra de Moura**, **Jean Berg Alves da Silva**, **Josemir**, de
11 **Souza Gonçalves**, **Marcelo Barbosa bezerra**, **Marcelo José Pedrosa Pinheiro**,
12 **Marcelo Tavares Gurgel**, **Michelly Fernandes de Macedo** e **Regina Valéria da Cunha**
13 **Dias**. O diretor do CCA, **José Torres Filho**, declarou aberta a reunião e foi realizada a
14 leitura da pauta descrita a seguir: **Primeiro ponto**. Realização de Ato de Posse do Chefe
15 e Vice-chefe do Departamento de Ciências Animais do Centro de Ciências Agrárias do
16 Campus sede da UFERSA, conforme PORTARIA UFERSA/CCA Nº 070/2017, de 21 de
17 setembro de 2017. O diretor do CCA, **José Torres Filho**, destacou a importância do cargo
18 de chefe de departamento, parabenizou o professor Ivanilson de Souza Maia e passou a
19 fala para o referido docente. O professor **Ivanilson de Souza Maia** agradeceu o voto e a
20 confiança dos docentes, destacou a relevância da colaboração de todos para atravessar
21 essa fase de transição e mudança pelo qual as estruturas da UFERSA vêm passando. Ele
22 afirmou também que pretende conversar com os docentes do departamento e fazer uma
23 gestão democrática e participativa. Logo após, o diretor do Centro, José Torres assinou o
24 termo de posse, e em seguida, assinaram o termo professor Ivanilson de Souza Maia,
25 chefe do Departamento de Ciências Animais, e a professora Kátia Peres Gramacho, vice-
26 chefe do Departamento de Ciências Animais. Não havendo mais comentários, o diretor do



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
1ª Reunião Extraordinária de 2018

2. Aprovação da ata da **2ª Reunião Extraordinária de 2017 do DCA;**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Departamento de Ciências Animais

ATA DA SEGUNDA REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE DOIS MIL E DEZESSETE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

1 No décimo sétimo dia do mês de outubro do ano de dois mil e dezessete, às quinze horas
2 e trinta minutos, no prédio da CENTRAL DE AULAS I (Lado Oeste), foi realizada a
3 segunda reunião extraordinária de dois mil e dezessete do Departamento de Ciências
4 Animais (DCA). Estiveram presentes os seguintes membros: **Ivanilson de Souza Maia**
5 (Chefe do departamento), **Katia Peres Gramacho** (Vice-chefe do departamento),
6 **Alexandre Rodrigues da Silva**, **Ambrósio Paula Bessa Júnior**, **Felipe de Azevedo**
7 **Silva Ribeiro**, **Genilson Fernandes de Queiroz**, **Guelson Batista da Silva**, **Jesane**
8 **Alves de Lucena**, **José Ernandes Rufino de Sousa**, **Josemir de Souza Gonçalves**,
9 **Marcelle Santana de Araújo**, **Marcelo Augusto Bezerra**, **Michelly Fernandes de**
10 **Macedo**, **Patrícia de Oliveira Lima**, **Raimundo Alves Barreto Júnior**, **Raquel Lima**
11 **Salgado**, **Regina Valéria da Cunha Dias**, **Sthenia dos Santos Albano Amora**, **Valéria**
12 **Veras de Paula** e **Wirton Peixoto Costa**. Justificaram ausência os docentes **Carlos**
13 **Eduardo Bezerra de Moura** e **Moacir Franco de Oliveira**. O chefe do DCA, **Ivanilson**
14 **de Souza Maia**, salientou a necessidade de melhorias para o departamento e pediu a
15 ajuda e participação de todos os professores, e, com isso, declarou aberta a reunião com
16 a leitura da pauta descrita a seguir: **Primeiro ponto. Aprovação da ata da 1ª Reunião**
17 **Extraordinária de 2017 do DCA**; a professora **Valéria Veras de Paula** questionou a
18 origem da ata, no que diz respeito se a mesma pertencia ao Centro CCA ou ao
19 Departamento, no entanto o professor **Ivanilson de Souza Maia** ressaltou contrassensos
20 no regulamento do CONSUNI, que não deixa claro se o registro da posse dos chefes de
21 departamento se dá através de ata do Centro ou do departamento. O professor
22 **Alexandre Rodrigues da Silva** fez encaminhamento para avaliação da ata por email para
23 uma maior análise. O primeiro ponto foi retirado por unanimidade. **Segundo Ponto.**
24 **Escolha de representante do departamento no Conselho de Centro**; a professora
25 **Raquel Lima Salgado** defendeu que o chefe do departamento deveria representar o



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Departamento de Ciências Animais

ATA DA SEGUNDA REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE DOIS MIL E DEZESSETE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

26 mesmo no Conselho de Centro, pelo fato do membro ter sido eleito por votos. O professor
27 **Ivanilson de Souza Maia** sugeriu que outro professor poderia ocupar o mesmo, caso se
28 interessasse. O professor **Wirton Peixoto Costa** defendeu que deveria haver um
29 representante e um suplente, com base em uma lacuna no regimento da UFERSA. Foi
30 encaminhado e aprovado que o chefe e o vice-chefe do Departamento de Ciências
31 Animais, o professor **Ivanilson de Souza Maia** e **Katia Peres Gramacho**,
32 respectivamente, iriam representar o mesmo no Conselho de Centro do CCA. Não
33 havendo mais comentários, o chefe do departamento, professor **Ivanilson de Souza Maia**
34 agradeceu a presença dos membros presentes e deu por encerrada a reunião. E eu,
35 **Leonardo Mickael do Vale Vasconcelos**, secretário do DCA, lavrei a presente ata que
36 será assinada por mim e demais membros quando aprovada.

37 XXX.

38 **Chefe do departamento:**

39 *Ivanilson de Souza Maia* _____

40 **Membros Presentes:**

41 *Alexandre Rodrigues da Silva* _____

42 *Ambrósio Paula Bessa Júnior* _____

43 *Felipe de Azevedo Silva Ribeiro* _____

44 *Genilson Fernandes de Queiroz* _____

45 *Guelson Batista da Silva* _____

46 *Jesane Alves de Lucena* _____

47 *José Ernandes Rufino de Sousa* _____

48 *Josemir de Souza Gonçalves* _____

49 *Marcelle Santana de Araújo* _____

50 *Marcelo Augusto Bezerra* _____



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Departamento de Ciências Animais

**ATA DA SEGUNDA REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE DOIS MIL E
DEZESSETE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS**

- 51 *Michelly Fernandes de Macedo* _____
- 52 *Patrícia de Oliveira Lima* _____
- 53 *Raimundo Alves Barreto Júnior* _____
- 54 *Raquel Lima Salgado* _____
- 55 *Regina Valéria da Cunha Dias* _____
- 56 *Sthenia dos Santos Albano Amora* _____
- 57 *Valéria Veras de Paula* _____
- 58 *Wilton Peixoto Costa* _____
- 59 **Secretário:**
- 60 Leonardo Mickael do Vale Vasconcelos _____



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
1ª Reunião Extraordinária de 2018

3. Deliberação e aprovação dos seguintes projetos de pesquisa:
- a. *Análises de Abelhas Africanizadas mortas em apiários comerciais por agrotóxicos* – Prof. Kátia Peres Gramacho;
 - b. *Formação e Manutenção do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Morada Nova, Variedade branca* – Prof. Débora Andréa Evangelista Façanha;
 - c. *Pesquisa de novos agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas em cadelas e gatas* – João Marcelo Azevedo de Paula Antunes;
 - d. *Inovação e redução de custos na tecnologia de produção in vitro de embriões de bovinos criados no semiárido* – Marcelo Barbosa Bezerra;
 - e. *Implantação acadêmica do Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão (PSF CAMARÃO) na UFERSA, através do modelo de Base Acadêmica Avançada.* – Pedro Carlos Cunha Martins;

Projeto de pesquisa:

ANALISES DE ABELHAS AFRICANIZADAS MORTAS EM APIÁRIOS COMERCIAIS POR AGROTÓXICOS

Valor £ 12.000,00 (doze mil libras esterlina)

Financiado por:

Fundação Eva Crane Trust Northumberland Buildings, 5-6 Queen Square, Bath BA1 2JE, Reino Unido

PARTICIPANTES:

CPF	PARTICIPANTE	CARGO	HORAS FUNÇÃO
210.451.430-49	DAYSON CASTILHOS	DISCENTE	20 Membro
487.114.706-15	GENEVILE CARIFE BERGAMO	DOCENTE	4 Membro
419.749.991-49	JEFERSON LUIZ DALLABONA DOMBROSKI	DOCENTE	8 Membro
023.835.948-49	LIONEL SEGUI GONCALVES	DOCENTE	4 Membro
422.743.205-78	KATIA PERES GRAMACHO	DOCENTE	10 Coordenador

I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dois dos maiores problemas atuais da apicultura são, sem dúvida, a morte em massa e o desaparecimento ou *CCD* (*Colony Collapse Disorder*=distúrbio do colapso das colônias) das abelhas, que vêm causando a diminuição da população mundial das espécies (GILL *et al.*, 2012; GONÇALVES, 2012 a, b). Esses fenômenos vêm acontecendo simultaneamente em vários países, com uma única exceção da Austrália, onde não têm sido observados (ENTINE, 2013; MORTON, 2014), mas são motivos de grande preocupação pelas autoridades e cientistas do mundo inteiro (KRUPKE *et al.*, 2012; PHILLIPS, 2015). Os sintomas da CCD são: a rápida perda de abelhas operárias, evidenciada pelo enfraquecimento ou morte da colônia com excesso de crias, em comparação ao número de abelhas adultas; ausência de crias e abelhas adultas mortas dentro ou fora da colmeia; e ausência de invasão imediata da colmeia por pragas como, por exemplo, traças (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Há muitas dúvidas sobre os principais fatores ao CCD como estresses causados por patógenos, as mudanças climáticas, manejo inadequado das colônias, má nutrição e a combinação entre estes fatores (STOKSTAD, 2007, vanEngelsdorp *et al.*, 2009), e mais enfaticamente tem sido apontado os agrotóxicos utilizados indiscriminadamente na agricultura como causa do CCD e da mortandade em massa das abelhas (SANCHEZ-BAYO, 2014).

Pesticidas são altamente tóxicos para as abelhas e demais polinizadores. No Brasil seu uso é crescente, e confere ao país o título de campeão mundial de consumo de agrotóxicos, em estatísticas que crescem todos os anos. Duas

categorias de pesticidas têm destaque nas ocorrências envolvendo o desaparecimento ou morte de abelhas: a nova classe de pesticidas sistêmicos de última geração, os neonicotinoides (também conhecidos como neonics), e o pesticida Fipronil. Os inseticidas sistêmicos neonicotinóides, disponibilizados comercialmente a partir de 1991 (KOLLMEYER *et al.*, 1999; TOMIZAWA; CASIDA, 2011; GOULSON, 2013) e o fipronil, inseticida sistêmico pertencente ao grupo químico dos pirazóis (PPDB, 2016; TINGLE *et al.* 2003) são altamente tóxicos e quando usados em plantações próximas a apiários causam a morte e desordens comportamentais nas abelhas (HENRY *et al.*, 2012 a, b; LU *et al.*, 2014).

Devido aos casos crescente de perdas de colmeias no mundo (POTTS *et al.*, 2010 a e inclusive no Brasil, (GONÇALVES, 2012 a, b), foi lançada em 2013, na UFRSA - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, pelo CETAPIS-RN – Centro Tecnológico de Apicultura e Meliponicultura do Rio Grande do Norte, uma campanha de proteção às abelhas, *BEE OR NOT TO BE*, que se tornou internacional ao ser lançada também no 43th *International Apicultural Congress – APIMONDIA* 2013, em Kiev, na Ucrânia.

Esta campanha tem como objetivos conscientizar a população sobre a importância das abelhas para o homem e o meio ambiente; mobilizar as lideranças do país para uma atitude imediata de apoio às ações que investiguem, identifiquem e combatam as causas do desaparecimento (CCD) e morte das abelhas; lançar um documento formal de apoio à causa das abelhas, o Manifesto em Favor à Proteção às Abelhas, que pode ser assinado no *website* <<http://www.semabelhasemalimento.com.br>>; posicionar a apicultura e a meliponicultura como um elo fundamental na cadeia produtiva agrícola, repercutindo a idéia de que a aplicação dos conceitos de sustentabilidade no campo deveria passar pelo respeito aos seus principais polinizadores, as abelhas; levar conceitos propositivos de como o apicultor, meliponicultor, pesquisador ou cidadão pode ajudar a proteger as abelhas (GONÇALVES; CASTILHOS, 2015). Ao atingir 23 mil assinaturas, em 2014, o manifesto foi entregue ao MMA - Ministério do Meio Ambiente e ao IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (GONÇALVES, 2015).

Uso do aplicativo Bee Alert bem como analisar a ocorrência de morte em massa de abelhas e CCD por pesticidas neonicotinoides e fipronil no Brasil, registrados por participantes colaboradores interessados em preservar esses insetos e o meio, tornou-se tema de tese de doutorado do discente Dayson Castilhos e Orientação do Prof. Dr. Lionel Gonçalves pelo programa de pós graduação em Ciência Animal da UFRSA e objetivo geral deste projeto. E o objetivo específico deste projeto e da tese é identificar e medir, através de cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa (UHPLC-MS / MS), a contaminação de abelhas mortas coletadas durante visitas de campo a locais de ocorrência.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar a ocorrência de morte em massa de abelhas e CCD por pesticidas neonicotinoides e fipronil no Brasil, registrados por participantes colaboradores interessados em preservar esses insetos e o meio ambiente.

Objetivo específico

Identificar e medir, através de cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa (UHPLC-MS / MS), a contaminação de abelhas mortas coletadas durante visitas de campo a locais de ocorrência

III. MATERIAL E METODOS

As amostras de abelhas mortas com suspeita de contaminação por agrotóxicos foram coletadas durante visitas aos apiários que apresentaram sintomas de contaminação. Esses sintomas eram mortes massivas no interior da colmeia e no chão, abaixo do alvado e colônias que apresentavam redução drástica na população. Nas mesmas oportunidades em que foram feitas visitas para coletas de abelhas contaminadas também foram coletadas igual quantidade de abelhas sadias em colmeias que não apresentavam sintomas de contaminação.

As amostras foram separadas em três categorias de colônias: mortas, redução e controle. A primeira categoria remete à morte massiva de colônias, a segunda categoria remete à suspeitas de ter morrido de transtorno do colapso da colônia (CCD) e a terceira categoria representa as colônias de abelhas sadias, sem aparente sintoma de contaminação por agrotóxicos.

Aproximadamente 200 abelhas por amostra em cada categoria foram coletadas para análises químicas de resíduos de agrotóxicos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Ecophysologia de Plantas do Departamento de Ciências Vegetais da UFERSA utilizando o método QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003), modificado por David et al. (2015) e Botías et al. (2015, 2016, 2017).

As análises estão sendo realizadas utilizando cromatografia líquida de alta performance (NEXERA X2 - Shimadzu) combinada com espectrometria de massa em tandem (LCMS-8040 - Shimadzu), equipada com espectrômetro quadrupolo triplo e de massa dupla.

Foram coletadas trinta e sete amostras de abelhas suspeitas de contaminação por pesticidas durante as visitas aos apiários. Os sintomas foram: morte maciça dentro das colméias, no chão abaixo da entrada e colônias que apresentaram redução drástica na população com sintomas de CCD.

A identificação dos pesticidas extraídos foi conseguida comparando o espectro de massa entre os íons e os padrões dos pesticidas utilizados, de identidade conhecida em uma corrida de 26 minutos.

Identificação dos resíduos extraídos foram conseguidos através da comparação de espectro de massa de razões entre íons com os padrões de 9 dos agrotóxicos mais utilizados e seus metabolitos, de identidade conhecida. Os limites de detecção foram inferiores aos níveis partes por bilhão (ppb).

Os pesticidas identificados na análise foram sete neonicotinoides (acetamiprid, clothianidin, dinotefurano, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid, thiamethoxam) e fenilpirazol (fipronil).

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Analytical Chemists International**, v. 86, n. 2, p. 412-431. 2003. Disponível em: <[http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%201999-2003/J.AOAC2003/v86n2p\(mar-apr\)/v86n2p412.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC%201999-2003/J.AOAC2003/v86n2p(mar-apr)/v86n2p412.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

BOTÍAS, C.; DAVID, A.; HILL, E.; GOULSON, D. Contamination of wild plants near neonicotinoid seedtreated crops, and implications for non-target insects. **Science of the total environment**, v. 566-567, n. 6, p. 269-278. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716309950>>. Acesso em: 27 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.065.

DAVID, A.; BOTÍAS, C.; ABDUL-SADA, A.; GOULSON, D. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 26, p. 8151-8162. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26329280>>. Acesso em: 27 abr. 2017. DOI: 10.1007/s00216-015-8986-6.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUES, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108. 2012. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v491/n7422/pdf/nature11585.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2015. DOI: 10.1038/nature11585.

ENTINE, J. Science Collapse Disorder – The real story behind neonics and mass bee deaths. **Forbes**, Abr. 11, 2013. Disponível em: <<http://onforb.es/10Xh5ll>>. Acesso em: 30 mar. 2015.

GONÇALVES, L. S. O Desaparecimento das abelhas, suas causas, consequências e o risco dos Neonicotinóides para o Agronegócio. **Mensagem Doce**, n. 117, p. 2-12. 2012 a. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/117/artigo1.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

GONÇALVES, L. S. Consequências do Desaparecimento (CCD) das Abelhas no Agronegócio Apícola Internacional e em especial no Brasil. **Anais do X Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto** (em CD), p. 24-25. 2012 b.

GONÇALVES, L. S. O Desaparecimento das abelhas, suas causas, consequências e o risco dos Neonicotinóides para o Agronegócio. **Mensagem Doce**, n. 117, p. 2-12. 2012 a. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/117/artigo1.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

GONÇALVES, L. S.; CASTILHOS, D. Application of the electronic device "BEE ALERT" for registering death of honey bees, stingless bees in general and disappearance of honey bees (CCD) in Brazil. In: INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS, 44. 2015. Daejeon, Korea. Scientific Program Abstracts. **Annals of...** Daejeon: Apimondia, p. 218. 2015.

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977-987. 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.12111/epdf>>. Acesso em 12 set. 2014. DOI: 10:1111/1365-2664.12111.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J-F.; AUPINEL, P.; APTERL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348-350. 2012 a. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/336/6079/348.full>>. Acesso em: 06 out. 2014. DOI: 10.1126/science.1215039.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J-F.; AUPINEL, P.; APTERL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. Response to comment on "A common pesticide decreases foraging success and survival in honey

bees". **Science**, p. 337, n. 6101, p. 1453. 2012 b. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/sci/337/6101/1453.3.full.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2016. DOI: 10.1126/science.1224930.

KOLLMAYER, W. D.; FLATTUM, R. F.; FOSTER, J. P.; POWELL, J. E.; SCHROEDER, M. E.; SOLOWAY, S. B. Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. In: Yamamoto, I. & Casida, J. **Nicotinoid insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor**. Tokio: Springer, 1999. p. 71-89. 300 p. DOI: 10.1007/978-4-431-67933-2.

KRUPKE, C. H.; HUNT, G. J.; EITZER, B. D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, e29268, p. 1-8. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0029268&representation=PDF>>. Acesso em: 15 set. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0029268.

LU, C.; WARCHOL, K. M.; CALLAHAN, R. A. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honeybees winterization before proceeding to colony collapse disorder. **Bulletin of Insectology**, v. 67, n. 1, p. 125-130. 2014. Disponível em: <<http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol67-2014-125-130lu.pdf>>. Acesso em 17 mar. 2015.

MORTON, J. The bees' knees. **Green Lifestyle**, 23 October 2014. Disponível em: <<http://www.greenlifestylemag.com.au/features/20238/bees-knees>>. Acesso em: 15 set. 2015.

PHILLIPS, N. Australian scientists may have solved the mystery of bee colony collapse. **The Sunday Morning Herald**. Feb. 10, 2015. Disponível em: <<http://www.smh.com.au/technology/sci-tech/australian-scientists-may-have-solved-the-mystery-of-bee-colony-collapse-20150210-13a6ss.html>>. Acesso em 15 set. 2015.

POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M. A.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 15-22, 2010 b. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3896/IBRA.1.49.1.02>>. Acesso em: 15 ago. 2015. DOI: 10.3896/ibra.1.49.1.02.

PPDB – PESTICIDES PROPERTIES DATABASE. Online version 7.0. Hatfield, Herts, UK: University of Hertfordshire, 2016. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>>. Acesso em 20 mar. 2016.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees: a risk assessment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1-16. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094482>>. Acesso em: 22 dez. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0094482.

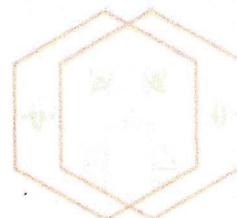
STOKSTAD, E. Entomology: the case of the empty hives. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 970-972. 2007. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/316/5827/970.short?cited-by=yes&legid=sci;316/5827/970>>. Acesso em: 03 out. 2015. DOI: 10.1126/science.316.5827. 970.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66. 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/11025121_Fipronil_Environmental_Fate_Ecotoxicology_and_Human_Health_Concerns>. Acesso em 18 dez. 2015. DOI: 10.1007/978-1-4899-7283-5_1.

TOMIZAWA, M.; CASIDA J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 247-268. 2005. Disponível em: <http://de.institut-fuer-bienenkunde.de/Data/Sites/17/tomizawaannrev_pharmtoxicol-2005.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2015. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.1204.03.095930.

VANENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A survey of honeybee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, e4701, p. 1-6. 2008. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0004071&representation=PDF>>. Acesso em: 20 out. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0004071.

GRANT AGREEMENT
Eva Crane Trust



Eva Crane Trust

DATED:- April 2017

BETWEEN:-

- (1) Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Centro de Ciências Agrarias-CCA, Av. Francisco Mota, nº 572, Km 47, BR 110, Costa e Silva. Mossoró, Rio Grande do Norte, 59.625-900, (the "**University**") acting through **Prof Dr Katia Peres Gramacho** of this establishment.

and

- (2) **EVA CRANE TRUST** of c/o Royd Withy King Solicitors, 5-6 Northumberland, Buildings, Queens Square, Bath, BA1 2JE (the "**Donor**") of the other part and hereinafter individually referred to as "Party" and collectively referred to as "Parties".

WHEREAS:-

- (1) The University has power under the University's Charter and Statutes to receive gifts including those subject to specific trusts or conditions and to act as trustee in relation to any such gifts.
- (2) The Donor has transferred or agreed to transfer the funds specified in the Schedule to the University to be held by the University on the trusts declared in this gift.

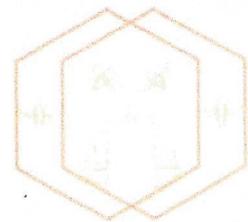
IT IS AGREED as follows:-

1. **ADMINISTRATION**

The charitable support constituted by this gift (the "**Fund**") shall be administered and managed by the University.

2. **GIFT**

The Donor will transfer the gift of £10,000 in 2017 and £2,000 in 2018 to the University in accordance with the grant application.



Eva Crane Trust

3. **OBJECTS**

The University shall hold the gift and its income upon trust to apply them for the following objects (the "**Objects**"):-

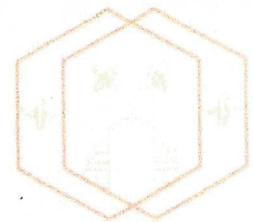
To supply UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Vegetable Ecophysiology LAB, with consumables in order to offer Bees' Toxicological Contamination Analyses to Apicultural activity nationwide as specified in the grant application ECTA_20170301_Gremacho

4. **UNIVERSITY OBLIGATIONS**

- 4.1 The University accepts donations on the clear understanding that the Donor can have no influence over the academic freedom and independence of The University.
- 4.2 The University will provide a brief report to the Donor at the end of 2017. This will show how Prof Gramacho has benefited from the grant and will be published on the Donor's website (www.evacranetrust.org/category/case-studies).
- 4.3 The University shall prominently acknowledge the generosity of the Donor in relevant academic / University online and printed publications. A logo will be supplied to aid this process.
- 4.4 The Donor will make no claim to either research results or any potential intellectual property that may arise from this gift.

5. **AMENDMENT OF TRUST DEED**

- 5.1 The University must inform the Trustees of any amendments they may wish to impose over the duration of the project. Any changes must be with the agreement of the Trustees.



Eva Crane Trust

EXECUTED AS A GIFT by the parties on the date which first appears in this Declaration of Trust.

<p>SIGNED by Prof Dr Katia Peres Gramacho</p> <p>For and on behalf of Universidade Federal Rural do Semi-Árido</p>	<p><i>[Handwritten signature]</i></p> <p>1º OFÍCIO</p>
<p>SIGNED by RICHARD JONES</p> <p>For and on behalf of the EVA CRANE TRUST</p>	<p><i>[Handwritten signature]</i></p>

Edimar Vieira de Almeida
Taboão
Elidimar de Moura Vieira
Erika de Moura Vieira
Jailson Almeida
Rua Cel. Vicente Sabido, 167, Centro - CEP: 59200-120
Mossoró/RN, 31 de mar de 2017.

Carlório Vieira

Reconhecido por AUTENTICIDADE a firma de KATIA PERES GRAMACHO. Dou fé.

Erika de Moura Vieira

Selo de Autenticidade
Mossoró/RN
Selo de Autenticidade
E-MAIL: *[illegible]*
R.N. 037337



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo

TERMO DE EXECUÇÃO DESCENTRALIZADA

1) UG / GESTÃO	UNIDADE REPASSADORA
<u>420013 /00001</u>	Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo

2) UG / GESTÃO	UNIDADE RECEBEDORA
<u>153033/15252</u>	Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA

3) DADOS CADASTRAIS					
UNIDADE RECEBEDORA					CNPJ
Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA					24.529.265/0001-40
ENDEREÇO COMERCIAL					
Avenida Francisco Mota, 572					
CIDADE	UF	CEP	E-MAIL	DDD(FONE)	DDD(FAX)
Mossoró	RN	59625-900	ufersa@ufersa.edu.br	84 33178200	84 33178200
NOME(S) DO(S) RESPONSÁVEL(EIS)					CPF
José de Arimatéa de Matos					188.805.334-87
CI/ÓRGÃO EXP.:		CARGO/FUNÇÃO		E-MAIL	
398291 – SSP/PB		Reitor		reitor@ufersa.edu.br	

4) DESCRIÇÃO DO ATENDIMENTO
IDENTIFICAÇÃO DO OBJETO

Promover a conservação da Raça ovina Morada Nova, variedade Branca, visando aumentar o seu efetivo, através da implantação e monitoramento de um Núcleo de Conservação *Ex Situ*, nas formas *In Vivo e In Vitro*, nas dependências do Núcleo de Geração e Transferência de Tecnologias no Semiárido (NUTESA), pertencente à Universidade Federal Rural do Semiárido. Paralelamente serão colhidas informações nos demais rebanhos identificados como sendo compostos por animais puros da referida variedade, com a finalidade de verificar a variabilidade genética intra-racial, fundamental para viabilizar a implantação do núcleo de conservação, ampliando o uso sustentável deste recurso genético animal e minimizando os riscos de sua descaracterização ou extinção.

JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO

O reflexo do aquecimento global sobre a produção animal é real e cada vez mais acelerado. Esse presente cenário climático vem influenciando a produtividade da maioria dos animais domésticos, principalmente os que são sensíveis ao ambiente com elevada temperatura e níveis de radiação solar. Tais características são facilmente encontradas nas regiões tropicais durante todos os meses do ano. Scholtz et al. (2013) relataram que os países do hemisfério sul sofrerão com mais intensidade essas consequências que os países do hemisfério norte, haja visto que os animais situados na primeira

localização terão que se adaptar a temperaturas mais elevadas, baixo valor nutricional de gramíneas e aumento da ocorrência de parasitos e doenças. Diante deste panorama, a seleção dos animais e dos genótipos melhor adaptados aos sistemas de produção predominantes nas zonas áridas e semiáridas deve ser adotada para garantir a produção sustentável em climas mais quentes, exigindo também estratégias inovadoras de manejo e reprodução.

O uso de recursos genéticos animais localmente adaptados é indispensável para a futura produção de alimentos. Pelo fato de apresentarem genes únicos ligados a sua sobrevivência no ambiente com condições climáticas severas, a conservação das raças localmente adaptadas é cada vez mais importante, que uma vez geneticamente caracterizadas, serão de fundamental importância para a segurança alimentar pela resistência aos parasitos e doenças (Mariane et al., 2005). No Brasil, as espécies de interesse zootécnico foram trazidas de ambiente temperado pelos colonizadores. Esses animais foram expostos a condições ambientais e de alimentação muito diferentes daquelas encontradas em seus países de origem, refletindo em queda na produtividade. Com o passar dos anos, algumas raças passaram por seleção natural e originaram as conhecidas raças naturalizadas.

A ovinocultura representa uma importante atividade pecuária, principalmente no nordeste do Brasil, principalmente devido ao curto ciclo reprodutivo e baixo custo de produção. O efetivo do rebanho ovino nacional é de 17 milhões de cabeças (IBGE 2013), dos quais 60% desses animais encontram-se na região nordeste. Entretanto, não há informações precisas de quanto desses animais correspondem às raças nativas ou exóticas. Sabe-se apenas que os grupos localmente adaptados estão sob fortes ameaças de extinção, causadas principalmente pelos cruzamentos desordenados que utilizam raças oriundas de clima temperado como alternativa de aumento da produtividade dos rebanhos.

Dentro desse contexto, a raça Morada Nova, que é a única de ovinos nativos do nordeste brasileiro merece um grande destaque. Apesar da grande importância econômica e social para a região, como fonte de proteína de baixo custo, baixo requerimento nutricional para manutenção, elevada prolificidade e eficiência reprodutiva durante todo o ano (Facó et al., 2008), esses animais têm sido pouco valorizados, principalmente devido ao seu pequeno porte. Isso foi interpretado por muitos anos como uma característica desfavorável e diversos cruzamentos indiscriminados foram realizados com raças de portes maiores, resultando na redução brusca do efetivo populacional. Essa medida, geralmente adotada com o objetivo de melhorar os índices produtivos dos rebanhos, representa uma forte ameaça para as raças locais, levando a redução da variabilidade genética, mudanças na estrutura da população e perda de genes únicos desenvolvidos no processo adaptativo ao longo dos anos (Rodrigues et al., 2009). Com a finalidade de evitar o desaparecimento desse importante material genético, a Embrapa caprinos e ovinos desenvolveu o projeto intitulado “Conservação e melhoramento da raça Morada Nova”. O

referido projeto contou com o apoio de várias instituições de pesquisa, UFERSA, UFPB, UECE, UVA, CENARGEN, etc, todas em busca de soluções e alternativas para maximizar o uso desse importante recurso genético. Neste contexto, a EMBRAPA Caprinos e Ovinos e a UFERSA há oito anos trabalham em parceria conduzindo ações importantes para a conservação da raça ovina Morada Nova e uma das vantagens desta parceria é a otimização de recursos e habilidades técnicas, além de geograficamente a UFERSA se encontrar próxima ao município de Morada Nova, local de origem da raça e onde se concentra o maior número de rebanhos da raça.

Existem duas variedades de ovinos da raça Morada Nova, a branca e a vermelha, reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). No entanto, várias pesquisas vêm sendo conduzidas e favorecendo os animais da variedade vermelha, que aumentou consideravelmente seu efetivo populacional (Arco 2014). Poucos criadores adotam a variedade branca, sob a justificativa de que esses animais são menos adaptados ao calor do semiárido e menos resistentes aos altos níveis de radiação. No entanto, em trabalho conduzido sob as mesmas condições de semiárido, comparando as duas variedades, Costa et al., (2015) demonstraram não haver inferioridade adaptativa da variedade branca em relação à vermelha. O mesmo trabalho confirmou o maior porte das ovelhas da variedade branca em relação às vermelhas, o que pode ser uma característica bastante interessante em sistemas de produção de carne. Observações a campo, através de visitas às propriedades, também evidenciaram que esses animais permanecem com um excelente estado corporal durante todas as épocas do ano, mesmo sob condições extensivas na caatinga. No entanto, essas informações precisam ser comprovadas através de dados científicos, e, talvez, essa carência de informações coletadas de forma precisa sobre o potencial produtivo da raça, seja um dos maiores entraves na sua adoção pelos produtores.

Atualmente há registro de apenas dois rebanhos comerciais, sendo um localizado em Quixeramobim – CE e outro localizado em Mojeiro – PB. Existem também três rebanhos na esfera governamental, que estão na Universidade do Vale do Acaraú, em Sobral - CE, Universidade Federal Rural do Semiárido, em Mossoró - RN, e na Fazenda Lavoura Seca, localizada em Quixadá – CE, pertencente à Universidade Federal do Ceará. Esses rebanhos contemplam poucos animais e existe sério risco de desaparecimento. Outro agravante é que não se sabe o número de núcleos formadores da variedade branca e a expectativa é que se trate de rebanhos com elevado grau de consanguinidade, o que diminui a variabilidade genética, fundamental em programas de seleção. Espera-se que os ovinos dessa variedade possam ser conservados a fim de serem utilizados como fonte de importantes genes para os programas de melhoramento, seja através de seleção ou até mesmo de cruzamentos com outras raças de corte. No entanto, a situação de risco em que a mesma se encontra requer ações emergenciais e um esforço conjunto de pesquisadores no sentido de reverter este quadro.

Diante do exposto, a formação de um Núcleo de Conservação da raça ovina Morada Nova, variedade branca é fundamental para a conservação da mesma, ao mesmo tempo em que possibilitará caracterizar sua rusticidade, adaptabilidade, resistência a enfermidades e produtividade, a fim de que essas informações sejam uma ferramenta de utilizadas para traçar estratégias de competitividade da raça, o que representará também no futuro um grande benefício para os produtores locais e para a sociedade.

Equipe da Universidade Federal Rural do Semiárido

- 1.1. Profa Dra Débora Andréa Evangelista Façanha (Curadora do Núcleo *Ex situ*)
Doutora em Zootecnia – Produção animal
Área de Atuação: Bioclimatologia e Conservação de Recursos Genéticos.
- 1.2. Prof. Dr. José Ernandes Rufino de Souza (Curador Adjunto do Núcleo *Ex situ*)
Doutor em Melhoramento Genético Animal
Área de Atuação: Programas de melhoramento, gestão de populações e estratégias de seleção.
- 1.3. Prof. Dr Carlos Eduardo Alves Soares (Curador do Núcleo *In vitro*)
Doutor em Bioquímica
Área de Atuação: Genética; Bioquímica; Biologia Molecular e Bioinformática
- 1.4. Prof Dr Wirton Peixoto Costa (Curador adjunto do Núcleo *In vitro*)
Doutor em Zootecnia
Área de Atuação: Diagnóstico por imagem e reprodução

Objetivos específicos:

1. Identificar e caracterizar fenotipicamente rebanhos estabelecendo sua distribuição geográfica, diversidade e variabilidade genética, para os grupos animais ameaçados de extinção.
2. Estudar a estrutura populacional por meio da análise das informações de pedigree dos rebanhos participantes do núcleo para propor ações estratégias de ampliação do tamanho efetivo populacional e manutenção da variabilidade genética;
3. Conservar *ex situ* o material genético por meio da implantação de um Núcleo de Conservação

composto por um rebanho formado com a participação de material genético comprovadamente da raça e gerido por um curador, juntamente com uma equipe de apoio;

4. Constituir um banco de germoplasma, gerido por um curador e uma equipe de apoio, a fim de realizar a conservação *in vitro* do material genético, por meio da criopreservação de sêmen e de embriões.
5. Realizar avaliação do sêmen a ser armazenado no banco de germoplasma através de exames de rotina como espermograma, bem como através da proteômica do plasma seminal visando à busca de biomarcadores de fertilidade que auxiliem os processos de multiplicação da população;
6. Caracterizar geneticamente os rebanhos envolvidos no Programa, por meio de Associação Genômica ampla, com chips de alta densidade.
7. Tornar o Núcleo de Conservação da raça Morada Nova Branca uma unidade regulamentada no sistema administrativo da UFERSA, com o objetivo de garantir o uso racional e a conservação deste patrimônio genético, de acordo com a Lei Nº 13.123, de 20 de Maio de 2015;
8. Aumentar a conscientização dos diversos segmentos da sociedade, sobre a importância da conservação de recursos genéticos animais.

Finalidades

A identificação e controle dos animais serão realizados, inicialmente, em 200 animais da raça Morada Novos, variedade branca, com intuito principal de controle zootécnico. Para avaliação fenotípica e reprodutiva de machos e fêmeas, serão realizadas avaliações morfométricas, adicionado de 30 testes andrológicos e 150 exames ginecológicos para seleção. Para colheita e armazenamento seminal e embrionário, serão coletadas doses de sêmen em 20 reprodutores, assim como 80 embriões nas doadoras selecionadas. A Genotipagem será realizada em 100 animais dos rebanhos previamente selecionados. Concomitante, será adquirido material genético de rebanhos considerados distantes entre si, para a formação e implantação dos Núcleos de Conservação *Ex situ* e *In vitro*. Esses Núcleo serão geridos por um curador e um curador adjunto, designados pelo gestor da instituição através de portaria, os quais terão a missão de implementar tecnicamente as etapas necessárias para a conservação do patrimônio genético em questão, dentro do que regulamenta a Lei 13.123, de 20 de Maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional. A divulgação dos resultados incluirá participações em congressos científicos e feiras para divulgação da raça no meio técnico-científico, além de publicação de artigos científicos.

5) CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO				
Meta	Descrição	CÓDIGO NAT. DESPESA	Indicador Físico	
			Unid.	VALOR (R\$)
1	Formação e Manutenção do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Morada Nova, Variedade branca			
	1.1 Material para Manutenção de Bens imóveis: adequação da infraestrutura de instalações e utensílios imóveis destinados à alimentação animal. (Out – Dez/2016)	33390.30.24		
	a) Aquisição de tela campestre de 1,2m de altura, além de mourões e estacas de madeira a serem utilizadas na confecção de cercas (em anexo), destinado à separação dos reprodutores, além de instalação de dois piquetes com a finalidade realizar a monta controlada. Cada metro linear de cerca está estimado em aproximadamente R\$ 10,00 de material. A mão de obra para confecção da cerca este estimada em torno de R\$ 5,00 por metro linear de cerca. (200m x R\$15/m = R\$3.000).		m	3.000,00
	b) Aquisição de cochos e comedouros de concreto pré-moldados para o fornecimento de alimentos volumosos, concentrados e sal mineral. (10 unidades x R\$100,00 = 1.000,00).		unidade	1.000,00
	c) Telhas de fibrocimento ondulada E = 4 mm de *2,44 x 0,50* M sem amianto. Madeira de lei para confecção de abrigos destinados aos reprodutores e cochos de alimentação nos piquetes das matrizes. (100m ² x R\$110/m ² = R\$11.000).		m ²	11.000,00
	1.2 Alimentos para Animais - Suplementação Alimentar do Núcleo	33390.30.06		
	a) Aquisição de feno e sal mineral para a suplementação de ovinos, nas diversas categorias. Serão necessários 5 toneladas de feno para alimentação de 50 ovinos da raça Morada Nova branca. (5 toneladas x R\$1.000/tonelada = R\$5.000).		Tonelada	5.000,00
	1.3 Material Laboratorial e Material para uso veterinário: utilização para criopreservação e biotécnicas reprodutivas			

	<p>a) Avaliação clínica e reprodutiva de matrizes e reprodutores. Realização de exames ginecológicos e obstétricos. Para tal, será necessária a aquisição de soluções específicas como Panótico rápido, lâminas, swabs e gel para ultrassom. No valor de R\$ 30,00 por fêmea. Serão avaliados 150 fêmeas R\$ 30,00 x 150 equivalendo a R\$ 4.500,00 reais. Para a seleção de reprodutores será realizado o exame andrológico completo e ultrassom testicular, sendo necessárias soluções e corantes como azul de bromofenol, rosa de bengala, formaldeído, soluções hiposmóticas. No valor estimado de R\$ 50,00 por reprodutor. Serão avaliados 30 reprodutores, com custo total de R\$ 1.500,00. (30 reprodutores x R\$ 50,00/reprodutor = R\$1.500,00); (150 fêmeas x R\$ 30,00/ fêmeas = R\$ 4.500,00).</p>	33390.30.35	Animal	6.000,00
	<p>b) A partir da seleção dos reprodutores serão realizadas coletas e criopreservação seminal. Para tanto, serão necessários soluções como ácido cítrico, citrato de sódio, etilenoglicol, dimetilsulfoxido, TRIS, solução fisiológica, glicerol, palhetas para criopreservação de sêmen entre outras necessárias para os procedimentos, no valor de R\$ 100,00 reais por animal. (20 reprodutores x R\$ 100,00/reprodutor = R\$2.000,00).</p>	33390.30.35	Animal	2.000,00
	<p>c) Sincronização de estro, inseminação artificial e criopreservação de embrião. As matrizes selecionadas (doadoras) serão sincronizadas e fertilizadas com o sêmen criopreservado. Para tais procedimentos são necessárias soluções específicas como prostaglandina sintética, CIDR, progesterona sintética, eCG, meio Holding, TCM 199, PBS, com custo médio de R\$ 200,00 por animal. (80 animais x R\$ 200,00/animal = R\$16.000).</p>	33190.30.18	Animal	16.000,00
1.4 Proteômica Seminal				

	a) Custos com reagentes para estudo proteômico de 20 animais, como PlusOne Acrylamide PAGE, PlusOne N,N'-Methylenebisacrylamide, Immobiline DryStrip, e Sequencing Grade Modified Trypsin para digestão das proteínas que serão caracterizadas por Espectrometria de Massas. Serão realizados 20 testes. (20 testes x R\$ 750,00/teste = R\$ 15.000,00. OBS: O valor inclui todas as etapas dos testes.	33390.30.35	Teste	15.000,00
	1.5 Genotipagem dos animais.			
	a) Custos com PN550627 Axiom ovicamp R\$ 320,00; Importing cost R\$ 40,00 e Running cost R\$40,00. Serão realizados 100 testes (100 testes x R\$ 400/teste = R\$ 40.000,00). Esses custos incluem a compra dos kits e reagentes assim como o serviço de genotipagem.	33390.39.05	Teste	36.000,00
	b) Aquisição de tubos de criopreservação, caixas plásticas e estantes para armazenamento de sangue total e DNA. Kits para extração de DNA.	33390.30.35		4.600,00
	1.5 Material de Uso Zootécnico: para identificação e controle zootécnico	33390.30.12		
	a) Aquisição de material para identificação e controle dos animais. Compra de 200,00 bolus ruminais, um aplicador de bolus, brincos e coleiras, além de Kits de tatuagem. (200 animais identificados e registrados x R\$ 52,50/animal = R\$10.500,00).		Animal	10.500,00
	1.6 Publicação dos resultados obtidos com o trabalho e divulgação da variedade branca da raça Morada Nova			
	a) Material para Comunicações: Elaboração de material técnicos contendo folhetos, banner e folder para divulgação da variedade branca da raça Morada Nova. Serviço gráfico para baner: 6 x R\$ 150/baner = R\$ 900,00 Serviço gráfico para folheto: 200 x R\$ 5,0/ folheto = R\$ 1000,00 Serviço gráfico para folder: 500 x R\$	33390.30.30	Unidade	R\$ 2.400,00

	1,0/ folder = R\$ 500,00.			
	b) Serviços de Comunicação em geral: Custos de traduções, taxas de submissão e de publicação de artigos científicos. (3 artigos x R\$ 1.500,00/artigo = 5.100,00).	33390.36.27	Artigo	R\$ 4.500,00
	1.7 Material e medicamentos para Uso Veterinário: Medicamentos probióticos e reagentes para controle sanitário do Núcleo			
	a) Aquisição de vermífugos, vacinas e medicamentos para controle sanitário do rebanho;	33190.30.18	Animal	3.000,00
	b) Material para coleta de sangue e de fezes;	33390.30.35		3.000,00
	c) Reagentes para dosagens hormonais, hemograma e bioquímica sérica;	33390.30.35		7.000,00
	Todas as análises serão realizadas em 200 animais x R\$ 65,00 = R\$ 13.000,00).			

6) CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO (R\$ 1,00)			
Nº DA PARCELA	MÊS DA LIBERAÇÃO	VALOR (R\$ 1,00)	PERÍODO DE EXECUÇÃO
1	Abril/2017	65.000,00	Abril/2017 – Março/2018
2	Abril/2018	65.000,00	Abril/2018 – Dez/2018

7) PLANO INTERNO	AÇÃO	FONTE	VALOR (R\$)

8) ANEXO
<u>CONDICÕES ESSENCIAIS:</u>
I – As partes acatam e se comprometem a cumprir o disposto neste Termo de Cooperação, sujeitando-se às normas da Lei nº 8.66/1993, no que couber, Lei nº 4.320/1964, Lei Complementar nº 101/2000, Lei nº 10.520/2002, Decreto nº 93.872/1986 e Decreto nº 6.170/2007.
II – A entidade ou o órgão executor se compromete a:
a) Promover a execução do objeto na forma e prazos estabelecidos;
b) Aplicar os recursos exclusivamente na consecução do objeto;

- c) Assegurar o provimento tempestivo dos recursos complementares necessários à execução do objeto;**
- d) Permitir e facilitar ao MAPA o acesso a toda documentação, dependência e locais do projeto;**
- e) Comprovar o bom e regular emprego dos recursos recebidos, bem como dos resultados alcançados;**
- f) Assumir todas as obrigações legais decorrentes de contratações necessárias à execução do objeto;**
- g) Manter o MAPA informado sobre quaisquer eventos que dificultem ou interrompam o curso normal da execução do objeto;**
- h) Prestar contas dos recursos, integrando as contas anuais a serem apresentadas aos órgãos de controle interno e externo, nos termos da Norma de Execução nº 004, de 22 de dezembro de 2004, da Secretaria Federal de Controle Interno – SFC; e**
- i) Apresentar relatório descritivo, ao MAPA, ao final da execução.**

Em: ____ de _____ de 201__.

Chefe Geral da EMBRAPA - CNPC

**Nome e Cargo do Dirigente da
da Unidade Repassadora**

**Proposta de Projeto para a Chamada CNPq Nº 12/2017 – Bolsas de Produtividade em Pesquisa
Medicina Veterinária PQ-2**

**Pesquisa de novos agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas em
cadelas e gatas**

***Research on new infectious agents causing reproductive failure in bitches and
queens***

Pesquisador proponente

João Marcelo Azevedo de Paula Antunes

Pós-Doutor em Medicina Veterinária Preventiva, Membro Permanente da Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA (conceito 4 CAPES), Universidade Federal Rural do Semi-Árido -UFERSA, Av. Francisco Mota, 572 , Bairro Costa e Silva, Campus Oeste, Mossoró-RN, CEP: 59.625-900. E-mail: joao.antunes@ufersa.edu.br, Tel: 084 3317 8310, *lattes*: <http://lattes.cnpq.br/4718683077685105>

Instituição de Execução

UFERSA- Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Área do conhecimento predominante: 5.00.00.00-4 Ciências Agrárias
5.05.00.00-7 Medicina Veterinária

Áreas do conhecimento correlatas: 5.05.02.00-0 Medicina Veterinária Preventiva
4.06.02.00-1 Saúde Pública

Mossoró, 2017

Resumo

Perdas da prenhez de origem infecciosa podem ser causadas por transmissão transplacentária com a infecção direta de embriões e fetos. Em projeto anterior foram pesquisados através de Biologia molecular e Sorologia os principais agentes infecciosos causadores de problemas reprodutivos (aborto, natimorto e morte neonatal) em cadelas e gatas com e sem problemas reprodutivos atendidas no Hospital Veterinário da UFERSA. Nas cadelas e seus fetos foram pesquisados Herpes Vírus Canino tipo 1 (CaHV-1), *Brucella canis*, Parvovírus canino, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Leishmania infatum*, enquanto nas gatas e seus fetos foram pesquisados o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV), Alfa herpesvírus felino e Parvovírus. Para o animal ser incluído no estudo o proprietário não poderia declarar problemas genéticos, traumáticos, hormonais, nutricionais e maternos na gestação atual e em gestações anteriores. Como todos os animais foram negativos para os micro-organismos pesquisados nos tecidos e sabendo que os vírus representam as maiores causas de falhas reprodutivas em cães e gatos propomos a utilização da metagenômica viral para pesquisa de novos agentes virais causadores de aborto em fêmeas caninas e felinas. Também propomos a pesquisa de possíveis novas bactérias causadoras de aborto através do sequenciamento do gene RNAr 16S. O objetivo deste projeto será de avaliar novos agentes virais e bacterianos que causam aborto, natimorto e morte neonatal em cadelas e gatas. Os resultados deste projeto poderão acrescentar novos agentes infecciosos no diagnóstico de problemas reprodutivos de cadelas e gatas que auxiliarão em medidas profiláticas futuras.

Palavras-chaves: Metagenômica Viral, Sequenciamento RNAr 16S, Aborto; Natimorto; Morte neonatal; Falhas reprodutivas

Abstract

Infectious origin of the pregnancy losses may be caused by transplacental transmission with direct infection of embryos and fetuses. In a previous project were studied by molecular biology and serology the main causative infectious agents of reproductive problems (abortion, stillbirth and neonatal death) in dogs and cats with and without reproductive problems treated at the Veterinary Hospital of UFERSA. In bitches and their fetuses were surveyed Herpes Virus Canine type 1 (CaHV-1), *Brucella canis*, Canine Parvovirus, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Leishmania infatum* while the cats and their fetuses were analyzed for Feline Immunodeficiency virus (FIV), Feline leukemia virus (FeLV), Feline herpesvirus alpha and Parvovirus. For the animal be included in the study the owner could not declare genetic problems, trauma, hormonal, nutritional and maternal during the pregnancy and previous pregnancies. Like all animals were negative for the micro-organisms investigated in the tissues and knowing that viruses representing the major causes of reproductive failure in dogs and cats suggest the use of viral metagenomic for research a new causative viral agents abortion in canine and feline females. We also propose the search for potential new bacteria that cause abortion by sequencing the 16S rRNA gene. The objective of this project is to evaluate new viral and bacterial agents that cause abortion, stillbirth and neonatal death in dogs and cats. The results of this project will add new infectious agents in the diagnosis of reproductive problems of dogs and cats that will assist in future preventive measures.

Key-words: Viral metagenomics; Sequencing 16S rRNA; Abortion; Stillbirth; Neonatal death; Reproductive failures.

Objetivo geral: O objetivo deste projeto será a pesquisa de novos agentes virais e bacterianos que causam falhas reprodutivas (aborto, natimorto e morte neonatal) em cadelas e gatas.

1. IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

1.1 Causas de falhas reprodutivas, de abortamento; natimortalidade e morte neonatal em cadelas e gatas

O período de gestação normal para o cão é de 57-72 dias, e para o gato é entre 52 e 74 dias. A perda da gravidez é facilmente reconhecida em fêmeas que tenham sido previamente diagnosticadas grávida nos primeiros estágios de gestação. Alguns animais podem ter uma diminuição clínica no perímetro abdominal, vômito e/ou diarreia, tem falta de apetite, apatia, desidratados e febre. Secreção vulvar sanguinolenta ou purulenta, esforço abdominal e desconforto também pode ser notados. No entanto, em muitos casos, sinais de perda de gravidez são inaparentes ou passam despercebidos e a perda da gravidez somente é observada apenas durante exame ou no momento do parto (Verstegen et al., 2008).

A morte fetal durante a gestação pode resultar em reabsorção, expulsão (aborto), retenção fetal e mumificação do feto. Se o neonato nasce morto é considerado um natimorto. Morte neonatal é considerada morte dentro das primeiras 3 semanas depois do nascimento (Lamm e Njaa, 2012). Embora mais mortes ocorram entre o nascimento e uma semana de idade e o desmame, as perdas embrionárias são geralmente maiores que as perdas perinatais. Infecções maternas durante a gravidez podem ou não afetar o desenvolvimento fetal. O impacto sobre o desenvolvimento fetal pode ser causado diretamente pela ação de agentes infecciosos ou suas toxinas, ou indiretamente pela placentite (Givens e Marley, 2008).

A morte embrionária ou fetal podem resultar em reabsorção, mumificação, maceração ou aborto. Fatores que afetam a morte embrionária e fetal incluem a idade gestacional, a causa da morte e fonte de progesterona para a manutenção da gravidez (Decaro et al., 2012). Mumificação fetal ocorre mais em espécie que geram muitas crias por gestação por exemplo: cadelas e gatas. As infecções bacterianas geralmente não estão relacionadas com mumificação, no entanto, os vírus são uma causa comum de mumificação em cães e gatos (Givens e Marley, 2008).

A maceração fetal ocorre quando o aborto ou parto não ocorreram após a morte fetal. A maioria dos abortos são esporádicos, em torno de 5% dos animais prenhes em um grupo. Doença materna grave resultando em febre alta (por exemplo: mastite e pneumonia), hipoxia (por exemplo na anaplasmosse e anemia grave), ou endotoxemia podem resultar em aborto (Givens e Marley, 2008). Apesar de poucas lesões serem patognomônicas, lesões fetais graves podem ser característica de aborto infeccioso. As causas de perda fetal e neonatal podem ser amplamente divididas em infecciosas e não infecciosas (Schlafer, 2008).

O principal objetivo das avaliações de diagnóstico no feto e no recém-nascido é de descartar doenças infecciosas e defeitos congênitos importantes como causas de aborto. Doenças infecciosas são particularmente críticas para descartar, porque podem afetar outras ninhadas dentro de criações em larga escala (Givens e Marley, 2008).

Entre as causas não infecciosas: as causas traumáticas durante a gestação ou após o parto também podem resultar em morte em filhotes de cães e gatos. Outras causas não infecciosas incluem doença genética e fatores maternos, que são muito mais difíceis de se diagnosticar (Johnston e Raksil, 1987). Uma vez, que traumas e defeitos congênitos forem descartadas, a possibilidade de fatores maternos como causa deve ser explorada clinicamente (Lamm e Njaa, 2012). Outras causas não infecciosas de perda de gestação em cadelas incluem nutrição inadequada, hipotireoidismo e baixas concentrações de progesterona sérica durante a gestação devido à produção insuficiente e secreção pelo corpo lúteo (Kustritz, 2005).

Causas infecciosas de aborto, natimorto e morte neonatal em cães e gatos podem ser agrupadas em doenças virais, bacterianas, fúngicas e por protozoários (Givens e Marley, 2008).

As causas de infertilidade e perda da prenhez são difíceis de identificar, entretanto em cadelas, *Brucella canis*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Streptococci spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, Herpes Vírus canino, Cinomose, Parvovírus Canino tipo-1 (CaHV-1), *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, são mencionadas como agentes infecciosos causadores de problemas reprodutivos e abortos, entretanto são raramente encontrados quando investigados (Givens e Marley, 2008). Outras infecções virais conhecidas por causarem abortos

esporádicos e morte neonatal em cães incluem o vírus do *Bluetongue* e adenovírus canino -1 (CAV1) (Carmichael et al., 1991).

Ao contrário do cães a perda reprodutiva felina é mais comumente atribuída a uma etiologia viral do que bactérias patogênicas ou protozoários (Givens e Marley, 2008). Já nas fêmeas felinas as causas bacterianas são raramente relatadas (Reilly et al., 1994, Guptill et al., 1998), contudo as causas virais são mais importantes, onde Vírus da Leucemia Felina (FeLV), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Peritonite Infecciosa Felina (PIF) e da Panleucopenia felina são descritos como os principais agentes infecciosos causadores de aborto e perda da prenhez (Kustritz, 2006).

Mir et al. (2013) relataram em um estudo com 21 cadelas sem causas conhecidas de infertilidade que estes animais foram negativos no cultivo aeróbico e anaeróbico de swab vaginal, bem como sorologia negativa para *B. Canis* e qPCR negativos para CaHV-1, *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma spp.*, Neste mesmo estudo os autores relatam que nestas cadelas encontraram na histologia: fibrose, degeneração de glândulas endometriais, endometrite e remodelamento hiperplástico do endométrio, que podem ter sido a causa da infertilidade nestes animais (Mir et al. 2013). Mir et al. (2013) relata que agentes infecciosos não foram detectáveis por limitações de sensibilidade dos testes.

1.2 Metagenômica viral

Apenas 1% dos vírus tem sido considerados cultiváveis e são a forma de vida mais abundante do planeta (Kuprovic & Bamford, 2011). Estima-se que há 320.000 vírus de mamíferos, muitos com potencial zoonótico. Mesmo que se considere que apenas parte destes vírus possa infectar e causar doença em humanos, há uma grande ameaça da emergência de zoonoses virais na humanidade (Imperale & Casadevall, 2015).

O estudo e a descoberta de vírus desconhecidos eram prejudicados pela limitação das técnicas de cultura celular e microscopia eletrônica e também pelas técnicas moleculares clássicas, dependentes da sequência viral. Na década passada, um dos acontecimentos mais notáveis da

microbiologia veio auxiliar esse ramo da virologia. Com o desenvolvimento da metagenômica observou-se o estabelecimento da metagenômica viral, definido como o estudo das sequências de ácidos nucleicos de vírus de diferentes biomas, baseada em diversos métodos de concentração, purificação, extração, sequenciamento e análise por bioinformática (Thurber et al., 2009). A aplicação da metagenômica para a descoberta viral teve ampla expansão após o advento do sequenciamento massivo, com diferentes plataformas disponíveis no mercado, que podem ser empregadas de acordo com o objetivo do estudo (Law et al., 2013).

A metagenômica é uma ferramenta poderosa para acessar a diversidade microbiana complexa presente em amostras ambientais como solo, sedimento ou água. Possibilita a descoberta de biomoléculas com propriedades biotecnológicas valiosas (Simon & Daniel, 2009), em estudos de medicina forense (Breing et al., 2010) e para a descoberta de novos agentes virais causadores de doenças no homem e nos animais (Blostrom, 2011). Atualmente, a rápida redução do custo das técnicas de sequenciamento de nova geração tem aumentado consideravelmente o desenvolvimento de estudos metagenômicos. Estima-se que no futuro a metagenômica será usada da mesma maneira que o gene rRNA 16S para descrever perfis de comunidades microbianas (Thomas et al., 2012).

1.3 Amostragem e Enriquecimento Viral

A primeira etapa do estudo metagenômico é a obtenção da amostra, que deve representar a população da qual foi colhida (Wooley et al., 2010). O ácido nucleico extraído deve representar todas as células presentes na amostra e quantidades suficientes de ácidos nucleicos de alta qualidade devem ser obtidas para a produção da biblioteca e sequenciamento (Thomas et al., 2012). Na maior parte das amostras, o ácido nucleico viral constitui apenas uma pequena porção de todos os ácidos nucleicos presentes. Desta forma, uma das tarefas mais importantes e complexas da metagenômica viral é preparar a amostra de tal forma que os ácidos nucleicos do hospedeiro e bactérias, considerados contaminantes, sejam eliminados enquanto o ácido nucleico viral é preservado (Delwart, 2007, Thomas et al., 2012, Law et al., 2013).

O capsídeo presente em alguns vírus tem como função proteger o ácido nucléico viral, o que pode ser considerado vantajoso em estudos metagenômicos, pois as nucleases podem ser utilizadas para o tratamento das amostras, degradando o ácido nucléico do hospedeiro, mas não afetando o ácido nucléico viral, que permanece viável. Após a extração dos ácidos nucléicos virais, quando o DNA ou o RNA estão livres (fora do capsídeo), pode-se fazer o tratamento com DNases quando se busca RNA vírus e com RNases quando se procura por DNA vírus (Delwart, 2007). O tratamento das amostras com nucleases pode não eliminar totalmente o ácido nucléico contaminante, principalmente em amostras como tecidos. Ainda, é importante enfatizar que há alguns vírus mais sensíveis ao tratamento com nucleases, e há, portanto, um risco de degradação do ácido nucléico viral (Blomstron, 2011).

Quando o propósito é separar os vírus de outros micro-organismos, a filtração com membranas de poro entre 145-160 nm pode ser inicialmente utilizada para remover bactérias, eucariontes e agregados grandes. Porém, devido à existência de vírus maiores que o tamanho do poro da membrana, como o poxvírus, que tem 140-260 nm de diâmetro, estes vírus seriam eliminados da amostra, juntamente com outros contaminantes (Delwart, 2007). A ultracentrifugação por densidade de gradiente de cloreto de cério (Thurber et al., 2009) e em colchão de sacarose 30% é outra maneira de separar as partículas virais (Delwart, 2007).

O processo de fracionamento das amostras deve ser checado para garantir que o enriquecimento suficiente do ácido nucléico alvo tenha sido alcançado e que mínima contaminação tenha restado (Thomas et al., 2012). Este é um fator importante, pois as técnicas de sequenciamento massivo utilizadas nos estudos metagenômicos amplificam aleatoriamente as bibliotecas, ou seja, quanto menos ácido nucléico contaminante maior a chance de detecção viral.

A purificação do ácido nucléico viral antes da amplificação é etapa crucial nos estudos metagenômicos e os métodos citados acima podem ser empregados na mesma amostra, uma vez que quando se desconhece a partícula viral presente na amostra, a combinação de dois ou mais métodos pode aumentar a sensibilidade do estudo. Anticorpos de pacientes convalescentes de doença respiratória e gastrointestinal foram utilizados para capturar os vírus presentes nas amostras

biológicas. Sabe-se que mesmo após algum tempo da infecção, IgGs são encontradas no soro de pacientes em convalescência. Estas imunoglobulinas 13 podem ser ligadas a beads magnéticas e utilizadas para a detecção do vírus na amostra. Esta estratégia de enriquecimento viral apresenta a vantagem de selecionar vírus, que tem maior chance de serem os causadores de determinada doença (Munnink et al., 2013).

1.4 Amplificação e preparo das bibliotecas

Diversas técnicas de amplificação podem ser utilizadas para a identificação de novos genomas virais e, por ser um método de amplificação, alguns problemas como reagentes contaminados, formação de quimeras e viés na amplificação podem ocorrer. O impacto destes problemas dependerá da quantidade e do tipo de material inicial e do número necessário de ciclos de amplificação para produção de quantidades suficientes de ácidos nucleicos (Thomas et al., 2012). A escolha da técnica vai depender do objetivo do estudo.

A amplificação dos ácidos nucleicos pode ser realizada de maneira independente da sequência para demonstrar a verdadeira composição genética da amostra. Esta etapa é capaz de multiplicar simultaneamente diversos genomas virais, incluindo vírus altamente divergentes e completamente novos, e, portanto, garantir sua descoberta e caracterização genética (Blomstrom, 2011).

A amplificação independente da sequência com um primer (sequence-independent single-primer amplification - SISPA) surgiu há quase duas décadas com o objetivo de identificar ácido nucleico viral a partir de sequências desconhecidas presentes nas amostras em pequenas quantidades. O método envolve a digestão do DNA por endonuclease, seguida de ligação direcional de um adaptador assimétrico, ou primer, nas duas porções finais da molécula de DNA. As sequências finais comuns ao adaptador permitem a amplificação do DNA em subsequente reação de PCR usando um único primer complementar. Devido à baixa complexidade do genoma viral, a digestão enzimática produz grande quantidade de um limitado número de fragmentos. Após a amplificação, bandas discretas no gel de agarose são observadas e podem ser então sequenciadas

e identificadas (Bexfield e Kellam, 2011). Pode ser utilizada para a identificação de genomas virais novos com alta divergência, porém ácidos nucleicos contaminantes podem ser amplificados (Delwart, 2007).

A SISPA foi utilizada para a detecção do vírus da hepatite C a partir de biopsias hepáticas. O cDNA foi obtido a partir do RNA com a utilização da enzima de transcrição reversa Superscript III e o primer senso utilizado na SISPA. RNA e DNA foram então incubados com a Klenow para obtenção da segunda fita de DNA e a reação de PCR foi realizada com o primer reverso da SISPA (Daly et al., 2011). Dois circovírus-símile foram identificados a partir de amostra de fezes pela técnica de SISPA (Castrignano et al., 2013).

Uma alternativa de tecnologia de amplificação é a PCR randômica (rPCR), que não requer a digestão do DNA ou cDNA nem a ligação a adaptadores (Blomstrom, 2011). Este método utiliza dois primers diferentes e duas reações de PCR. O único primer usado na primeira PCR tem uma sequência definida no final 5', seguido de uma sequência hexamérica ou heptamérica degenerada no final 3'. A segunda PCR é então realizada com um primer específico complementar à região 5' do primeiro primer, possibilitando a amplificação dos produtos formados na primeira reação. A técnica de PCR randômico tem sido utilizada para a detecção de DNA e RNA vírus e é uma das técnicas mais utilizadas atualmente na identificação de novos vírus (Bexfield e Kellam, 2011).

A amplificação por deslocamento (rolling circle amplification - RCA) é outra técnica eficiente que utiliza primers randômicos em conjunto com uma polimerase por deslocamento. Uma das polimerases de deslocamento de alta fidelidade é a Phi29 (fago *Bacillus subtilis*) com alta processividade, podendo incorporar até 20.000 bases antes de se destacar do alvo, além de atividade 5' - 3' exonuclease (Bexfield e Kellam, 2011). Utilizando-se primers randômicos e phi29, alvos circulares são amplificados eficientemente por uma reação denominada de amplificação por círculo rolante, que cria longos concatâmeros de múltiplas cópias do alvo. Pequena quantidade de material é necessária para a reação, e além de alvos circulares, alvos lineares também podem ser amplificados por esta técnica (Blomstrom, 2011).

Um novo método eficiente e altamente preciso foi desenvolvido para o sequenciamento massivo de RNA vírus. Apesar do protocolo ser laborioso (aproximadamente 5 dias de trabalho), resulta em sequências com taxa de erro mais baixas e facilita a identificação de variações raras de baixa frequência. Brevemente, o RNA é fragmentado, circularizado e selecionado por tamanho (85-100 nucleotídeos). A transcrição reversa é realizada pela reação de círculo rolante, que resulta em um cDNA-tandem, que são clonados para gerar a segunda fita de DNA, já contendo os adaptadores necessários para o sequenciamento (Acevedo e Andino, 2014).

O PCR degenerado utiliza primers para anelar em regiões parcialmente conservadas de vírus relacionados. O objetivo principal é criar um equilíbrio na tentativa de cobrir todas as variantes possíveis dentro de uma família viral, criando-se uma grande variedade de primers. Esta técnica é utilizada para a detecção de vírus, inclusive novos vírus, pela existência suficiente de homologia entre as famílias virais (Bexfield e Kellam, 2011). Diversos vírus produzem sua própria polimerase e existe uma semelhança tanto na sequência como na estrutura destas proteínas, pois exercem uma importante função. Desta forma, as DNA e RNA polimerases podem ser utilizadas na identificação de agentes virais pela proximidade com uma família viral conhecida (Sonntag et al., 1995; Lakshminarayan et al., 2003). Dois novos herpesvírus foram identificados de *Macaca nestrina* e *Macaca mulatta* (Rose et al., 1997) e dois radinovírus (*Chlorocebus radinovírus 1 e 2*), em macacos verdes africanos (Greensill et al., 2000), com primers degenerados que amplificam a região conservada do gene da DNA polimerase dos vírus da família Herpesviridae.

O PCR longo foi utilizado para amplificar o ácido nucléico mitocondrial de amostras de sangue, gerando fragmentos de aproximadamente 8 Kb em comprimento. As bibliotecas foram preparadas com o kit Nextera-XT e sequenciadas com a tecnologia Illumina (King et al., 2014). O PCR de longo alcance foi também utilizado para a detecção de DNA mitocondrial a partir de diferentes amostras como swabs de bochecha, cultura celular e DNA previamente extraído. Diferentes primers foram utilizados para a obtenção de fragmentos de aproximadamente 8,5 Kb (McElhoe et al., 2014).

Muitas vezes a amplificação inicial do ácido nucléico viral não é necessária para os estudos metagenômicos. Devido à variedade de ácidos nucléicos virais, diferentes metodologias para o preparo da biblioteca podem ser empregados. Vírus dsDNA podem ser mais facilmente preparados para o sequenciamento massivo em comparação com vírus RNA, porém o enriquecimento viral é prejudicado pela dificuldade na separação do DNA viral e do hospedeiro. Se tratando de amostras de vírus RNA ou ssRNA, o DNA complementar deve ser obtido a partir do RNA para posterior obtenção da segunda fita de DNA. Algumas enzimas como a Klenow e T4 DNA Polimerase, entre outras polimerases, tem sido utilizadas na obtenção da dsDNA (Daly et al., 2011; Castriganano et al., 2013; Munnink et al., 2013). O tratamento com a RNase H pode ser utilizado para degradar a fita de RNA inicial, previamente a obtenção da dsDNA (Jones et al., 2005). De acordo com a tecnologia utilizada, quando se busca vírus ssDNA, a segunda fita de DNA também deve ser obtida.

Dependendo da tecnologia de sequenciamento massivo utilizada, diferentes kits para o preparo das bibliotecas estão disponíveis no mercado. Dentre eles, o Nextera-XT (Illumina) é indicado para o preparo de genomas pequenos, amplicons e plasmídeos e requer apenas 1 ng de dsDNA como input. Esta técnica consiste de uma etapa de tagmentação enzimática que adiciona adaptadores que permitirão a amplificação por PCR e adição dos primers para o sequenciamento (McElhoe et al., 2014).

1.5 Sequenciamento

Diferentes técnicas de sequenciamento tem sido frequentemente utilizadas para a identificação de ácidos nucléicos. Uma técnica é construir biblioteca viral shotgun e sequenciar os fragmentos por meio de métodos como o Sanger, conhecido como “método de terminação de cadeia” ou “sequenciamento didesoxi” (Bexfield e Kallam, 2011; Blomstrom, 2011). A técnica é baseada na síntese de uma fita complementar dependente da polimerase na presença de 2'-desoxinucleotídeos (dNTPs) e 2',3'-didesoxinucleotídeos, que servem como finalizadores não reversíveis da síntese (Bexfield e Kellam, 2011).

A técnica de Sanger cria sequências de alta qualidade e pode ser empregada para produzir sequências de leitura de até quase 1.000 nt (Blomstrom, 2011). Uma possível limitação da técnica é a necessidade de clonagem viral em bactérias antes do sequenciamento (Bexfield e Kellam, 2011). A técnica de Sanger é altamente laboriosa em comparação com seu rendimento e a utilização de novas técnicas de alta transferência vem substituindo o sequenciamento de Sanger em estudos de metagenômica viral (Blomstrom, 2011).

O sequenciamento com alta taxa de transferência ou sequenciamento massivo não necessita da etapa de clonagem e produz maior quantidade de dados comparado ao sequenciamento de Sanger. Para a metagenômica viral, este fato permite a detecção de vírus com menor número de cópia inicial (Blomstrom, 2011). Também conhecidos como “tecnologias de sequenciamento de nova geração”, os métodos de sequenciamento massivo incluem o instrumento baseado em pirosequenciamento 454 (Roche Applied System), o analisador de genoma (Illumina) e o sistema SoLiD (Thermo Fhiesher) (Bexfield e Kellam, 2011). Os avanços destas técnicas e a redução do custo tem aumentado o número e a dimensão dos projetos de sequenciamento metagenômicos (Simon e Daniel, 2011).

As três tecnologias diferem no método de amplificação, na quantidade de dados gerados e na forma de leitura. A plataforma 454 utiliza para a amplificação clonal a PCR em emulsão (ePCR), enquanto a Illumina usa a PCR por pontes. Ainda, a plataforma 454 utiliza o pirosequenciamento, a Illumina utiliza terminadores reversíveis e o SOLiD utiliza ligação e probes cliváveis. A maior capacidade de throughput é feita pelo aparelho SOLiD (10-20 Gb/corrída), seguida pelo Illumina (3-6 Gb/corrída) e pelo 454 (0,4- 0,6Gb/corrída). Apesar do menor throughput, a plataforma 454 realiza leituras mais longas (até 400 nt), seguida pelo Illumina (aproximadamente 100 nt) e SOLiD (aproximadamente 50 nt). Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens e a escolha do sistema ideal vai depender do tipo de estudo a ser realizado (Blomstrom, 2011).

A plataforma 454 System Roche faz a PCR por emulsão (ePCR) para a amplificação clonal, onde fragmentos de DNA randômicos são ligados a beads, que são depositadas em poços de

uma placa picotitre. Em seguida, o pirosequenciamento é feito individualmente. O pirosequenciamento envolve a adição sequencial dos quatro desoxinucleotídeos trifosfato à reação. Caso haja complementariedade, são incorporados pela polimerase. Quando ocorre a polimerização, há a liberação de pirofosfatos, que são convertidos por duas reações enzimáticas e produzem luz. A luz é detectada em paralelo via dispositivo ligado à carga (charge-coupled device – CCD), convertida na sequência da fita. Esta técnica apresenta relativo baixo custo, comprimento de leitura entre 600 e 800.000 bp, 10 ng de DNA para iniciar a reação e capacidade de throughput de até 500 Mbp (Thomas et al., 2012).

Já a plataforma Illumina/Solexa tem como princípio a imobilização de fragmentos de DNA randômico em uma superfície, ou seja, a amplificação clonal ocorre em superfície sólida. A amplificação ocorre em clusters de fragmentos de DNA idênticos, que subsequentemente são sequenciados com finalizadores removíveis, conhecida como sequenciamento por síntese. Esta técnica também apresenta baixo custo, tem grande aplicação na metagenômica, utilizada na geração de “rascunhos” de genoma, 20 ng de DNA podem ser usados como amostra inicial, mas a plataforma disponível há mais tempo, a HiSeq, apresenta tempo de corrida maior que o da plataforma 454. Esta desvantagem está sendo corrigida pela nova versão da tecnologia Illumina, o MiSeq, que também pode ser utilizado para sequenciamentos teste (Thomas et al., 2012).

1.6 Sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S

O sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética (Becker et al. 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (Nolte & Caliendo 2003). As sequências encontradas são comparadas com aquelas depositadas em bancos de dados, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e *Ribosomal Differentiation of Microorganisms* (RIDOM) (Becker et al. 2004). Os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes, os rDNAs, são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o

maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula. Uma das vantagens de se usar informações sobre as seqüências do rRNA é sua disponibilização em bases de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL), na maioria dos casos, acessíveis, gratuitamente, permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências presentes nessas bases (Lane et al., 1985).

O número de estudos que investigam o microbioma explodiu desde os avanços tecnológicos no sequenciamento de alto rendimento que facilitam a clonagem e análise (Kuczynski et al. 2012). Estes avanços técnicos têm vindo a mudar de paradigma, pois a maioria (> 90%) das espécies microbianas não podem ser facilmente cultivadas utilizando as técnicas atuais de cultura (Stewart, 2012). A abordagem mais comum para analisar o sequenciamento da microbiota, é a compilação de dados recolhidos pelo *Human Microbiome Project* (HMP) que é a análise de amplificação do gene 16S RNA ribossomal (rRNA (Human Microbiome Project, 2012). Neste método, uma região de rRNA 16S é amplificado por PCR com iniciadores que reconhecem regiões do gene altamente conservados e sequenciados (Sanschagrín e Yergeau, 2014). As limitações deste método são que a anotação é baseada na associação putativa do gene 16S rRNA com uma taxa definida como uma unidade taxonómica operacional (OTU, *operational taxonomic unit*). Em geral, OTUs são analisados ao nível de filos ou géneros, e pode ser menos precisa ao nível da espécie. Além disso, genes específicos não são sequenciados diretamente, mas em vez previsto com base na OTUs. Devido à transferência horizontal de genes e a existência de numerosas estirpes bacterianas, a falta de identificação direta de genes potencialmente limita a compreensão de um microbioma (Poretzky et al., 2014).

Uma abordagem alternativa para o método de sequenciação de rRNA 16S é a amplificação de todo o genoma pela técnica de *whole genome shotgun sequencing* (WGS) em que fragmentos aleatórios do genoma são sequenciados. As principais vantagens do método WGS são de que a taxa pode ser definida com mais precisão ao nível de espécie. Outra consideração importante é que os 16S e métodos WGS comumente utilizam diferentes bases de dados de classificação de táxons. No entanto, WGS é mais dispendioso e requer mais extensa análise de dados. Além disso, para

identificar e compreender os genes bacterianos em uma táxon, pode ser necessário sequenciar um genoma com uma cobertura maior (Sims et al., 2015).

Ao longo dos últimos 5 anos melhorias em tecnologias de sequenciamento como o lançamento da *Single Molecule Real-Time* (SMRT) Sistema de Sequenciamento do DNA da *Pacific Bioscience*; e sequenciadores de bancada 454, *Life Technologies* (agora Thermo), e Illumina. Estas tecnologias mudaram completamente a forma como a comunidade científica têm desenhado e concebido experimentos em ecologia microbiana para descrever a complexidade das comunidades. Com a rápida redução do custo do sequenciamento e melhorias no comprimento de leitura e taxa de transferência, o campo foi completamente revolucionado e desenhos experimentais, que antes não poderiam mesmo ter sido tentada devido ao alto custo envolvido, foram alcançadas. Duas abordagens têm sido amplamente utilizados na prática para descrever a estrutura da comunidade microbiana, perfil genético do 16S RNAr e o WGS (shotgun metagenomic sequencing) (Quince et al., 2009; Liu et al., 2007; Dámore et al., 2016).

Genes de RNA ribossômico são altamente conservadas e evolutivamente estável, mas diferem na sua região hipervariável, essas características fizeram-lhes a ferramenta ideal para estudos filogenéticos. Diversos trabalhos têm descrito a variação natural usando análises *in silico* (Lim et al., 2012) e sequenciamento do genoma têm impulsionado o nosso conhecimento do mundo biológico como melhoras nas bases de dados de genes ribossomais. Estas melhorias fez o gene 16S RNAr o marcador ideal para a caracterização da diversidade microbiana (Rinke et al., 2013). O gene 16S RNAr compromete 9 regiões hipervariáveis, que diferem em comprimento, posição e a discriminação taxonômica, primers universais foram desenhados e avaliados para amplificar as regiões hipervariáveis (Klindworth et al., 2012) e iniciadores de viéses em relação a determinados grupos taxonômicos tem sido relatada (Pinto et al., 2012) As regiões variáveis têm diferentes poderes discriminatórios em relação aos grupos de microrganismos e entre as regiões alvo curtas (<300 pb), a região hipervariável 4 (V4) foram geralmente mais informativas (Werner et al., 2012; Soergel et al., 2012).

A Roche anunciou que até o fim de 2016 irá realizar a retirada das plataformas de sequenciamento 454 o que tem destacado a necessidade de uma alternativa para estudos taxonômicos. As várias plataformas sequenciamento disponíveis têm pontos fortes diferentes e fracos em leitura comprimento, precisão, tempo para o resultado e rendimento. Mais leituras são mais fáceis de atribuir a um grupo taxonômico porque eles contêm mais informações, mas alguns estudos recentes têm sugerido que é possível obter resultados comparáveis usando regiões alvo mais curtas e de sobreposição o que aumentou o destaque dos sequenciadores em plataformas Illumina (van Dijk et al., 2014; Nichols et al. 2010).

Apesar de comunidades microbianas naturais serem compostas por uma mistura de micróbios com estrutura desconhecida, comunidades microbianas sintéticos podem ser montados para gerar sistemas distintos com reduzida complexidade. Estudos anteriores relataram a utilização de uma comunidade sintético como um material de controle para: investigar polarizações; interrogar diferentes pacotes de software; e encontrar o impacto da preparação da amostra, escolha do primer 16S RNAr, a preparação *amplicon*, a amostragem direta e preparação biblioteca (Konstantinidis e Tiedje, 2007; Qin et al., 2010; Lassmann et al., 2011; D'Amore et al., 2016).

Diferentes metodologias de preparação da biblioteca de *amplicons* têm sido propostas para desbloquear o poder das tecnologias de próxima geração para sequenciamento alvo. O desenho de primers de fusão (PF) usa a PCR para anexar um código de barras, mas é caro devido à exigência de compra de longos iniciadores que são do tipo plataforma específica para cada combinação de primer e de código de barras para emparelhar cada amostra em estudo (por exemplo, 96 amostras × 4 regiões variáveis exigiria um total de 384 pares de iniciadores) (Meyer et al., 2008; Namiki et al., 2012; Zhu et al., 2010; Li et al., 2014; Luo et al., 2014). A abordagem da ligase de adaptador (AD) um adaptador com código de barras liga no fim de um fragmento amplificado. A abordagem AD utiliza um kit de preparação de biblioteca específica, em vez de iniciadores de fusão especialmente concebidos, e é funcional para experimentos onde amplicons já existem ou, pelo menos, onde primers específicos do modelo já existem (Namiki et al., 2012). O design do amplicon *tailed-tag* (t-tag) utiliza um processo de amplificação de biblioteca de duas fases ligeiramente mais elaborados,

mas é mais económico, evitando-se o custo de um grande número de iniciadores com código de barras (Binladen et al., 2007; Huggett et al., 2013; Grosskopf e Soyer 2014; D'Amore et al., 2016).

Esta abordagem reduz o número de iniciadores necessários, anexando, num primeiro ciclo de PCR, o ligante / iniciador universal para cada extremidade e requer apenas o número de pares de iniciadores como o número de regiões variáveis no experimento. Um segundo ciclo de PCR é realizada, com os iniciadores universais hibridam com o ligante, enquanto a sequência de indexação pode ser adicionado a uma ou ambas as extremidades do código de barras das amostras. À medida que o segundo conjunto de iniciadores pode ser reutilizada em outras experiências (com diferentes alvos) este método pode ser muito mais barato do que as outras abordagens. *Illumina* e mais recentemente PacBio desenvolveram um protocolo baseado no design de 2 etapas de PCR e uma abordagem semelhante tem sido apoiada pela *Fluidigm Corporation* (Crosby et al., 2007; Meyer et al., 2007; Meyer et al., 2008; Pertoldi et al., 2009; Li et al., 2014).

2. Qualificação do principal problema a ser abordado

No final de 2014 e no ano de 2015 demos início a duas dissertações de mestrado¹ em colaboração com a FMVZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Professora Dr. Jane Megid) e com o IBTec (Instituto de Biotecnologia, Professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior) da UNESP de Botucatu. No Hospital Veterinário Jerônimo *Dix-Huit* Rosado Maia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido–UFERSA foram coletadas amostras de cadelas e gatas com e sem problemas reprodutivos. Estes animais para serem inclusos no grupo de estudo de fêmeas com características de abortamento infeccioso deveriam estar em boas condições nutricionais, glicemia normal e o proprietário não poderia declarar problemas genéticos, traumáticos, hormonais (uso de anticoncepcionais), nutricionais e maternos na gestação atual e em gestações anteriores.

Nas cadelas (20 cadelas com problemas reprodutivos e 16 sem problemas reprodutivos) e seus fetos (24 fetos) foram pesquisados Herpes Vírus Canino tipo 1 (CaHV-1, qPCR), *Brucella canis* (qPCR e sorologia), Parvovírus canino (qPCR), *Neospora caninum* (qPCR), *Ehrlichia canis* (qPCR), *Anaplasma platys* (qPCR) e *Leishmania infatum* (qPCR), enquanto nas gatas (26 gatas com problemas reprodutivos e 16 sem problemas reprodutivos) e seus fetos (20 fetos) foram pesquisados pela qPCR o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV), Alfa herpesvírus felino e

1 Pesquisa de agentes infecciosos causadores de abortamento, natimorto e morte neonatal em cadelas e gatas. Dissertações de Mestrado já defendidas e em fase de publicação dos resultados

Parvovírus. Não foram encontrados estes agentes infecciosos tanto nos fetos como nas cadelas/gatas apesar dos mesmos animais apresentarem hemograma infeccioso e úteros, fetos e placentas com característica macroscópicas de abortamento infeccioso.

O número de estudos que investigam o microbioma, tanto bacteriano ou viral explodiu desde os avanços tecnológicos no sequenciamento de alto rendimento, estes avanços técnicos estão mudando o paradigma uma vez que a maioria (> 90%) das espécies microbianas não podem ser facilmente cultivadas (Ranjan et al., 2016). O microbioma humano é importante na manutenção da saúde, enquanto o seu desequilíbrio (disbiose) tem sido associado com várias doenças (por exemplo, doença inflamatória do intestino e a doença da artéria coronária) e obesidade (Pflughoeft e Versalovic, 2012; Cho e Blaser, 2012).

Segundo Pflughoeft e Versalovic (2012); Cho e Blaser (2012) em seres humanos a alteração do microbioma pode levar a enfermidades. Nossa proposta de projeto sugere que também existe a possibilidade de que alterações no microbioma do útero possam levar a abortamentos, além do mais há a existência de possíveis agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas ainda não descobertos. Com estas justificativas e a alta prevalências de falhas reprodutivas no Hospital Veterinário (HOVET) da UFERSA associadas com o resultado preliminar dos nosso projetos de que as fêmeas pesquisadas bem como seus fetos foram negativos na pesquisa dos principais agentes etiológicos de origem infecciosa de falhas reprodutivas, decidiu-se investigar as possíveis etiologias virais (através da metagenômica viral) e bacterianas (bacterioma, sequenciamento do gene 16 RNAr) em útero e tecidos fetais causadores de mumificação, aborto e morte neonatal em cadelas e gatas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desta forma, o presente projeto tem como objetivo investigar possíveis novos ácidos nucléicos virais e bacterianos em amostras de úteros e fetos negativos para agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas pela metagenômica viral e sequenciamento do gene 16S RNAr e posteriormente, utilizar técnicas da qPCR para confirmar os genomas encontrados.

4. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO PROJETO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO OU DE INOVAÇÃO

Espera-se que novos ácidos nucléicos virais e bacterianos sejam encontrados nas amostras estudadas. Do ponto de vista científico, tecnológico e de inovação, as respostas deste projeto serão de impacto direto nos estudos de patogenia das doenças reprodutivas de cães e gatos, além de que estes resultados a serem gerados poderão futuramente entender melhor a patogenia destas enfermidades e

assim entendendo a patogenia poderemos melhorar a metodologia de controle e prevenção destas doenças. Os resultados esperados serão de grande apropriação de conhecimento científico que irão possuir capacidade de absorção e difusão das futuras inovações que poderão ser utilizadas na melhoria da criação e procriação de cães e gatos.

A aprovação da presente proposta nos permitirá dar continuidade as pesquisas de enfermidades infecciosas causadoras de prejuízos na gestação e desenvolvendo novas ferramentas para o diagnóstico e controle destas enfermidades. Como principal resultado espera-se gerar conhecimento relevante que fortaleça o desempenho científico do Brasil, assim aumentando a importância e competitividade internacional da pesquisa brasileira.

A principal disseminação dos resultados será através de publicação em periódicos incluídos *no Journal of Citation Report (JCR)* com fator de impacto igual ou acima da média para a área da Medicina Veterinária fortalecendo a Pós-Graduação da UFRSA.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem, testes moleculares e sorológicos

Vinte cadelas e 26 gatas com histórico de dificuldade durante o parto, aborto, natimorto e morte neonatal, bem como 16 cadelas e 16 gatas sem histórico de dificuldade durante o parto, aborto, natimorto e morte neonatal foram incluídas no projeto. Todas as fêmeas foram submetidas a exame clínico completo e a ultrassonografia para avaliação da viabilidade fetal e duração da gestação. Todas as fêmeas com dificuldade na gestação e/ou parto foram encaminhadas para cirurgia de cesariana ou OSH para retirada do útero e tecidos fetais.

Segundo Lwanga e Lemeshow, (1991) o cálculo do tamanho amostral para a prevalência encontrada de morte fetal, mumificação fetal e abortos em fêmeas atendidas no HOVET/UFRSA, bem como o custo das tecnologias que serão utilizadas será de 8 amostras de útero de cadelas (4 com problemas reprodutivos e 4 sem problemas reprodutivos) e de 10 úteros de gatas (5 com problemas reprodutivos e 5 sem problemas reprodutivos), bem como o *pool* de órgãos fetais (rim e baço) dos fetos das fêmeas escolhidas. O número de amostras escolhidas para este projeto é bem inferior ao total coletado no projeto anterior, entretanto reduzimos o número amostral devido serem tecnologias de alto custo dependentes da variação cambial do dólar e da avaliação da integridade dos ácidos nucleicos.

O exame *pos-mortem* foi realizado de modo asséptico e os tecidos/órgãos fotodocumentados. Esses foram armazenados em freezer até o momento da extração. No Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu sob a coordenação do Professor Livre Docente Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior e no Laboratório de Biologia Molecular das Doenças Infecciosas dos

Animais da FMVZ, campus de Botucatu sob a coordenação da Professora Titular Jane Megid os sangues maternos e tecidos fetais foram previamente negativos para os agentes mais prevalentes em problemas reprodutivos (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Testes moleculares e sequências de primers e probes utilizados

Teste	Micro-organismo	Material analisado	Primer/probe	Sequência 5' a 3'	Referência
Real-time PCR	<i>Canid herpesvirus 1</i>	Sangue, fluido fetal, pool baço+rins, pool fígado+pulmão	CHV-F	ACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATG	Decaro et al., 2010
			CHV-R	CTGGTGTTATTA AACT TTGAAGGCTTTA	
			CHV-PB	6-FAM- TCTCTGGGGTCTTCATCCTTAT CAAATGCG- BHQ1	
PCR convencional	<i>Brucella</i> sp.	Sangue e placenta	ITS66	ACATAGATCGCAGGCCAGTCA	Keid et al. 2007a; Vieira et al, 2004
			ITS279	AGATACC GACGCAAACGCTAC	
High-resolution melting real time PCR	<i>Ehrlichia</i> sp. e <i>Ehrlichia canis</i>	Sangue e pool baço+rins	<i>E. sp.</i>	CTCAGAACGAACGCTGG	
			<i>E. canis</i>	ACCA TTTCTARTGCTA TYCCRTACTA	
Real-time PCR	<i>Anaplasma platys</i>	Sangue	EHL P sense	TTTTTGTCGTAGCTTGCTATGATA	Rotandano et al., 2012
			EHL P antisense	TGTGGGTACCGTCATTATCTTCCCA	
Real-time PCR	<i>Neospora caninum</i>	Sangue e pool baço+rins	NeoF	GTGAGAGGTGGGATACG	Okeoma et al., 2005
			NeoR	GTCCGCTTGCTCCCTA	
Real-time PCR	<i>Parvovirus caninum</i>	Sangue e pool baço+rins	pCPV-2RT F	CAT TGG GCT TAC CAC CAT TT	Kumar e Nandi, 2010
			pCPV-2RT R	CCA ACC TCA GCT GGT CTC AT	
PCR convencional	<i>Leishmania</i> spp.	Sangue	LINR4	GGGTTGGTGTA AAATAGGG	Arransay et al, 2000
			LIN19	CAGAACGCCCTACCCG	

Tabela 2: Testes sorológicos para *Brucella canis* e *Leishmania visceral canina*

Teste	Micro-organismo	Kits, antígeno e anticorpos	Referência
Imunodifusão em gel de ágar (AGID)	<i>Brucella canis</i>	IDGA foi realizada utilizando <i>B. ovis</i> Reo 198 superfície Kit de teste de antígeno (Instituto de Tecnologia do Parana' - Tec-par, Curitiba, Parana', Brasil).	Keid et al., 2008;
Teste de acidificação Rosa bengala (RBT)	<i>Brucella abortus</i>	<i>B. abortus</i> 1119-3 antígeno (Instituto Biológico, São Paub, SP, Brasil) foi realizada para a detecção de soro anticorpos contra Brucella.	Keid et al. 2007b; BRASIL, 2016.
2-mercaptoetanol (2ME-RSAT)	<i>Brucella abortus</i>	D-tec CB <i>Brucella ovis</i> Antigen test kit (Symbiotics Corp., Kansas City, MO, USA)	Keid et al., 2007b; BRASIL, 2016.
Acidificação lenta (RSAT)	<i>Brucella abortus</i>	D-tec CB <i>Brucella ovis</i> Antigen test kit (Symbiotics Corp., Kansas City, MO, USA)	Keid et al., 2007b; BRASIL, 2016.
Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI	<i>Leishmania major</i>	anti IgG <i>Leishmania major</i> (CCZ, São Paulo)	Camargo, 1963

Essas amostras foram obtidas de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Ufersa (nº 23091.006326/2014-88). Os proprietários preencheram um termo de consentimento como critério de inclusão no estudo (Lamm and Njaa, 2012).

5.2 *Metagenômica viral*

A metagenômica viral está diretamente relacionada as novas ferramentas de sequenciamento independentes da sequência. O *MiSeq*® (Illumina, Inc., San Diego, EUA), equipamento de sequenciamento massivo que será utilizado nas pesquisas, com oito corridas realizadas, será um dos equipamentos que utilizaremos no projeto, além do *NextSeq*, também da Illumina, com maior capacidade e rendimento de até 400 milhões de reads. A preparação de DNA e RNA de ácidos nucléicos virais será de acordo com Ulmann et al. (2015).

Além da técnica inovadora que iremos utilizar, a bioinformática utilizada para a análise das sequências obtidas também caracteriza-se como um desafio. Muitos programas estão disponíveis para a análise dos genomas encontrados, mas poucos são os profissionais que tem experiência com a utilização destes programas. Por este motivo, proporemos parceria com a equipe liderada pelo Dr. João Pessoa de Araújo Júnior, do Instituto de Biotecnologia-IBTec da UNESP de Botucatu-SP. Os procedimentos laboratoriais de extração e purificação dos ácidos nucléicos serão baseados na metodologia descrita por Steward e Culley (2010).

5.3 *Sequenciamento do gene RNAr 16S*

O sequenciamento será realizado de acordo com Rajan et al. (2016). Descrevendo brevemente esta tecnologia as amostras de útero de cadelas/gatas serão processadas para o isolamento de DNA total (MO BIO Laboratories, Inc) utilizando o protocolo do fabricante com ligeiras modificações. Para a lise eficiente das bactérias, *beads* de vidro serão adicionadas em 200 ml de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25: 24: 1) pH 7.8 e 8.2. As amostras serão agitadas por 2 minutos e homogeneizada a velocidade de 10 por 5 minutos. Os conteúdos serão centrifugados a 14000 g, e o lisado será transferido para um tubo estéril. O DNA será eluído em TE, pH 8,0, e armazenado a -80° C. A qualidade e quantidade do DNA será avaliada usando um espectrofotômetro (NanoPhotometer Pérola, Denville Scientific, Inc.), eletroforese em gel de agarose, e fluorímetro (Qubit® dsDNA High Sensitivity and dsDNA Broad Range assay, Life Technologies Corporation).

Para a preparação das amostras para os sequenciadores Illumina MiSeq e HiSeq 2000, as bibliotecas de DNA serão preparadas em dois lotes separados. Para o sequenciamento em MiSeq, cerca de 5 mg DNA metagenômico será mecanicamente cortado para 300 e 600 fragmentos de pares

de bases utilizando um instrumento da Covaris S220 (Covaris, Inc). No total, 20 mg de DNA metagenomic foi cortado para preparar várias bibliotecas. O DNA fragmentado foi analisado com um 12000 Kit DNA Agilent em 2100 Bioanalyzer Instrumento (Agilent Technologies, Inc). O DNA cortado será processado com um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen) e eluido em água isenta de nuclease. Um micrograma de DNA metagenômico fragmentada será reparado e adenilado, ligado com adaptadores Illumina, e PCR enriquecido com Illumina índices de seqüenciamento (*barcodes*) usando o DNA Ultra kit biblioteca prep NEBNext para Illumina (Catalog # E7370L, New England BioLabs Inc). Serão preparadas bibliotecas com índices exclusivos utilizando o NEBNext Multiplex Oligos para Illumina Set 1 (Catalog # E7335L, NewEngland BioLabs Inc). Para a sequenciamento em um HiSeq 2000, a biblioteca será preparada usando o mesmo DNA metagenômico utilizando os procedimentos descritos acima. A qualidade e quantidade de todas as bibliotecas serão analisadas em eletroforese (12000 Kit DNA Agilent, 2100 Bioanalyzer Instrumento, Qubit).

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

O cronograma do projeto proposto seguirá de acordo com as etapas propostas na tabela 1.

Tabela 3. Cronograma do projeto proposto

Projeto	Março de 2018 a dezembro de 2018	Janeiro 2019 a julho de 2019	Agosto de 2019 a dezembro de 2019	Janeiro de 2020 a fevereiro de 2020	Março de 2020 a maio de 2020	Junho de 2020 a julho de 2020
Etapa 1	Compra do material	X	X	X	X	X
Etapa 2	X	Sequenciamento massivo	X	X	X	X
Etapa 3	X	X	Análise de Bioinformática	X	X	X
Etapa 4	X	X	X	Revisão de Literatura	X	X

Etapa 5	X	X	X	X	Preparo manuscritos	dos	X
Etapa 6	X	X	X	X	X	Preparo relatório	do

7. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Espera-se identificar a prevalência de infecção por novos agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas em cadelas e gatas, a fim de estabelecer uma associação epidemiológica entre os novos agentes infecciosos e a aquisição das falhas reprodutivas, gerando assim novas perspectivas no controle da doença.

No entanto, embora haja uma proposta central, vale ressaltar que este projeto abre perspectivas para diversas colaborações, visto que o banco de DNA obtido a partir de amostras biológicas de cadelas e gatas poderá ser utilizado para investigação de outros agentes.

Portanto, os dados gerados a partir desse estudo, contribuirá com um maior entendimento sobre aspectos epidemiológicos relacionados a estes novos agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas, bem como poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle.

Do ponto de vista científico, tecnológico e de inovação, as respostas deste projeto serão de impacto direto nos estudos de epidemiologia destas novas possíveis enfermidades propostas, além de que estes resultados a serem gerados poderão futuramente entender melhor a ecoepidemiologia destas enfermidades e assim entendendo esta área poderemos melhorar a metodologia de controle e prevenção destas doenças. Os resultados esperados serão de grande apropriação de conhecimento científico que irão possuir capacidade de absorção e difusão das futuras inovações que poderão ser utilizadas na melhoria do controle e prevenção.

A aprovação da presente proposta nos permitirá dar continuidade as pesquisas de enfermidades infecciosas causadoras de falhas reprodutivas em pequenos animais e desenvolvendo novas ferramentas para o diagnóstico e controle destas enfermidades, principalmente no semi-árido da Caatinga. Como principal resultado espera-se gerar conhecimento relevante que fortaleça o desempenho científico do Brasil, assim aumentando a importância e competitividade internacional da pesquisa brasileira.

A principal disseminação dos resultados será através de publicação em periódicos incluídos no *Journal of Citation Report* (JCR) com fator de impacto igual ou acima da média para a área da Medicina Veterinária fortalecendo a Pós-Graduação da UFERSA.

8. COMPILAÇÃO SUCINTA DAS ATIVIDADES DE PESQUISA DESENVOLVIDAS PELO REQUERENTE A BOLSA DE PRODUTIVIDADE EM MEDICINA VETERINÁRIA PQ-2

Após a minha conclusão do doutorado em 2012 em Medicina Veterinária na UNESP de Botucatu com estágio de Doutorado Sanduíche no Instituto *de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) da Universidade Castilla de la Mancha* na Espanha, passei em primeiro lugar no concurso público para Médico Veterinário do Hospital Veterinário (HOVET) da UFERSA.

Nestes 4 anos (2013-2016) de servidor público ativei pela primeira vez o setor de Diagnóstico por Imagem do HOVET, onde realizamos mais de 2000 exames ao ano.

Em 2014 aprovei junto ao MEC, pela primeira vez na instituição e no estado do Rio Grande do Norte 40 bolsas de residência em Área Profissional da Saúde em Medicina Veterinária em 7 diferentes programas de residência, que fez com que aprovássemos o primeiro regimento da residência da UFERSA junto ao CONSEPE (Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão) e que criássemos também pela primeira vez a COREMU (Comissão de Residência Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde) a qual sou o presidente.

Pós-graduação

Em 2013 fui convidado a ser colaborador do Programa de Pós-Graduação em nível de orientador de Mestrado e Doutorado do PPGCA (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,

conceito 4 da CAPES) o qual fui o membro que mais publicou no último triênio, o que levou a me tornar membro permanente da PPGCA em 2015.

Coordenação de Pós-graduação

Atualmente sou coordenador geral dos 7 programas de residência como presidente da COREMU e Coordenador da Residência em Diagnóstico por Imagem de Animais de Companhia.

Disciplinas na Pós-Graduação

Sou responsável por 3 disciplinas: 1 na PPGCA para o mestrado e doutorado (PCA0097- Tópicos especiais em doenças infecciosas dos animais domésticos) e 3 na Residência (LAT0177- Diagnósticos diretos e indiretos nas doenças infecciosas dos animais, LAT0180- Anatomia radiológica e ultrassonográfica, LAT0181- Tópicos avançados em diagnóstico por imagem veterinário).

Orientações

Até a presente data orientei 14 alunos de iniciação científica (atualmente 2 alunos de graduação com bolsa de IC) , 4 alunos de especialização/residência em Medicina Veterinária e 2 alunos de mestrado. Atualmente oriento 6 alunos de graduação em Diagnóstico por Imagem, 2 residentes de Residência do MEC, 2 alunos bolsistas de Iniciação Científica, 3 alunos de mestrado e 1 aluno de doutorado na PPGCA na área de sanidade animal. Para o novo processo seletivo (setembro de 2017) da PPGCA já disponho de mais 2 vagas de orientação, 1 de mestrado e outra de doutorado.

Grupos de pesquisa

Faço parte de 3 grupos de pesquisa (Estudos em Diagnóstico por Imagem e Doenças Infecciosas nos animais do Semi-Árido – UFERSA, Enfermidades Infecciosas dos Animais – UNESP, Grupo de Estudo e Pesquisa para Saúde Animal - GEPSA – UFES) e colaboração com outros pesquisadores em diversas universidades, onde estão em andamento 5 projetos de pesquisa e 1 de extensão sob minha responsabilidade.

Revisor ou membro de corpo editorial

Sou revisor de 2 revista *Quallis A* e 3 de *Quallis B* e membro de corpo editorial de mais 1 revista.

Prêmios

De 2013 para cá como pesquisador e funcionário do HOVET fui funcionário homenageado de 2 turmas de graduação em Medicina Veterinária e em 2013 recebi o prêmio *The Professor Tielen Foundation, XVIth International Congress on Animal Hygiene*.

Livro e capítulo de livro

Juntamente com a Professora Patrícia Deps da Faculdade de Medicina da UFES somos autores do livro: *Mycobacterium leprae* em tatus selvagens no Estado do Espírito Santo. 1. ed. Novas Edições Acadêmicas, 2015. v. 1. 112p. Também sou autor do capítulo de livro: GUEDES, R. M. C.; ANTUNES, J.M.A.P. Epidermite Exsudativa Suína. In: Márcio Garcia Ribeiro; Jane Megid; Antônio Carlos Paes. (Org.). Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1ed.São Paulo: Roca, 2016, v. 1, p. 100-115.

No final de 2016 foi publicado pela Editora INTECH no livro *Canine Medicine* o capítulo: *Infectious causes of abortion, stillbirth and neonatal death in bitches*.

Publicações

Nestes 3 anos fazendo parte da PPGCA e como pesquisador publicamos um total de 32 publicações com fator h variando de 4 a 6, sendo 2 publicações em periódicos classificados como A1, 14 em A2, 7 em B1, 1 em B3, 4 em B5 e o restante em periódicos não classificáveis junto a plataforma Sucupira.

9. DEMAIS INFORMAÇÕES RELEVANTES SOBRE O PROJETO A SER DESENVOLVIDO

O projeto de pesquisa já está aprovado (405334/2016-8) na última chamada universal de 2016 do CNPq (MCTI/CNPq Nº 01/2016) pelo proponente deste projeto que custeará a coleta, armazenamento das amostras, execução dos testes sorológicos em Mossoró-RN, bem com o transporte das amostras para os laboratórios de referências e execução do sequenciamento e metagenômica viral.

Além das instalações disponíveis para realização das necropsias e sorologias no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da UFERSA o projeto disponibilizará das instalações dos Laboratórios do Instituto de Biotecnologia (IBTec) - UNESP - Botucatu – SP do Departamento de

Microbiologia e Imunologia sob a supervisão do Professor Adjunto Livre Docente Dr. João Pessoa de Araújo Júnior (Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B), *lattes*: <http://lattes.cnpq.br/5326072118518067>, Email: jpessoa@ibb.unesp.br.

O projeto de pesquisa terá a sua disponibilidade a infra-estrutura dos laboratórios da UFERSA, e da UNESP para realização das tecnologias propostas. Como apoio técnico o projeto de pesquisa conta com a equipe técnica e de colaboradores citados responsáveis pela execução, discussão e publicação dos resultados.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, A.; ANDINO, R. Library preparation for highly accurate sequencing of RNA viruses. *Nature Prot.*, v.9, n.7, p.1760-1769, 2014.

ARANSAY, A.M., SCOULICA, E., TSELENTIS, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5), 1933–1938.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (Org.). Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT):Secretaria de Defesa Agropecuária. 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 04 fev. 2016.

BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., MEIER C., SCHUMANN P., PETERS G. & VON EIFF C. 2004. Development and evaluation of a quality- controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA- based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42(11):4988-4995.

BEXFIELD, N.; KELLAM, P. Metagenomics and the molecular identification of novel virus. *Vet. J.*, v.190, n.2, p.191-198, 2011.

BINLADEN J, GILBERT MTP, BOLLBACK JP, PANITZ F, BENDIXEN C, NIELSEN R, et al. The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS ONE.* 2007;2(2):e197.

BLOMSTRÖM, A.-L. Viral metagenomics as an emerging and powerful tool in veterinary medicine. *Vet. Quarterly*, v.31, n.3, p.107-114, 2011.

- CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 6, p. 117–118, 1963
- CARMICHAEL, L.E.; SCHLAFFER, D.H.; HASHIMOTO, A. Minute virus of canine (MCV, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest* 1994;6:165–174.
- CASTRIGNANO, S.B.; NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; KISIELIUSB, J.J.; UEDA- ITOB, M.; BRANDAO, P.E.; CURTI, S.P. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and electron microscopy analysis. *Virus Res.*, v.178, p.364-373, 2013.
- CHO, I, M.J. BLASER, The human microbiome: at the interface of health and disease, *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 260e270.
- Crosby LD, Criddle CS. Gene capture and random amplification for quantitative recovery of homologous genes. *Mol Cell Probes.* 2007;21(2): 140–7.
- DALY, G.M.; BEXFIELD, N.; HEANEY, J.; STUBBS, S.; MAYER, A.P.; PALSER, A.; KELLAM, P.; DROU, N.; CACCAMO, M.; TILEY, L.; ALEXANDER, G.J.M.; BERNAL, W.; HEENEY, J.L. A Viral Discovery Methodology for Clinical Biopsy Samples Utilising Massively Parallel Next Generation. *PLoS One*, v.6, n.12, p.28879, 2011.
- D'AMORE R, IJAZ UZ, SCHIRMER M, KENNY JG, GREGORY R, DARBY AC, SHAKYA M, PODAR M, QUINCE C, HALL N. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* (2016) 17:55.
- DECARO, N.; AMORISCO, F.; DESARIO, C. et al. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *J Virol Methods* 2010;169:176–180.
- DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Viral Reproductive Pathogens of Dogs and Cats. *Vet Clin Small Anim* 2012;42:583-598.
- DELWART, E.R. Viral metagenomics. *Rev. Med. Virol.*, v.17, p.115-131, 2007.
- GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 2008;70:270-285.

GREENSILL, J.; SHELDON, J.A.; RENWICK, N.M.; BEER, B.E.; NORLEY, S.; GOUDSMIT, J.; SCHULZ, T.F. Two distinct gamma-2 Herpesvirus in African Green monkeys: a second gamma-2 herpesvirus lineage among Old World Primates? *J. Virol.*, v.74, n.3, p.1572-1577, 2000.

GROSSKOPF T, SOYER OS. Synthetic microbial communities. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 18:72–77.

GUPTILL L, SLATER LN, WU CC, LIN TL, GLICKMAN LT, WELCH DF, et al. Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998. 23;65(2-4):177-89.

HUGGETT JF, LAVER T, TAMISAK S, NIXON G, O’SULLIVAN DM, ELASWARAPU R, et al. Considerations for the development and application of control materials to improve metagenomic microbial community profiling. *Accred Qual Assur.* 2013;18(2):77–83.

HUMAN MICROBIOME PROJECT, Structure, function and diversity of the healthy human microbiome, *Nature* 486 (2012) 207e214.

IMPERIALE, M.J; CASADEVALL, L. The Importance of Virology at a Time of Great Need and Great Jeopardy. *mBio*, v.6, n.2, 2015.

JOHNSTON, S.D.; RAKSIL, S. Fetal loss in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1987; 17:535–54.

JONES, M.S.; KAPOOR, A.; LUKASHOV, V.V.; SIMMONDS, P.; HECHT, F.; DELWART, E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J. Virol.*, v.79, n.13, p.8230-8236, 2005.

KEID, L. B. et al. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. *Veterinary Research Communications*, [s.l.], v. 31, n. 8, p.951-965. 16 fev. 2007. a

KEID, L. B. et al. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, [s.l.], v. 68, n., p.1260-1270. Jul. 2007. b

KEID, L.B.; SOARES,R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R.; RICHTZENHAIN, L.J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res Vet Sci* 2009; 86(1):22-6.

KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; SALGADO, V.R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L.J. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. *Vet Rec.* 2010; 17: 167(3):96-9.

KLINDWORTH A, PRUESSE E, SCHWEER T, PELIES J, QUAST C, HORN M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2012;20:1–11.

KONSTANTINIDIS KT, J.M. TIEDJE, Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead, *Curr. Opin. Microbiol.* 10 (2007) 504e509.

KUCZYNSKI J, C.L. LAUBER, W.A. WALTERS, L.W. PARFREY, J.C. CLEMENTE, D. GEVERS, R. KNIGHT, Experimental and analytical tools for studying the human micro- biome, *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 47e58.

KUMAR, MANOJ; NANDI, SUKDEB. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *Journal Of Virological Methods*, [s.l.], v. 169, n. 1, p.198-201, out. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.06.007.

KUPROVIC, M.; BAMFORD, D.H. Revealing Virus-Host Interplay. *Science*, v.333, p. 45-46, 2011.

KUSTRITZ, M.V.R. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology* 2005; 64:755-765.

KUSTRITZ MVR. Clinical management of pregnancy in cats. *Theriogenology* 66 (2006) 145–150.

LAMM, C.G.; NJAA, B.L. Clinical Approach to abortion, stillbirth, and neonatal death in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim* 2012; 42:501-513.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, DC, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LASSMANN T, HAYASHIZAKI Y, DAUB CO. SAMStat: monitoring biases in next generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2011;27(1):130–1.

LAW, J.; JOVEL, J.; PATTERSON, J.; FORD, G.; O’KEEFE, S.; WANG, W.; MENG, B.; SONG, D.; ZHANG, Y.; TIAN, Z.; WASILENKO, S.T.; RAHBARI, M.; MITCHELL, T.; JORDAN, T.; CARPENTER, E.; MASON, A.L.; WONG, G.K-S. Identification of hepatotropic viruses from plasma using deep sequencing: a next generation diagnostic tool. *PLoS One*, v.8, n.4, p.60595, 2013.

LI J, H. JIA, X. CAI, H. ZHONG, Q. FENG, S. SUNAGAWA, M. ARUMUGAM, J.R. KULTIMA, E. PRIFTI, T. NIELSEN, A.S. JUNCKER, C. MANICHANH, B. CHEN, W. ZHANG, F. LEVENEZ, J. WANG, X. XU, L. XIAO, S. LIANG, D. ZHANG, Z. ZHANG, W. CHEN, H. ZHAO, J.Y. AL-AAMA, S. EDRIS, H. YANG, J. WANG, T. HANSEN, H.B. NIELSEN, S. BRUNAK, K. KRISTIANSEN, F. GUARNER, O. PEDERSEN, J. DORE, S.D. EHRLICH, H.I.T.C. META, P. BORK, J. WANG, H.I.T.C. META, An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 834e841.

LIM K, FURUTA Y, KOBAYASHI I. Large variations in bacterial ribosomal RNA genes. *Mol Biol Evol.* 2012;29(10):2937–48.

LIU Z, LOZUPONE C, HAMADY M, BUSHMAN FD, KNIGHT R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucl Acids Res.* 2007;35(18):e120.

LUO C, R.L. RODRIGUEZ, K.T. KONSTANTINIDIS, A user's guide to quantitative and comparative analysis of metagenomic datasets, *Methods Enzymol.* 531 (2013) 525e547.

McELHOE, J.A.; HOLLAND, M.M.; MAKOVA, SU, M.S.-W.; PAUL, I.M.; BAKER, C.H.; FAITH, S.A.; YOUNG, B. Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq. *Forensic Sci. Internat.: Genetics*, 2014;13:20-9.

MEYER M, STENZEL U, MYLES S, PRUFER K, HOFREITER M. Targeted high-throughput sequencing of tagged nucleic acid samples. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(15):e97.

MEYER M, STENZEL U, HOFREITER M. Parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Nat Protoc.* 2008;3(2):267–78.

MEYER F, D. PAARMANN, M. D'SOUZA, R. OLSON, E.M. GLASS, M. KUBAL, T. PACZIAN, A. RODRIGUEZ, R. STEVENS, A. WILKE, J. WILKENING, R.A. EDWARDS, The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes, *BMC Bioinformatics* 9 (2008) 386.

MIR F, FONTAINE E, ALBARIC O, GREER M, VANNIER F, SCHLAFER DH, FONTBONNE A. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. *Theriogenology.* 2013, 15;79(2):312-22.

MUNNINK, B.B.O.; FARSANI, S.M.J.; DEIJS, M.; JONKERS, J.; VERHOEVEN, J.T.P.; IEVEN, M.; GOOSSENS, H.; DE JONG, M.D; BERKHOUT, B.; LOENS, K.; KELLAM, P.; BAKKER, M.; CANUTI, M.; COTTEN, M.; VAN DER HOEK, L. Antologous antibody capture to enrich immunogenic viruses for viral discovery. *PLoS One*, v.8, n.11, p.785454, 2013.

NAMIKI T, T. HACHIYA, H. TANAKA, Y. SAKAKIBARA, MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) e155.

NOLTE F.S. & CALIENDO A.M. 2003. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H.,

NICHOLS D, N. CAHOON, E.M. TRAKHTENBERG, L. PHAM, A. MEHTA, A. BELANGER, T. KANIGAN, K. LEWIS, S.S. EPSTEIN, Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 2445e2450.

OKEOMA, C.M. ET AL. *Neospora caninum*: Quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Experimental Parasitology*, [s.l.], v. 110, n. 1, p.48-55, maio 2005. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.exppara.2005.01.008.

Pinto AJ, Raskin L. PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PLoS One*. 2012;7(8):e43093.

PERTOLDI C, TOKARSKA M, WOJCIK JM, DEMONTIS D, LOESCHCKE V, GREGERSEN VR, et al. Depauperate genetic variability detected in the American and European bison using genomic techniques. *Biol Direct*. 2009;4:48.

PFALLER M.A. & YOLKEN R.H. (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington.

PFLUGHOEFT KJ, J. VERSALOVIC, *Human microbiome in health and disease*, *Annu. Rev. Pathol.* 7 (2012) 99e122.

PORETSKY R, R.L. RODRIGUEZ, C. LUO, D. TSEMENTZI, K.T. KONSTANTINIDIS, Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics, *PLoS One* 9 (2014) e93827.

RANJAN R, RANI A, METWALLY A, MCGEE AS, PERKINS DL. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 (2016) 967e977

REILLY GA, BAILIE NC, MORROW WT, MCDOWELL SW, ELLIS WA. Feline stillbirths associated with mixed *Salmonella typhimurium* and *Leptospira* infection. *Vet Rec* 1994; 135:608.

RINKE C, SCHWIENTEK P, SCZYBRA A, IVANOVA NN, ANDERSON IJ, CHENG JF, et al. Insight into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*. 2013; 499:431–7.

ROTONDANO, TEREZA EMMANUELLE DE FARIAS et al. An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *The Scientific World Journal*, [s.l.], v. 2012, p.1-6, 2012. Hindawi Publishing Corporation. DOI: 10.1100/2012/605743.

SANSCHAGRIN S, E. YERGEAU, Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons, 2014, p. e51709.

SCHLAFER, D.H. Canine and feline abortion diagnostics. *Theriogenology* 2008; 70:327–31.

SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.85, p.265-276, 2009.

SIMS D, I. SUDBERY, N.E. ILOTT, A. HEGER, C.P. Ponting, Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses, *Nat. Rev. Genet.* 15 (2014) 121e132.

- SOERGEL DAW, DEY N, KNIGHT R, BRENNER SE. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* 2012;6:1440–4.
- STEWART, EJ, Growing unculturable bacteria, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 4151e4160.
- STEWART, G.F.; CULLEY, A.I. Extraction and purification of nucleic acids from viruses. *MAVE - Chapter 16*, p.154–165, 2010.
- THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. *Metagenomics - a guide from sampling to data analysis.* *Microbial Informat. Experiment.* v.2, n.3, p.1-12, 2012.
- THURBER, V.B., HAYNES, M., BREITBART, M., WEGLEY, L., ROWHER, F. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nature* 4, 4, 470-479, 2009.
- QUINCE C, LANZEN A, CURTIS TP, DAVENPORT RJ, HALL N, HEAD IM, et al. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods.* 2009;6:639–41.
- QIN J, R. LI, J. RAES, M. ARUMUGAM, K.S. BURGDORF, C. MANICHANH, T. NIELSEN, N. PONS, F. LEVENEZ, T. YAMADA, D.R. MENDE, J. LI, J. XU, S. LI, D. LI, J. CAO, B. WANG, H. LIANG, H. ZHENG, Y. XIE, J. TAP, P. LEPAGE, M. BERTALAN, J.M. BATTO, T. HANSEN, D. LE PASLIER, A. LINNEBERG, H.B. NIELSEN, E. PELLETIER, P. RENAULT, T. SICHERITZ-PONTEN, K. TURNER, H. ZHU, C. YU, S. LI, M. JIAN, Y. ZHOU, Y. LI, X. ZHANG, S. LI, N. QIN, H. YANG, J. WANG, S. BRUNAK, J. DORE, F. GUARNER, K. KRISTIANSEN, O. PEDERSEN, J. PARKHILL, J. WEISSENBACH, H.I.T.C. META, P. BORK, S.D. EHRLICH, J. WANG, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature* 464 (2010) 59e65.
- ULLMANN LS, TOZATO CC, MALOSSI CD, CRUZ, TF, CAVALCANTE, RV, KURISSIO, JK, CAGNINI, DQ, RODRIGUES, MV, BIONDO AW, ARAUJO JR, JP. Comparative clinical sample preparation of DNA and RNA viral nucleic acids for a commercial deep sequencing system (Illumina MiSeq®). *Journal of Virological Methods* 220 (2015) 60–63 .
- VAN DIJK EL, JASZCZYSZYN Y, THERMES C. Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Exp Cell Res.* 2014;322(1):12–20.
- VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: a review. *Theriogenology* 2008;70:304–319.
- VIEIRA, N R. Desenvolvimento de uma Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de *Brucella spp.* em amostras de sangue de cães naturalmente infectados. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

WERNER JJ, ZHOU D, CAPORASO JG, KNIGHT R, ANGENENT LT. Comparison of Illumina paired-end and single-direction sequencing for microbial 16S rRNA gene amplicon surveys. *ISME J.* 2012;6(7):1273–6.

WOOLEY, J.C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. *PLoS Comput. Biol.*, v.6, n.2, 2010.

ZHU W, A. LOMSADZE, M. BORODOVSKY, Ab initio gene identification in meta- genomic sequences, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e132.

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Informações do Projeto

Título do Projeto:	Inovação e redução de custos na tecnologia de produção in vitro de embriões de bovinos criados no semiárido		
Objetivo Geral:	Desenvolver novo produto com consequente modificação de técnica para a produção in vitro de embriões		
Objetivo Específico:	a) Desenvolver um equipamento, a partir de dois protótipos para maturação e fecundação in vitro de oócitos e cultivo in vitro de embriões bovinos, portátil, de baixo custo e que confira estabilidade de temperatura, atmosfera gasosa, e eficiência semelhante a equipamentos produzidos comercialmente para a produção in vitro de embriões. b) Comparar dois diferentes protótipos com o equipamento convencional sobre as taxas de maturação e fecundação in vitro de oócitos e produção de blastocistos a partir de material de animais de abatedouro bem como avaliar qualitativamente essas estruturas pela avaliação morfológica, microscopia de fluorescência e análise da expressão de genes relacionados à sobrevivência e qualidade oocitária/embrionária por PCR em tempo real; c) Comprovar a eficiência do equipamento produzido sobre a taxa de gestação e nascimento de crias a partir de embriões produzidos in vitro e transferidos para receptoras.		
Resumo:	Este projeto visa desenvolver uma tecnologia inovadora na produção in vitro de embriões bovinos a partir da produção de um equipamento de menor porte, menor custo e tão eficiente quanto a incubadora de CO2 usualmente adotada em tais procedimentos. O projeto contribuirá para a disseminação da tecnologia de produção in vitro de embriões bovinos na região nordeste e com o melhoramento genético dos rebanhos da região. Contará ainda com uma equipe experimentada e formação multidisciplinar, com profissionais envolvidos da UFERSA em colaboração com a UNESP e Agrícola Famosa, empresa referência em exportação de frutos e que vem incrementando o seu investimento na pecuária com propostas de sustentabilidade pioneiras como, por exemplo, o uso de toneladas de refúgio de melão para a alimentação de bovinos. A execução se dará em três anos, os quais serão divididos em duas etapas. Na etapa I serão fabricados diferentes protótipos para a incubação de oócitos (nome técnico de óvulos), que serão maturados e fecundados, e de futuros embriões. A partir dos protótipos, serão realizados testes in vitro em 600 oócitos colhidos de bovinos recém abatidos no matadouro local e os embriões gerados serão avaliados quanto à morfologia e viabilidade. Na etapa II serão realizados protocolos utilizando fêmeas da raça nelore que doarão 400 oócitos para que sejam realizados os testes com ambos os métodos de incubação, convencional e melhor protótipo. Posteriormente, serão realizadas aspirações de oócitos em 40 doadoras de genética superior para a produção in vitro dos embriões com objetivo de transferência de um número mínimo de 200 embriões em igual número de vacas receptoras e avaliação da eficiência da técnica por ocasião dos nascimentos. Além disso, pretende-se difundir a tecnologia em congressos e associações de criadores e auxiliar na solução de problemas com biotecnologias reprodutivas.		
Fundo:	FUNDECI - Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico		
Edital:	EDITAL FUNDECI 02/2017 – PRODUTIVIDADE E COMPETITIVIDADE - Inovações Tecnológicas e Organizacionais para Incremento da Produtividade e Competitividade nos Setores Produtivos		
Data da Inscrição:	3/7/2017	Situação:	Projeto Recebido
Duração:	36 meses		
Linha de Pesquisa:	Inovação		
Coordenador:	Marcelo Barbosa Bezerra		
Coordenador Adjunto:	clodomiro alves junior		

Entidade / Proponente

Nome:	Universidade Federal Rural do Semi-Árido	Tipo:	Jurídica
Telefone:	(84)3317-8296	E-Mail:	proppg@ufersa.edu.br
Endereço:	Avenida Francisco Mota, 572 - Presidente Costa e Silva - MOSSORO / Rio Grande do Norte		
Natureza Jurídica:	Autarquia Federal	CNAE:	8532-5/00 - Educação superior - graduação e pós-graduação
Denominação Abreviada:	UFERSA	CNPJ:	24.529.265/0001-40
Titular:	Jose de Arimatea de Matos		
Responsável:	Marcelo Barbosa Bezerra		
CPF:	484.266.283-20	RG:	94016021639
Telefone:	84988069660	Email:	mbezerra@ufersa.edu.br

Localizações

Cidade:	MOSSORO	UF:	Rio Grande do Norte
----------------	---------	------------	---------------------

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Participantes

Tipo de Participação:	Conveniente	Tipo:	Jurídica
Nome:	Fundação Guimarães Duque	E-Mail:	gestao@fgduque.org.br
Telefone:	(84)3312-0503	CNAE:	8411-6/00 - Administração pública em geral
Endereço:	Avenida Francisco Mota, 572 - Costa e Silva - MOSSORO / Rio Grande do Norte		
Natureza Jurídica:	Fundação Privada	CNPJ:	08.350.241/0001-72
Denominação Abreviada:	FGD		
Titular:	André Pedro Fernandes Neto		
Tipo de Participação:	Interveniente	Tipo:	Jurídica
Nome:	AGRICOLA FAMOSA LTDA	E-Mail:	neilson@agr famosa.com.br
Telefone:	(84)99123-8987	CNAE:	0119-9/07 - Cultivo de melão
Endereço:	FAZENDA FAMOSA - SÍTIO GRAVIER - ICAPUI / Ceará		
Natureza Jurídica:	Empresa Individual de Responsabilidade Limitada (de Natureza Empresária)	CNPJ:	00.474.300/0002-93
Denominação Abreviada:	AGRICOLA FAMOSA		
Titular:	RICHARD AUGUST MULLER		

Questionário

1 - Tipo de projeto

1 - Tipo de projeto

Projeto de Inovação

2 - Justificativa

1 - Justificativa

O Brasil é o maior produtor de embriões bovinos in vitro do mundo, e essa posição deve-se, sobretudo aos estados das regiões sudeste e centro-oeste. A produção in vitro de embriões (PIVE) é uma das biotécnicas que melhor contribui para aumento e melhoria de rebanhos, inclusive com animais mais jovens e com melhor ganho genético. A PIVE no Nordeste ainda é predominantemente experimental, mantendo o mercado comercial muito aquém do seu potencial máximo.

Com o advento da lei 13.243/2016, mais conhecida como Marco Legal de Ciência, Tecnologia e Inovação, abriu-se uma nova perspectiva de interação da academia com empresas para compreenderem as demandas de mercado. Uma limitação para a difusão da PIVE está diretamente relacionada ao custo operacional do processo. A implantação de um laboratório de PIVE in locu e a utilização de mão-de-obra especializada são os principais fatores limitantes para a aplicação comercial desta tecnologia em nossa região. Assim, faz-se necessária a redução do custo de implantação e manutenção de laboratórios de PIVE para melhoria dos nossos rebanhos.

O desenvolvimento de um equipamento de incubação de oócitos e embriões portátil e de baixo custo que garanta os mesmos resultados obtidos com os equipamentos convencionais de incubação abre perspectivas extraordinárias na biotécnica e, com a execução desse projeto, há a expectativa em provar a que a mesma pode atender às demandas do setor com uma melhor relação custo/benefício. O envolvimento de pesquisadores experimentados e inclusive, com um pioneiro no país, dão perspectivas promissoras ao projeto. Saliente-se que o mesmo tem total interesse do setor produtivo, destacando o papel da Agrícola Famosa, que compreende e investe neste projeto para o melhoramento genético e desenvolvimento de tecnologia local a partir da concessão de animais, infraestrutura e mão-de-obra qualificada, além dos critérios aqui estabelecidos de contrapartida no edital para viabilizar a pesquisa.

3 - Revisão de Literatura

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

1 - Revisão de Literatura

A produção in vitro de embriões (PIVE) consiste na realização, em laboratório, de três passos biológicos: colheita e maturação in vitro (MIV) dos oócitos, fecundação in vitro (FIV) e cultivo in vitro de embriões (CIV) (Thompson, 2000). Nessas etapas é necessário o controle de parâmetros como temperatura, qualidade, composição e umidade do ar para o desenvolvimento do embrião (Rodrigues et al., 2000; Jain et al., 2016). Uma das grandes diferenças entre o ambiente in vivo (no animal) e laboratorial in vitro, é a tensão de oxigênio, visto que no animal essa tensão é menor que nos sistemas artificiais (Van Soom et al., 2002). A correta atmosfera tem aumentado as taxas de desenvolvimento embrionário, reduzindo o acúmulo de radicais livres no embrião (Corrêa et al., 2008). No laboratório de PIVE, a incubadora é fundamental para garantir o ambiente com as condições ideais para o desenvolvimento embrionário (Jain et al., 2016), trata-se de um equipamento geralmente importado e de alto custo e de grandes dimensões (Miranda et al., 2007), que faz com que laboratórios de PIVE geralmente fiquem distantes das fazendas, sobretudo no nordeste do país. O transporte do embrião é uma alternativa para difundir essa biotecnologia para outras regiões, no entanto esse tempo gasto interfere diretamente na viabilidade dos embriões e nas taxas de prenhez (Marinho et al., 2012). A criação e implementação de sistemas de transporte e incubação de baixo custo, com controle da atmosfera gasosa representa uma alternativa para redução dos custos da PIVE e poderá contribuir para a difusão e desenvolvimento da pecuária em vários locais que tenham carência da tecnologia, notadamente no nordeste. Considerando-se que os microambientes para incubação e transporte necessitam de tecnologia que está mais acessível e há necessidade de aperfeiçoamento desses sistemas, a propagação dessa biotecnologia da reprodução ajudará no incremento da produtividade do rebanho bovino no semi-árido.

4 - Metodologia e Gestão do Projeto

1 - Metodologia

A execução se dará em três anos, os quais serão divididos em duas etapas. Na etapa I serão desenvolvidos dois diferentes protótipos para a incubação de oócitos (nome técnico de óvulos) e embriões, com dois formatos (cilíndrico e cúbico) com peso inferior a 4kg, ergonômicas e que mantenham a viabilidade de oócitos e embriões por ocasião do transporte e cultivo. Em ambos os casos possuirão paredes duplas de teflon, cujo interior será encapsulado material com mudança de fase (PCM) com combinações de aquecedores, parafina e octadecano para garantir a temperatura numa faixa estreita de valor, próximo a 38,5°C. As tampas terão vedação e serão inseridos sensores associados ao kit arduino para monitoramento e controle automático da temperatura, umidade, pressão e concentração de CO₂. A partir dos protótipos, serão realizados testes in vitro em oócitos colhidos de bovinos recém abatidos no matadouro local e os embriões gerados serão também avaliados quanto à viabilidade, com utilização de microscopia de fluorescência e qualidade por análise de expressão de genes pela técnica de PCR em tempo real. Na etapa II, uma vez concluídos os testes in vitro, será escolhido o melhor protótipo e realizada a produção de embriões a partir de oócitos de vacas. Para tanto, vacas das raças nelore serão submetidas à coleta de 400 oócitos por aspiração folicular guiada por ultrassom os quais serão incubados pelos equipamentos convencional e melhor protótipo da Etapa I. Uma vez confirmada a eficiência dos métodos, 500 oócitos de 40 doadoras nelore e girolando serão aspirados e submetidos à maturação, fecundação e cultivo in vitro dos embriões os quais serão transferidos para receptoras previamente sincronizadas (número mínimo de 200 embriões em igual número de vacas receptoras) para posterior avaliação da eficiência da técnica por ocasião do diagnóstico de gestação por ultrassonografia e dos nascimentos.

2 - Gestão do Projeto

A gestão técnica será coordenada pelo proponente com tese de doutorado considerada pioneira no país sobre transplante ovariano (BEZERRA, 2010). Nesta tese foi realizada PIVE em bovinos após o transplante em outra espécie, é ainda experiente com rotina laboratorial e à campo de PIVE na UNESP/Jaboticabal-SP e coordena um laboratório no tema. Indicado a premiação em reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) entidade de médicos, veterinários, biólogos e biotecnologistas relacionadas a diferentes ramos da reprodução. Como coordenador adjunto foi indicado o Prof. Dr. Clodomiro Alves Júnior, físico, doutor em Engenharia de Materiais e Presidente da Sociedade Latino-americana de Biomateriais, órgãos artificiais e Engenharia de tecidos. Também compõem a equipe: o Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia (UNESP-Jaboticabal-SP), pioneiro reconhecido no meio como um dos "pais" da produção in vitro de bovinos no Brasil, a Dra. Marina R. Lima, (Pós-doutoranda da UNESP-Jaboticabal), a Dra. Marcia Viviane A. Saraiva, experiente em manipulação de embriões que juntamente com o Prof. Dr. Carlos Eduardo B. de Moura, usarão suas experiências na avaliação de embriões, A Dra. Michelly F. de Macedo, em obstetrícia e exames laboratoriais, o Dr. Raimundo A. Barreto Junior; A equipe contará zootecnista Felipe Coelho e o Veterinário Evilásio Neto, da empresa parceira, que auxiliarão na condução dos passos subsequentes da PIVE em que pesem a seleção, a transferência de embriões e o desejado parto. A Gestão financeira será pela FUNDAÇÃO GUIMARÃES DUQUE (FGD), entidade com personalidade jurídica de natureza privada, sem fins lucrativos, com sede e foro na cidade de Mossoró-RN e reconhecida como de Utilidade Pública Municipal pela Lei nº 1.538/2001, de 06/09/01, e de Utilidade Pública Estadual pela Lei nº 7.982, de 14/09/01. É credenciada no MEC e MCT sob nº de registro 179, Lv. I, f. 61, em 05/12/2000 e tem experiência no gerenciamento de projetos.

5 - Papel dos Parceiros

1 - Papel dos Parceiros

Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) terá o papel principal de coordenar o projeto, e utilizará seus recursos humanos para execução do mesmo, disponibilizando professores e pesquisadores com a mais alta qualificação na área do projeto, além de estudantes de pós-graduação e graduação que trabalharão na execução do mesmo. A universidade cederá também toda a estrutura física dos laboratórios de Plasma, onde será desenvolvido o equipamento de incubação de oócitos e embriões, e o de Produção in vitro de Embriões, no qual o referido equipamento será testado e onde será desenvolvida nova tecnologia de PIVE.

A AGRÍCOLA FAMOSA terá sua importância no fornecimento de animais para uso experimental, tanto para coleta de oócitos como de fêmeas receptoras. Todos os animais terão manejo controlado com alimentação previamente definida e disponibilizará ainda matrizes de genética comprovada. Além disso, esta empresa disponibilizará uma equipe treinada para auxiliar no manejo diário dos animais e nos procedimentos de sincronização de estro, coleta de oócitos e transferência dos embriões produzidos.

Os profissionais da Universidade Estadual Paulista - UNESP, com a tradição de ser considerada o "berço" da produção in vitro no país cede o seu pioneiro na área para este projeto e, juntamente com outra profissional, farão a consultoria técnica científica para a elaboração dos meios e validação dos ensaios, atuará na orientação das atividades e intermediará junto a empresas o contato para uma pretensa comercialização do protótipo.

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

6 - Viabilidade e Resultados

1 - Infraestrutura a ser utilizada

A primeira etapa do presente trabalho referente à produção de um novo sistema de incubação será realizada no LabPlasma – Laboratório de processamento de materiais por plasma – da UFERSA. Este laboratório possui vários equipamentos para testar novos materiais em procedimentos propostos, mas necessita adquirir Medidor CO₂ para calibragem dos gases, Reator 5100 semelhante ao da marca Parr, utilizado no processo de polimerização radicalar, placa de aquecimento, agitador magnético e banho termostático para uso de químicos. Ainda a primeira etapa e a segunda, serão executadas no Laboratório de Transplantes Gonadais e PIVE (LTGPIVE) – UFERSA. Este laboratório dispõe de uma infraestrutura básica para a realização dos trabalhos propostos e necessita de micropipetas de volume variável para preparo de reagentes, chapa aquecedora digital para manutenção de temperatura de embriões, microscópio trinocular para avaliação de sêmen, lupas, microscópio invertido trinocular com sistema de fluorescência e captação de imagens para avaliar qualidade embrionária, Fyrite para aferição de CO₂ interno, cilindros para CO₂ com válvulas e manômetros para incubadora convencional de CO₂ e protótipos, centrífuga refrigerada para processamento de semen e reagentes, osmômetro para verificação de meios, balança analítica para pesagem de reagentes, banho maria de circulação para equilíbrio térmico de reagentes, semen e outros, cabine de segurança biológica classe II para preparo de reagentes estéreis, fluxo laminar unidirecional (classe 1) para manipulação de gametas e embriões, ultrassom para aspiração folicular e diagnóstico gestacional, além de uma Incubadora convencional de CO₂ para servir de controle dos protótipos.

2 - Viabilidade Socioeconômica

A viabilidade econômica do presente projeto é fundamentada na grande importância econômica que o mercado de carne e leite bovinos desempenha em nosso país e esse projeto faz duas abordagens econômicas: A primeira é a na redução de custos da implantação da PIVE. Atualmente, a incubadora mais acessível custa na ordem de R\$ 30.000 e possui algumas desvantagens já citadas no projeto, Existem algumas incubadoras de menor porte, mas seus custos chegam ao triplo das convencionais (US\$ 25.000,00). O novo sistema de cultivo a ser desenvolvido nesse projeto reduzirá em aproximadamente 50% o valor de uma incubadora, o que numa segunda abordagem facilitará a implantação da tecnologia de PIVE nas fazendas e possibilitará que o mesmo seja compartilhado por propriedades que tenham interesse em melhorar a genética de seus animais, facilitando a disseminação da técnica, que hoje é melhor difundida em outras regiões e consegue produzir prenhezês a um custo reduzido utilizando embriões sexados para fêmeas, por exemplo, e garantir um retorno financeiro até 47% maior quando comparado às outras técnicas reprodutivas. O desenvolvimento de um produto mais acessível facilitará também maior formação de profissionais e incentivará a aplicação da técnica e conseqüentemente maior mão de obra local.

3 - Resultados Esperados

Com o desenvolvimento de dois protótipos de incubação e transporte de oócitos e embriões, espera-se que sejam comprovadas a capacidade de manutenção da temperatura, pressão, umidade, viabilidade de oócitos e embriões. Além disso, o baixo custo de produção pretendido a partir das novas tecnologias existentes em sensores e materiais auxiliem na no acesso dos pequenos produtores ao equipamento. Com a participação de feiras e divulgação na mídia, espera-se o estabelecimento de parcerias com setor industrial para que o equipamento possa ser produzido e comercializado facilitando a implementação da tecnologia de PIVE no melhoramento genético dos rebanhos de nossa região. A parceria com a agrícola Famosa possibilitará a avaliação da eficiência do sistema produzido sobre a produtividade de fazendas que trabalham um modelo sustentável de produção.

7 - Informações complementares

1 - Informações complementares

(Não Informado)

8 - Bibliografia

1 - Bibliografia

ALVES, D. F. et al. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. Brazilian J. of Vet. Res. and Anim. Sci. (2003): Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., Santa Maria - Rs, v. 40, n. 4, p.280-286
Corrêa, G. A., Rumpf, R., Mundim, T. C. D., Franco, M. M., & Dode, M. A. N. (2008). Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. Animal Reprod. Sci., 104(2), 132-142.
JAIN, A. et al. Evaluation of Incubation Parameters in a TUNEL assay for Detecting Apoptotic cells in Cumulus Oocyte Complexes and in vitro produced early Embryos of Buffalo. Curr Trends in Biotech & Pharm, v. 10, n. 3, 2016.
Marinho, I. S. R.; Untura, R. M.; Morotti, F.; et al., M. M. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. Animal Reprod., v. 9, n. 3, p. 323-328, 2012.
Miranda, M. S. et al., (2007). Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino. Rev. Bras. Reprod. Anim, 31, 218-223
PONTES, J.H.F. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (Bos indicus) donors. Theriogenology, v. 75, p.1640-1646, 31 dez. 2010.
Rodrigues, C.F.M., Garcia, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl., v.28, p.186-187, 2000.
Silva, C. M. G., Faustino, L. R., et al.. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de foliculos e embriões. Rev Bras Reprod Anim, 34(4), 233-242. 2010
Thompson, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. Anim. Reprod. Sci, v.60-61, p.263-275, 2000.
Van Soom, A., Yuan, Y. Q., et al., . Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. Theriogenology, 57(5), 1453-1465. 2002

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Meta	Etapa / Fase	Especificação	Indicador Físico	
			Unidade Medida	Quantidade
1	Desenvolver dois protótipos de incubação e transporte de oócitos e embriões	O sistema será desenvolvido a partir da construção de dois protótipos de incubadoras de oócitos e embriões bovinos que respeitem as necessidades bioquímicas, nutricionais, de ambiente gasoso e temperatura destas estruturas.	Unidade	2,00
2	Testes in vitro dos protótipos	Serão realizadas coletas de ovários em matadouro e testes in vitro dos protótipos e incubadora onde cada equipamento contará com 200 oócitos a serem maturados com taxa de maturação de 90%. Dentro dos nossos resultados habituais, espera-se que 180 oócitos sejam fecundáveis e gerem 72 (40%) embriões in vitro em cada técnica, produzindo um total de 216 embriões .	Unidade	216,00
3	Produzir embriões com o melhor protótipo e incubadora convencional a partir de animais vivos	Serão colhidos 400 oócitos por aspiração guiada por ultrassonografia de fêmeas nelore e submete-las ao mesmo procedimento de PIVE com o melhor protótipo e com a incubadora convencional. A partir dos mesmos critérios, serão comparadas as incubações e espera-se a produção de pelo menos 160 embriões.	Unidade	160,00
3	Obtenção de nascimentos a partir das incubadoras prototipo e convencional	A partir do aperfeiçoamento do protótipo e com a incubadora convencional. espera-se transferir 100 embriões obtidos de cada incubação e de um total de 200, obter ao menos o esperado para estas ocasiões, ou seja, 45-50% de gestação e parto, resultando em pelo menos 90 bezerras resultantes de animais elite.	Unidade	90,00

Fontes e Usos de Recursos

Natureza	Contrapartida (R\$)	Banco do Nordeste (R\$)	Terceiros (R\$)	Total (R\$)
Equip. Material Permanente	0,00	266.100,00	0,00	266.100,00
Materiais de Consumo	0,00	75.121,00	50.000,00	125.121,00
Serviços de Terceiros	0,00	11.500,00	0,00	11.500,00
Outras Rubricas	0,00	15.740,00	0,00	15.740,00
Recursos Humanos	45.126,00	49.500,00	0,00	94.626,00
Total	45.126,00	417.961,00	50.000,00	513.087,00

Cronograma de Execução Financeira

Etapa	Valor (R\$)
Etapa 1	365.607,00
Etapa 2	134.280,00
Etapa 3	13.200,00
Total	513.087,00

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Cronograma de Desembolso

Parcela	Prazo	Descrição	Valor (R\$)
Parcela 1	-	Logo após a assinatura do Convênio	313.481,00
Parcela 2	6 meses	6 meses após a primeira, com a comprovação de pelo menos 80% da parcela anterior e aceitação do ETENE do relatório técnico e prestação de contas parciais.	91.280,00
Parcela 3	12 meses	12 meses após a primeira, com a comprovação de pelo menos 80% da parcela anterior e aceitação do ETENE do relatório técnico e prestação de contas parciais.	13.200,00
Parcela 4	18 meses	18 meses após a primeira, com a comprovação de pelo menos 80% da parcela anterior e aceitação do ETENE do relatório técnico e prestação de contas parciais.	0,00
		Total:	417.961,00

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Plano de Aplicações Detalhado
Origem do Recurso: Contrapartida Não-Financeira

Descrição	Quantidade	Unidade	Valor Unitário	Valor Total
Recursos Humanos				
Diárias de trabalho dos coordenadores e demais professores	300,00	Homem-Dia (equivalente a 8 Hh)	150,42	45.126,00
Total				45.126,00

Origem do Recurso: Banco do Nordeste

Descrição	Quantidade	Unidade	Valor Unitário	Valor Total
Recursos Humanos				
Contratação de bolsista envolvido com a execução do projeto	12,00	Mês	450,00	5.400,00
Bolsa de Auxílio estudantil Meta II	16,00	Mês	450,00	7.200,00
Bolsas de auxílio estudantil Meta I	24,00	Mês	450,00	10.800,00
Bolsas de auxílio estudantil meta III	24,00	Mês	450,00	10.800,00
Bolsa de auxílio estudantil Meta	24,00	Mês	450,00	10.800,00
Diárias para participação em eventos e feiras de startups	30,00	Homem-Dia (equivalente a 8 Hh)	150,00	4.500,00
Equip. Material Permanente				
Fluxo Laminar Unidirecional (classe 1) para manipulação de células (espermatozoides, oócitos e embriões)	1,00	Unidade	18.000,00	18.000,00
Incubadora convencional de CO2	1,00	Unidade	37.000,00	37.000,00
Lupa estereoscópica Binocular com aumento de até 80X	1,00	Unidade	6.000,00	6.000,00
Chapa Aquecedora Digital INOX - 220 V para PIVE	1,00	Unidade	2.500,00	2.500,00
Microscópio trinocular (Nikon E200) para avaliação de semen	1,00	Unidade	12.500,00	12.500,00
Microscópio invertido trinocular com sistema de fluorescência e captação de imagens	1,00	Unidade	50.000,00	50.000,00
Fyrite para aferição de CO2 interno	1,00	Unidade	4.300,00	4.300,00
Centrífuga refrigerada para processamento de semen e reagentes	1,00	Unidade	24.000,00	24.000,00
Osmômetro para verificação de meios	1,00	Unidade	18.000,00	18.000,00
Ultrassom com guia para aspiração folicular de ovários bovinos	1,00	Unidade	47.000,00	47.000,00
Botijão de nitrogênio líquido para conservação de semen e embriões excedentes	1,00	Unidade	4.500,00	4.500,00
Reator 5100 semelhante a marca Parr utilizado no processo de polimerização radicalar	1,00	Unidade	5.000,00	5.000,00
Placa de aquecimento para reações	1,00	Unidade	1.000,00	1.000,00
Agitador magnético para preparo de polímeros	1,00	Unidade	1.200,00	1.200,00
Banho termostático para reações de polimerização	1,00	Unidade	1.000,00	1.000,00
Balança Analítica com capacidade 82/220g e a Precisão 0,00001g para pesagem de reagentes para PIVE	1,00	Unidade	7.000,00	7.000,00
Banho Maria de Circulação para equilíbrio térmico de reagentes, semen e outros	1,00	Unidade	9.000,00	9.000,00
Microcomputador (notebook) para testes e programação de sensores	1,00	Unidade	5.000,00	5.000,00

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Cilindro para CO2 com válvulas e manômetros para incubadora convencional de CO2 e protótipo	2,00	Unidade	1.600,00	3.200,00
Câmara de Neubauer espelhada melhorada para contagem de espermatozoides	3,00	Unidade	300,00	900,00
Kit Arduino	5,00	Unidade	1.000,00	5.000,00
Micropipetas de volume variável para preparo de reagentes	8,00	Unidade	500,00	4.000,00
Materiais de Consumo				
Fosfato de sódio monodratado, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código S9638)	1,00	Unidade	195,00	195,00
Cloreto de magnésio anidro, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: M8266)	1,00	Unidade	520,00	520,00
Glicina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código:)G7126	1,00	Unidade	160,00	160,00
Cafeína, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: C0750)	1,00	Unidade	230,00	230,00
Cloreto de cálcio dihidratado, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: C7902)	1,00	Unidade	385,00	385,00
Sulfato de Magnésio Heptaidratado, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: 63138)	1,00	Unidade	770,00	770,00
Albumina Bovina (BSA), semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: A9647)	1,00	Unidade	1.470,00	1.470,00
Cloreto de sódio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: S5886)	1,00	Unidade	315,00	315,00
Fosfato de sódio monobásico, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: S5011)	1,00	Unidade	590,00	590,00
Cloreto de Potássio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P5405)	1,00	Unidade	290,00	290,00
Fosfato de potássio monobásico, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P5655)	1,00	Unidade	450,00	450,00
Metabissulfato de sódio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: 31448)	1,00	Unidade	315,00	315,00
Citrato de sódio dihidratado, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: S1804)	1,00	Unidade	525,00	525,00
Bicarbonato de sódio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: S5761)	1,00	Unidade	180,00	180,00
Vermelho de fenol, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P0290)	1,00	Unidade	215,00	215,00
Químicos para MIV	1,00	Reais	2.000,00	2.000,00
Material de consumo para construção mecânica de protótipo (aço inoxidável, alumínio, teflon, cobre, etc)	1,00	Reais	1.500,00	1.500,00
Material de consumo eletro-eletrônico e de informática	1,00	Reais	2.000,00	2.000,00
B- Alanina, semelhante ao fornecido pela Sigma (código: A9920)	1,00	Unidade	190,00	190,00
Mio-Inositol, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: I7508)	1,00	Unidade	291,00	291,00
L-Glutamina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: G8540)	1,00	Unidade	170,00	170,00
B-Estradiol, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: E8875)	1,00	Unidade	340,00	340,00
Hidróxido de sódio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: 306576)	1,00	Unidade	300,00	300,00
Piruvato de sódio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P3662)	1,00	Unidade	455,00	455,00
Aminoácido-BME, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: B6766)	1,00	Unidade	480,00	480,00

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Cisteamina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: M9768)	1,00	Unidade	735,00	735,00
Hipotaurina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: H1384)	1,00	Unidade	465,00	465,00
FSH/LH, Semelhante ao fornecido pela PLUSET	1,00	Unidade	320,00	320,00
Heparina Sódica 5000 UI/ml	1,00	Unidade	400,00	400,00
Soro Fetal Bovino 100ml, semelhante ao fornecido pela GIBCO	1,00	Unidade	480,00	480,00
EGF epidermal growth factor, semelhante ao fornecido pela Sigma E4127	1,00	Unidade	1.330,00	1.330,00
DMEM-F12, Semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: 51445C)	1,00	Unidade	325,00	325,00
Folltropin-FSH, Semelhante ao fornecido pela AGENER	1,00	Unidade	395,00	395,00
Hialuronidase, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: H3506)	1,00	Unidade	505,00	505,00
IGF I (mouse), semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: I8779)	1,00	Unidade	2.330,00	2.330,00
Ionamicina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: I0634)	1,00	Unidade	1.370,00	1.370,00
6 DMAP, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: D2629)	1,00	Unidade	425,00	425,00
Glicerol, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: G2025)	1,00	Unidade	600,00	600,00
Brometo de etídio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: 46067)	1,00	Unidade	855,00	855,00
Iodeto de propídeo (10mg), semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P4170)	1,00	Unidade	270,00	270,00
Calceína (5g), semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: C0875)	1,00	Unidade	1.200,00	1.200,00
Epinefrina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: E4250)	1,00	Unidade	235,00	235,00
Material de escritório e despesas administrativas para gerenciamento do projeto	1,00	Reais	8.000,00	8.000,00
D-penicilina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P4875)	2,00	Unidade	455,00	910,00
M16 medium, Semelhante ao Fornecido pela Sigma (Código: M7292)	2,00	Unidade	325,00	650,00
M2 medium, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: M7167)	2,00	Unidade	395,00	790,00
Hoechst 33342, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: 14533)	2,00	Unidade	1.335,00	2.670,00
L-lactato de cálcio hidratado, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: L4388)	2,00	Unidade	380,00	760,00
Meio 199, semelhante ao fornecido pela Sigma (código: M2520-10X1L)	2,00	Unidade	695,00	1.390,00
Aminoácido-MEM, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: M7145)	2,00	Unidade	105,00	210,00
DL-lactato de sódio, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: L7900)	2,00	Unidade	520,00	1.040,00
HEPES Sódico, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: H3784)	2,00	Unidade	230,00	460,00
Tampão HEPES, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: H6147)	2,00	Unidade	275,00	550,00
AIBN (2,2' Azobis (2-metilpropionitrilo)	2,00	litro	350,00	700,00
Metacrilato de Metilo (MMA)	2,00	litro	300,00	600,00
Dimetacrilato de Eilienoglicol (EGDMA)	2,00	litro	300,00	600,00

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Óleo mineral, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: M8410)	2,00	Unidade	320,00	640,00
Percoll, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: P1644)	3,00	Unidade	1.225,00	3.675,00
Sulfato de gentamicina, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: G1264)	4,00	Unidade	190,00	760,00
Parafina	5,00	quilograma	15,00	75,00
Octadecano	5,00	litro	200,00	1.000,00
AGULHA DESCARTÁVEL 25X8 (Caixa com 100 unidades)	5,00	Unidade	20,00	100,00
MICROTUBO NEUTRO GRADUADO CAP. 1,5 ML, ESTÉRIL (1 pacote com 1000 unidades), semelhante ao fornecido pela EPPENDORF	5,00	Unidade	60,00	300,00
MICROTUBO NEUTRO GRADUADO CAP. 2,0 ML, ESTÉRIL (1 pacote com 1000 unidades), semelhante ao fornecido pela EPPENDORF	5,00	Unidade	110,00	550,00
PONTEIRA DE 0,5-10UL SEM FILTRO (1 pacote com 1000 unidades)	5,00	Unidade	130,00	650,00
PONTEIRA DE 200UL SEM FILTRO (1 pacote com 1000 unidades)	5,00	Unidade	45,00	225,00
PONTEIRA DE 100-1000UL SEM FILTRO (1 pacote com 1000 unidades)	5,00	Unidade	60,00	300,00
MICROTUBO NEUTRO GRADUADO CAP. 0,2 ML, ESTÉRIL (1 pacote com 1000 unidades), semelhante ao fornecido pela EPPENDORF	5,00	Unidade	250,00	1.250,00
FILTRO PARA SERINGA 0,2UM, 25 MM DE DIÂMETRO, ESTÉRIL (Pacote com 50 unidades embalados individualmente), semelhante ao fornecido pela SARSTEDT	6,00	Unidade	380,00	2.280,00
Água p/ embrião, semelhante ao fornecido pela Sigma (Código: W1503)	10,00	Unidade	305,00	3.050,00
TUBO FALCON CÔNICO GRADUADO CAP. 15 ML, ESTÉRIL (1 pacote com 50 unidades)	10,00	Unidade	35,00	350,00
kit para aspiração folicular	10,00	Unidade	1.200,00	12.000,00
TUBO FALCON CÔNICO GRADUADO CAP. 50 ML, ESTÉRIL (1 pacote com 25 unidades)	12,00	Unidade	30,00	360,00
PLACA DE PETRI DESCARTÁVEL 60X15MM LISA SEM DIVISÃO, ESTÉRIL (1 pacote com 20 unidades)	15,00	Unidade	30,00	450,00
PLACA DE PETRI DESCARTÁVEL 35X15MM LISA SEM DIVISÃO, ESTÉRIL (1 pacote com 20 unidades)	40,00	Unidade	30,00	1.200,00
Serviços de Terceiros				
Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	1,00	Reais	3.000,00	3.000,00
Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	1,00	Reais	3.000,00	3.000,00
Serviços de manutenção de equipamentos e protótipos	10,00	Hora técnica	150,00	1.500,00
Pagamentos de serviços eventuais de eletricidade, computacional e eletrônica	10,00	Hora técnica	100,00	1.000,00
Serviços de construção mecânica para prototipagem (usinagem, soldas, etc)	20,00	Hora técnica	150,00	3.000,00
Outras Rubricas				
Passagem para apresentação de trabalho em congressos e feiras de startups e inovação tecnológica	4,00	Reais	1.800,00	7.200,00
Diárias para participação em congressos e feiras de startups e inovação	20,00	Reais	300,00	6.000,00

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Combustível para deslocamento ao matadouro e eventuais à fazenda	200,00	litro	4,30	860,00
Combustível para deslocamento à fazenda famosa	400,00	litro	4,20	1.680,00
Total				417.961,00

Origem do Recurso: Terceiros

Descrição	Quantidade	Unidade	Valor Unitário	Valor Total
Materiais de Consumo				
Custos com medicamentos e vacinas dos animais	1,00	Reais	7.800,00	7.800,00
eCG Gonadotrofina sérica equina, frasco com 5000 UI	20,00	Unidade	175,00	3.500,00
Dispositivo Intravaginal Bovino (DIB), pacote com 10 unidades	25,00	Unidade	210,00	5.250,00
Benzoato de estradiol, frasco com 50 ml	25,00	Unidade	30,00	750,00
Cloprostenol, frasco com 20ml	25,00	Unidade	90,00	2.250,00
Lutropin V, frasco com 20ml	40,00	Unidade	155,00	6.200,00
Dose de Sêmen Girolando (Sexado Fêmea), semelhante ao fornecido pela AltaGenetics	150,00	Unidade	115,00	17.250,00
Dose de Sêmen Girolando (Convencional), semelhante ao fornecido pela Altagenetics	200,00	Unidade	35,00	7.000,00
Total				50.000,00

Equipe Técnica

Coordenador Geral

Nome: Marcelo Barbosa Bezerra
Instituição: Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Qualificação/Área de Conhecimento: Doutor em Reprodução Animal UNESP/ Médico Veterinário
Endereço: Rua Sebastião Cândido de França, 321
Bairro: Alto do Sumaré
Cidade: MOSSORO
UF: RN
Telefone: 84988069660
CPF: 484.266.283-20
RG: 94016021639
Email: mbezerra@ufersa.edu.br

Coordenador Adjunto

Nome: clodomiro alves junior
Instituição: Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Qualificação/Área de Conhecimento: Doutorado em Ciência e Engenharia dos Materiais UFSCar/ Físico
Endereço: Rua Guarujá, 3988
Bairro: capim macio
Cidade: NATAL
UF: RN
Telefone: 84996788666
CPF: 096.211.994-68
RG: 216417

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Email: clodomiro.jr@ufersa.edu.br

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Demais Membros

Nome	Qualificação/Área de Conhecimento	Papel	Instituição
Carlos Eduardo Bezerra de Moura	Médico Veterinário (ESAM) com Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Universidade de São Paulo, Brasil(2007), Professor Associado da Universidade Federal Rural do Semi-Árido , Brasil	Avaliação de viabilidade embrionária, acompanhamento da aquisição de insumos e equipamentos	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Clodomiro Alves Junior	Físico, Doutor em Engenharia de Materiais (UFSCar - SP), presidente da Sociedade Latino-americana de Biomateriais, órgãos artificiais e Engenharia de tecidos (SLABO)	Vice Coordenação do Projeto; Confecção dos protótipos, monitoramento das condições microambientais dos equipamentos	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Felipe Coelho Serquiz	Zootecnista com Mestrado em Produção Animal (UFERSA)	Avaliação nutricional dos animais do projeto, seleção de matrizes e receptoras	Agrícola Famosa
Fernanda Araujo dos Santos	Médica Veterinária (UFERSA), Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA.	Produção in vitro de embriões	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Henrique Albano Nogueira Gomes	Biotecnologista (UFERSA/ Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (UFERSA)	Produção dos meios de cultivo, desenvolvimento e avaliação dos protótipos	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Joaquim Mansano Garcia	Médico Veterinário (UNESP) com Doutorado em Ciências Biológicas pelo Universidade Estadual Paulista, Brasil(1993) Docente da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Membro fundador da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE	Assessoria no desenho dos protótipos Assessoria nas inovações associadas à Produção In Vitro de Embriões	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Marcelo Barbosa Bezerra	Médico Veterinário, Doutor em Reprodução Animal pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil(2010) Professor da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Membro Associado da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE	Coordenação geral do projeto, participação na execução técnica, acompanhamento financeiro e demais atividades do projeto	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Márcia Viviane Alves Saraiva	Medica Veterinária com Doutorado em Ciências Veterinárias pela Universidade Estadual do Ceará, Brasil(2011) Professora da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) Brasil	Avaliação Morfológica de oócitos e embriões Gerenciamento de material de consumo	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Marina Ragagnin de Lima	Medica Veterinária (UPF) com Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil(2015), Pós-doutoranda da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho , Brasil	Consultoria em métodos de Produção In Vitro de Embriões	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Michelly Fernandes de Macedo	Médica Veterinária (ESAM) com Doutorado em Cirurgia Veterinária (obstetrícia) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil(2011); Docente da Universidade Federal Rural do Semi-Árido , Brasil	Monitoramento clínico de matrizes e doadoras	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Raimundo Alves Barrêto Júnior	Médico Veterinário (UEMA) com Doutorado em Clínica Veterinária pela Universidade de São Paulo, Brasil(2007), Professor da Universidade Federal Rural do Semi-Árido , Brasil	Acompanhamento clínico e nutricional dos animais	Universidade Federal Rural do Semi-Árido

SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍTICAS DE DESENVOLVIMENTO
AMB.PROG.ESP.F.PES - AMBIENTE DE PROG ESPECIAIS E DE F DE PESQUISA
Relatório de Projeto

Cronograma de Atividades

Atividades	Ano 1												Ano 2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Etapa I	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
Produção de protótipos	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
Testes in vitro com os protótipos								■	■	■	■	■	■	■	■									
Relatório de atividades e prestação de contas parciais													■											
Etapa II																	■	■	■	■	■	■	■	■
Início dos testes in vivo																	■	■	■	■	■	■	■	■
Utilização de doadoras elite como doadoras de oócitos para PIVE																								
Divulgação dos resultados do produto em congressos e feiras																								
Relatório final prestação de contas final																								

Atividades	Ano 3											
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Etapa I												
Produção de protótipos												
Testes in vitro com os protótipos												
Relatório de atividades e prestação de contas parciais												
Etapa II	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Início dos testes in vivo	■	■	■									
Utilização de doadoras elite como doadoras de oócitos para PIVE		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Divulgação dos resultados do produto em congressos e feiras						■	■	■	■	■	■	■
Relatório final prestação de contas final											■	■



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

Objeto: Implantar academicamente o Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão (PSF CAMARÃO) na Ufersa, através do modelo de Base Acadêmica Avançada.

1. Proponentes:

Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins – Coordenador

Prof. Dr. Ivanilson de Souza Maia – Vice coordenador

EQUIPE TÉCNICA:

Prof. Dr. Ambrósio Paula Bessa Júnior – Ufersa

Profa. Dra. Viviane Medeiros – UFRN

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni - UFC/LABOMAR

Prof. Dr. Sandro Régio de Araújo Neves – IFCE/Aracati

Prof. Dr. Roberto Aurélio Almeida de Carvalho – IFRN/Macau

2. Breve histórico do Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão – PSF CAMARÃO

Com o intuito de subsidiar o gerenciamento da condição de saúde dos camarões cultivados, criamos em 2010, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), o Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão (PSF CAMARÃO), que tem como principal objetivo *produzir e transferir informações para melhorar às condições da saúde dos camarões cultivados*. A partir de então, implantamos diversos tipos de metodologia nos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com o apoio do CEDECAM/LABOMAR/UFC, visando contribuir para o aumento da rentabilidade e diminuição de risco com a perda de saúde dos camarões criados na região.

Muitas Instituições, desde o início, colaboram com os trabalhos do PSF CAMARÃO, tais como: FINEP, SEBRAE, Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), ABCC e, a Parceria Técnica e Científica das Universidades Federais (UFRN e UFC) e dos Institutos Federais (IFRN e IFCE) http://www.psfacuicultura.ufc.br/site/?page_id=116).

Atualmente, a coordenação do PSF CAMARÃO está implantada na Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), contando com as parcerias da Associação Cearenses dos Criadores de Camarão (ACCC), Secretaria de Agricultura, Pesca e Aquicultura (SEAPA/CE), Associação dos Criadores de Camarão de Parajuru e Icapui (ACCP, ACCI), Prefeituras Municipais de Beberibe (CE), Jaguaribara (CE) e a Tropical Alevinagem de Tilápias.

3. Introdução

As principais atividades da aquicultura nos Estados do Rio Grande do Norte e do Ceará são a carcinicultura e a piscicultura, que juntas têm contribuído positivamente para a economia rural da região Nordeste. Essas atividades têm significativa importância socioeconômica, principalmente pela ocupação de mão de obra, geração de emprego e renda no semiárido destes estados.

As inovações tecnológicas introduzidas nos processos produtivos da carcinicultura, nos últimos anos, proporcionou ganhos consideráveis, principalmente na produtividade, uma vez que é conduzida por um sistema de produção intensivo. As elevadas densidades de animais e de altas taxas de fontes de carbono para alimentação trouxeram muitas vantagens, contudo, por vezes, acompanhou problemas sanitários gerados no ambiente de cultivo. Os camarões são levados a uma situação de estresse, gerando muitos prejuízos aos produtores. Neste contexto, os últimos meses foram marcados pelo aparecimento da doença da mancha branca em camarões, criados em todo o Brasil.

Esse cenário de perda, devido a condição de saúde dos camarões cultivados, representa um elevado impacto no desempenho zootécnico das produções, principalmente nas taxas de mortalidade, crescimento e conversão alimentar. Conseqüentemente, significativos prejuízos pela diminuição da rentabilidade e aumento no nível de risco assumido pelo setor produtivo, principalmente aos micros e pequenos que trabalham na carcinicultura familiar.

Neste contexto, a carcinicultura familiar, micro e pequenos produtores, estimados em mais de 1.000 famílias existente no estado do Ceará, foi afetada diretamente, os quais serão beneficiados pela base acadêmica ao aplicar o PSF CAMARÃO. Evidentemente que, o mesmo programa deve ser conduzido no estado do Rio Grande do Norte, entretanto, será necessário disponibilizar apoio logístico e financeiro pelos agentes públicos do estado.

A implantação das bases acadêmicas do PSF CAMARÃO é fundamental para atender este cenário no Ceará. Portanto, o apoio e seu fortalecimento são urgentes aos produtores. Ao mesmo tempo, funcionará como base de pesquisa integrada, colaborará para a

formação dos discentes da UFERSA, uma vez que, passam a dispor de espaços públicos de estágios e perspectiva de campo de trabalho.

4. Objetivo Geral

Implantar o Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão – PSF CAMARÃO via a estruturação de Bases Acadêmicas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA no Estado Ceará.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1. Viabilizar uma rede técnica-científica integrada com o setor público e privado para assegurar a manutenção do PSF CAMARÃO;

4.1.2. Assegurar convênios com o setor público e privado para manter as Bases Acadêmicas;

4.1.3. Construir uma base de pesquisa identificada no CNPq – PSF CAMARÃO, de caráter interdisciplinar e institucional;

4.1.4. Formar agentes comunitários de saúde de animais aquáticos;

4.1.5. Selecionar bolsistas para estágios curriculares e trainee;

4.1.6. Capacitar produtores em gestão de negócios, sustentabilidade e ética;

4.1.7. Integrar a rede nacional composta por pesquisadores que trabalham com enfermidades em animais aquáticos, com o objetivo de geração e consolidação de conhecimento na área;

4.1.8. Elaborar indicadores sanitários para identificar o grau de sustentabilidade da área;

4.1.9 Produzir relatórios técnicos semestrais sobre as atividades desenvolvidas durante a vigência do programa;

4.1.10. Construir um referencial conceitual e metodológico acerca de processos de implantação das Bases Acadêmicas e do Programa de Saúde da Fazenda de CAMARÃO;

4.1.11. Produzir publicações científicas e cartilhas sobre o trabalho de implantação das Base Acadêmicas e do Programa de Saúde da Fazenda de CAMARÃO.

5. Metodologia

5.1 ÁREAS DE ATUAÇÃO DAS BASES ACADÊMICAS E DA REDE INSTITUCIONAL PARA IMPLANTAR O PSF CAMARÃO

Entre os anos de 2015 e 2017 foram implantadas três bases nos seguintes municípios cearense: Beberibe (comunidade de Parajuru), Jaguaruana e Jaguaribara, que atende, respectivamente, os carcinicultores dos municípios de Beberibe (figura 1), Cascavel, Fortim, Aracati e Icapui; Jaguaruana (figura 2), Itaiçaba, Russas e Palhano; e Jaguaribara (figura 3),

Jaguaribe, Quixeré, Alto Santo, São João do Jaguaribe, Tabuleiro do Norte, Limoeiro do Norte e Morada Nova.



Figura 1 – Fazendas dos carcinicultores atendidos pela base de Parajuru – Beberibe/Ce.



Figura 2 – Módulos de fazendas de camarão atendidas pela base de Jaguaruana/Ce.



Figura 3 – Carcinicultores e piscicultores atendidos pela base de Jaguaribara/Ce.

As três bases (Parajuru/Beberibe; Jaguaruana; Jaguaribara) estão, respectivamente, a 125 km, 83 km e a 185 km da UFERSA; para o LABOMAR, estão a uma distância de 125 km, 187 km e 229 km. A UFERSA está a 245 km do LABOMAR e a 284 km do Escola Agrícola de Jundiá – EAJ/UFRN, bem como a 137 km do IFRN campus Macau e a 97 km do

IFCE campus Aracati. Portanto, equidistante do LABOMAR e da EAJ/UFRN, e a um raio máximo de 185 km para as bases acadêmicas e pontos de coletas.

5.2 INFRAESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DAS BASES ACADÊMICAS

A base acadêmica de Parajuru – Beberibe (figura 4) possui instalações para um laboratório de análise a fresco do camarão, água e solo; laboratório de microbiologia e PCR de campo (LAMP); sala de treinamento, mini auditório para reuniões e oficinas; refeitório, alojamento masculino e feminino, banheiros masculino e feminino.



Figura 4 - Trabalho desenvolvido na Base do rio Pirangi (Beberibe - CE)

A base de Jaguaruana (figura 5) atende com um laboratório de análise a fresco do camarão; refeitório, alojamento, banheiros; e, uma estação de larvicultura e alevinagem de tilápia.



Figura 5 - Trabalho desenvolvido na Base de Jaguaruana (Jaguaruana - CE)

A base de Jaguaribara (figura 6) se utiliza de um laboratório de análise a fresco do camarão; sala de treinamento e mini auditório para reuniões e oficinas; refeitório, alojamento e banheiros. Importante salientar que nesse município está localizado o açude do Castanhão e o principal polo de produção da tilapicultura do semiárido nordestino.



Figura 6 - Trabalho desenvolvido na Base de Jaguaribara (Jaguaribara - CE)

Além dos trabalhos nas três bases do PSF CAMARÃO instaladas, ainda há a realização de trabalhos técnicos-científicos, para um melhor diagnóstico das enfermidades de camarão, em parceria com os laboratórios do CEDECAM (Centro de Diagnóstico de Enfermidades em Animais Aquáticos) do LABOMAR/UFC. No CEDECAM são realizados os diagnósticos histopatológico, de microbiologia, detecção viral, carga viral e genética dos vírus.

5.3 ATORES ENVOLVIDOS E INSTITUIÇÕES REPRESENTATIVAS

Os micro e pequenos carcinicultores instalados nas bases acadêmicas de Parajuru/Beberibe, representados pela Associação dos criadores de camarão de Parajuru (ACCP) - apoiados pela Prefeitura de Beberibe, e a Associação dos criadores de camarão de Icapui (ACCI); os micros e pequenos carcinicultores de Jaguaruana apoiados pela prefeitura local e dos municípios que compõem sua Base Acadêmica, além da Tropical Alevinagem de Tilápias; os micro e pequenos carcinicultores e tilapicultores do Castanhão, em Jaguaribara, além do apoio da Prefeitura local. Evidentemente que, todos estes produtores deverão ter o apoio da Associação Cearense dos Criadores de Camarão (ACCC) e o fomento do Governo do Estado, via Secretaria de Agricultura, Pesca e Aquicultura (SEAPA/CE).

As Instituições de Ensino Superior - IES, nominadas: UFERSA, EAJ/UFRN, CEDECAM/LABOMAR/UFC, IFCE/ARACATI e IFRN/MACAU colaborarão no processo de reorganização sanitária das fazendas, tanto na formação técnica de funcionários e proprietários como na elaboração de indicadores sanitários. Assim como, na produção dos processos metodológicos que guiarão a experiência.

5.4 METODOLOGIA PARA IMPLANTAÇÃO DAS BASES ACADÊMICAS

Parte-se do pressuposto de que as classes populares produzem saberes a partir de experiências de vida e do contexto social em que estão inseridas. Desta forma, a presente proposta adota um processo de intercâmbio de saberes imbricado na realidade dos sujeitos em

formação. Os extensionistas/pesquisadores(as), portanto, não se restringe ao papel de facilitador de aprendizagens, mas, como sujeito indispensável ao diálogo e à provocação da reflexão, articulados à ação. A perspectiva adotada aproxima-se da concepção de Tecnologia Social, que compreende produtos, técnicas e/ou metodologias reaplicáveis, desenvolvidas na interação com comunidades e que representa efetivas contribuições à transformação social.

As Bases Acadêmicas serão espaços públicos de conexão de conhecimentos e de análise técnicas dos produtos coletados, outrora identificados no campo pelo produtor. Essa aproximação construirá o ponto de atração e apoio por parte dos beneficiários a Base, a partir de sua avaliação sobre a necessidade para melhorar a produção e a qualidade de vida, construindo identidade e um sentimento de pertencimento, ao mesmo tempo, em que os empodera.

As condições técnicas das Bases Acadêmicas, equipamentos e pessoal, possibilitará o encontro dos saberes, empírico popular com o científico, colaborando com a construção da linha mestra que norteará o desenvolvimento do programa – vazão sanitário, sustentabilidade.

5.4.1. ADESÃO

Realizada uma sensibilização (contato inicial) junto aos integrantes das comunidades envolvidas, para explicitar o significado da proposta e suas vantagens, as dificuldades, os compromissos e princípios para manter-se enquanto grupo, bem como sobre a necessidade de assegurar condições as Bases Acadêmicas, para que deem respostas as necessidades das comunidades envolvidas.

5.4.2. DIAGNÓSTICO PARTICIPATIVO DA REALIDADE LOCAL

É importante que tanto as pessoas que compõem os grupos populares como a equipe de extensionistas/pesquisadores(as) conheçam a realidade local e o ponto de vista do(as) integrantes das comunidades. É fundamental apontar um diagnóstico na perspectiva das dimensões da sustentabilidade.

5.4.3. PLANEJAMENTO PARTICIPATIVO

Diagnóstico realizado, inicia-se o planejamento participativo com a comunidade, considerando seus objetivos e interesses comuns e particulares, destacando o incremento das potencialidades como solução para os problemas, defesa das ameaças e captação das oportunidades, com finalidade de direcionar ações práticas para a extensão.

5.4.5. PLANO DE TRABALHO E AGENDA DE AÇÕES PRIORITÁRIAS

A partir do retrato do futuro almejado, descrito no planejamento, elabora-se o específico de cada comunidade, com uma Agenda de ações, na qual constam os nomes das pessoas e organizações responsáveis pela implementação daquela ação. A agenda é dividida

entre as ações prioritárias, envolvendo capacitação e mutirões, assim como ações de médio e longo prazo, com metas e prazos definidos. Essa etapa da metodologia dar condições de medir o desempenho do programa e rever atividades, podendo ser direcionando como base de uma gestão baseada em resultados – GBR.

5.4.6. IMPLEMENTAÇÃO DAS AGENDAS

A partir da metodologia do “Aprender Fazendo”, a capacitação destina-se a preparar integrantes dos grupos quanto a gestão de negócios, sustentabilidade e ética, bem como formar agentes comunitários de saúde de animais aquáticos. Também será necessário construir rede científica em âmbito nacional e regional, além de uma base de pesquisa. Enquanto assimetria dos resultados e análise destes, deve-se criar indicadores sanitários, produzir relatórios técnicos e publicações científicas e gerar acesso popular as informações produzidas – cartilhas. Seguem especificadas as formações e a produção de conteúdo:

- a) Formação Sócio-política: Associativismo, Cooperativismo, Gestão de Empreendimentos Econômicos Solidários, Participação e Controle Social;
- b) Criar indicadores sanitários e formar agentes comunitários de saúde da fazenda CAMARÃO;
- c) Construir uma rede científica em âmbito regional e nacional;
- d) Montar base pesquisa;
- e) Produção de referencial teórico-metodológico.

5.4.7. AVALIAÇÃO PARTICIPATIVA

Em prazos estipulados de comum acordo com os grupos e da equipe, serão realizadas avaliações do processo e das agendas, sugerindo novas ações, compromissos, estratégias, parcerias e redefinindo responsabilidades, sempre com foco na implementação do plano participativo de cada comunidade.

6. Metas

Meta 1 – Formação sócio-política, associativa e controle social

- Realizar nove seminários de apresentação, de avaliação e de conclusão da proposta de implantar as Bases Acadêmicas para implantar o PSF CAMARÃO;
- Reunir as Associações, prefeituras e a Secretaria de Estado da Agricultura, da Pesca e da Aquicultura, responsáveis pelos apoios e fomentos a instalação das Bases Acadêmicas, para motivá-los e integrá-los ao processo de instalação;

- Elaborar 12 estudos de gestão democrática e de viabilidade econômica com os carcinicultores a ser inseridos nas Bases Acadêmicas;
- Realizar curso de gestão de negócios, sustentabilidade e ética.

META 2 – Criar indicadores sanitários e formar agentes comunitários de saúde da fazenda CAMARÃO

Realizar 50 cursos para formar agentes comunitários de saúde nas fazendas;

Construir indicadores sanitários;

Fazer avaliação de sustentabilidade em doze comunidades atendidas.

META 3 – Montar uma rede científica de apoio as Bases Acadêmicas

Criar uma Rede Científica em escala regional e nacional;

Montar uma base de pesquisa no CNPq sobre PSF CAMARÃO;

Selecionar 15 bolsistas e cinco trainees.

META 4 – Elaborar referencial teórico-metodológico e conceitual acerca do processo de instalação das Bases Acadêmicas e sobre Programa de Saúde das Fazendas de Camarão – PSF CAMARÃO e sua publicação:

- Elaborar relatórios semestrais sobre as atividades desenvolvidas;
- Publicar livro gráfico e eletrônico acerca dos procedimentos de instalação das Bases Acadêmicas e sobre o Programa de Saúde das Fazendas de Camarão – PSF CAMARÃO;
- * Produzir publicações científicas sobre o estado da arte da carcinicultura familiar no estado do Ceará;
- * Elaborar cartilhas para popularizar a pesquisa e a extensão acerca do processo de instalação das Bases Acadêmicas e sobre o PSF CAMARÃO.

7. Beneficiários por meta

META	ESPECIFICAÇÃO DOS BENEFICIÁRIOS	BENEFICIÁRIOS		
		DIRETOS	INDIRETOS	TOTAIS
1	Carcinicultores familiares, gestores públicos, professores da UFERSA, UFC, UFRN e do IF/RN e IF/CE	200	800	1.000
2		240	760	1.000
3		30	100	130
4		200	800	1.000

9. Resultados esperados

9.1. Plano participativo estratégico e de negócios desenvolvido, visando à sustentabilidade das Bases Acadêmicas;

9.2. Comunidades envolvidas desenvolvidas a partir do processo da implantação das Bases Acadêmicas e aplicação do PSF CAMARÃO, o qual apontou uma melhora na qualidade de vida, na ocupação de mão de obra e geração de renda;

9.3. Referencial conceitual e metodológico construído acerca de processos de implantação das Bases Acadêmicas e o desenvolvimento do PSF CAMARÃO;

9.4. Relatórios técnicos semestrais elaborados sobre as atividades desenvolvidas durante a vigência do projeto.

9.5. Montado o grupo de pesquisa sobre o PSF CAMARÃO no diretório do CNPq e os grupos regional e nacional sobre pesquisa em enfermidades em camarões e tilápias;

9.6. Trabalhos publicados e cartilha elaborada sobre o processo de instalação das Bases Acadêmicas e o PSF CAMARÃO.

10. Monitoramento/Avaliação da efetividade das Bases Acadêmicas e do PSF CAMARÃO

METAS	ATIVIDADE/INDICADOR FÍSICO	DURAÇÃO (MÊS)	
		INÍCIO	TERMINO
1	<u>Atividade:</u> Seminários; reuniões; estudos; cursos. <u>Indicador:</u> Plano participativo estratégico realizado.	01	24
2	<u>Atividade:</u> Formar agentes comunitários de saúde nas fazendas; construir indicadores sanitários; fazer avaliação de sustentabilidade em comunidades atendidas. <u>Indicador:</u> Indicadores sanitários criados e agentes comunitários de saúde da fazenda formados.	02	21
3	<u>Atividade:</u> Rede Científica criada; base de pesquisa montada; bolsistas selecionados. <u>Indicador:</u> Rede científica de apoio as Bases Acadêmicas montada.	02	10
4	<u>Atividade:</u> Relatórios semestrais elaborados; livro gráfico e eletrônico publicados; trabalhos científicos publicados; Cartilhas para popularizar a pesquisa e a extensão publicadas. <u>Indicadores:</u> Referencial teórico-metodológico e conceitual acerca do processo de instalação das Bases Acadêmicas e sobre	06	24

	Programa de Saúde das Fazendas de Camarão – PSF CAMARÃO elaborado.		
--	---	--	--

11. Orçamento

DESCRIÇÃO	UND	QTD	VALOR UNITÁRIO R\$	VALOR TOTAL R\$
INVESTIMENTO				
SERVIÇO DE TERCEIRO				122.307,24
Contratação de Técnico em Pesca e Aquicultura (por 12 meses com encargos trabalhistas incluso)	TÉC.	2	45.353,62	90.707,24
Aluguel de carro (12 meses)	CARRO	1	21.600,00	21.600,00
Manutenção de equipamento e material (especificar)	MANUTENÇÃO	-	10.000,00	10.000,00
MATERIAL DE CONSUMO				94.000,00
Material de escritório do laboratório, plásticos, vidrarias e diversos para suporte administrativo, de logística, coleta de amostra e de trabalho de campo do projeto (especificar)	ANO	1	4.000,00	4.000,00
Material cirúrgico, plástico e de vidraria para análise a fresco (especificar)	ANO	1	10.000,00	10.000,00
Reagentes, vidrarias, plásticos e diversos para histopatologia (especificar)	ANO	1	20.000,00	20.000,00
Reagentes, vidrarias, plásticos e diversos para microbiologia (especificar)	ANO	1	20.000,00	20.000,00
Reagentes, vidrarias, plásticos e diversos para estudo de água e solo (especificar)	ANO	1	20.000,00	20.000,00
Reagentes, vidrarias, plásticos e diversos para biologia molecular (especificar)	ANO	1	20.000,00	20.000,00
MATERIAL PERMANENTE				48.600,00
Aerador portátil para auxiliar e manter a amostra de camarão viva. (especificar)	UND	01	1.000,00	1.000,00
Microscópio binocular (especificar)	UND	6	3.000,00	18.000,00
Microscópio trinocular (especificar)	UND	2	7.000,00	14.000,00
Fotocolorímetro para análise de água e solo. (especificar)	UND	02	3.750,00	7.500,00
Termobloco para análise de biologia molecular. (especificar)	UND	01	1.500,00	1.500,00
Estufa bacteriológica (especificar)	UND	01	3.000,00	3.000,00

Computadores (especificar)	UND	2	1.800,00	3.600,00
CUSTEIO			15.992,76	
Combustível do carro (12 meses) (01 carro)	LITROS	3085	4,25	13.112,76
Diária dos 02 Técnicos em Aquicultura e Pesca (12 meses).	DIÁRIA	24	120	2.880,00
TOTAL			280.900,00	



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
1ª Reunião Extraordinária de 2018

4. Deliberação e aprovação do seguinte projeto de extensão;
 - a. *Pontes de Mediação: A relação entre a unidade e a singularidade.* – Prof. José Albenes de Bezerra Júnior (CCSAH/ Departamento de Ciências Sociais e Aplicadas);



Portal do Docente

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
SISTEMA INTEGRADO DE GESTÃO DE ATIVIDADES ACADÊMICAS


EMITIDO EM 24/01/2018 12:50

VISUALIZAÇÃO DA AÇÃO DE EXTENSÃO
DADOS DA AÇÃO DE EXTENSÃO

Código:	PJxxx-2018
Título:	PONTES DE MEDIAÇÃO: A relação entre a unidade e a singularidade.
Ano:	2018
Período:	19/02/2018 a 19/11/2018
Tipo:	PROJETO
Situação:	AGUARDANDO APROVAÇÃO DOS DEPARTAMENTOS
Município de Realização:	
Espaço de Realização:	
Abrangência:	Local
Público Alvo:	Servidores docentes, servidores técnicos e estudantes
Unidade Proponente:	DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS / UFRSA
Unidade Orçamentária:	-
Outras Unidades Envolvidas:	OUVIDORIA / UFRSA
Área Principal:	COMUNICAÇÃO
Área do CNPq:	Outra
Fonte de Financiamento:	AÇÃO AUTO-FINANCIADA
Convênio FGD:	NÃO
Renovação:	NÃO
Nº Bolsas Solicitadas:	0
Nº Bolsas Concedidas:	0
Nº Discentes Envolvidos:	0
Faz parte de Programa de Extensão:	NÃO
Grupo Permanente de Arte e Cultura:	NÃO
Público Estimado:	600 pessoas
Público Real Atendido:	Não informado
Tipo de Cadastro:	SUBMISSÃO DE NOVA PROPOSTA
Contato	
Coordenação:	JOSE ALBENES BEZERRA JUNIOR
E-mail:	albenes.junior@ufersa.edu.br
Telefone:	

Detalhes da Ação
Justificativa:

Em todos os órgãos e entidades da Administração Pública Federal direta, indireta autárquica e fundacional, ou em qualquer órgão ou entidade que exerça atribuições delegadas pelo poder público, deverá ser criada uma Comissão de Ética, encarregada de orientar e aconselhar sobre a ética profissional do servidor, no tratamento com as pessoas e com o patrimônio público, competindo-lhe conhecer concretamente de imputação ou de procedimento susceptível de censura. (Decreto 1.171/94, Anexo, XVI). À Comissão de Ética incumbe fornecer, aos organismos encarregados da execução do quadro de carreira dos servidores, os registros sobre sua conduta ética, para o efeito de instruir e fundamentar promoções e para todos os demais procedimentos próprios da carreira do servidor público. (Decreto 1.171/94, Anexo, XVIII). Além disso, são funções técnicas da Comissão de Ética: Educativa, consultiva, conciliadora/mediadora e repressiva. Visto a multiplicidade de relações

existentes no âmbito da universidade, o projeto visa o diálogo plural e a busca de soluções aos mais diversos conflitos que existam (ou venham a existir).

Resumo:

O projeto "Pontes de Mediação: A relação entre a unidade e a pluralidade" é fruto de uma parceria entre a Comissão de Ética Profissional e Ouvidoria, ambas da UFERSA. A proposta é proporcionar o diálogo entre aqueles que compõem/fazem parte da unidade: Professores, técnicos, estudantes e comunidade geral (pluralidade). O ambiente acadêmico, visto a multiplicidade de relações, carece de maiores diálogos sobre os conflitos existentes (e os que podem existir). Dessa forma, mais que uma função repressiva, é fundamental que a Comissão de Ética Profissional e Ouvidoria mantenham uma aproximação constante com todos que compõem essa pluralidade, desempenhando outras funções: Educativa, informativa, consultiva e mediadora. Para isso, serão estabelecidas "pontes" entre todos (professores, técnicos, estudantes, comunidade) em todos os campi da UFERSA (Mossoró, Caraúbas, Pau dos Ferros e Angicos). Além de encontros periódicos, serão oferecidos cursos/palestras e discutidas/analizadas as propostas oferecidas). O campo educativo, preventivo, mediador é crucial para fortalecer um ambiente mais saudável, produtivo e ético.

Metodologia:

O projeto será desenvolvido em dois momentos distintos. O primeiro será direcionado aos encontros, reuniões com os docentes, técnicos e estudantes. Serão organizados eventos sobre temáticas diversas. O segundo será a discussão de propostas e ideias que possam fortalecer e enriquecer a boa relação e o ambiente saudável entre todos que compõe a universidade.

Referências:

AGUIAR, Roberto A. R. de. Habilidades. Ensino Jurídico e Contemporaneidade. Rio de Janeiro: DP&A, 2004. CAPPELLETTI, Mauro; GARTH, Bryant. Acesso à Justiça. Porto Alegre: Sergio Fabris, 2002. EGGER, Ildemar. A mediação como instrumento de fraternidade. In VERONESE, Josiane Rose Petry; OLIVEIRA, Olga Maria Boshi Aguiar. Direito e Fraternidade. Rio de Janeiro: Lumen Juris, 2013. GRINOVER, Ada Pellegrini. Projeto de lei sobre mediação e outros meios de pacificação. São Paulo: DPJ, 2006. _____. Os fundamentos da Justiça conciliativa. Revista de Arbitragem e Mediação, n.14, jul-set 2007, p.16-21. MANCUSO, Rodolfo de Camargo. A resolução dos conflitos e a função judicial no contemporâneo Estado de Direito. 2ed. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2014. _____. Acesso à Justiça: Condicionantes legítimas e ilegítimas. São Paulo, Revista dos Tribunais, 2012. SANTOS, Boaventura de Sousa. Introdução à Sociologia da Administração da Justiça, in José Geraldo de Sousa Júnior; Roberto A. R. de Aguiar (orgs.). Introdução Crítica ao Direito do Trabalho. Série O Direito Achado na Rua, vol. 2. Brasília: CEAD/NEP, 1993. _____. A Universidade no Século XXI. Para uma reforma democrática e emancipatória da Universidade. São Paulo: Cortez, 2004. SARAIVA, Enrique. Políticas Públicas. Coletânea Vol.1. Escola Nacional de Administração Pública. Brasília, 2007. SILVA, Eduardo Silva da. Meios complementares de acesso à Justiça: Fundamentos para uma teoria geral. Revista Processo e Constituição. Faculdade de Direito da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n.1, dez. 2004, p. 163-192. SOUSA JÚNIOR, José Geraldo de. Direito como Liberdade: O Direito Achado na Rua e experiências populares emancipatórias de criação do Direito. Brasília: UnB, 2009. http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/1401/1/TESE_2008_JoseGeraldoSJunior.pdf Acesso em 04.03.2016.

Membros da Equipe

Nome	Categoria	Função	Departamento	Início	Fim
CLAUDIA ALVES DE SOUSA MUNIZ	DOCENTE	Membro	DECEN	19/02/2018	19/11/2018
JOSE ALBENES BEZERRA JUNIOR	DOCENTE	Coordenador	DCSA	19/02/2018	19/11/2018
JOSEMIR DE SOUZA GONCALVES	DOCENTE	Membro	DCA	19/02/2018	19/11/2018
MARIA TAYNARA FERREIRA BEZERRA	SERVIDOR	Membro	OUVIDORIA	19/02/2018	19/11/2018
ANTONIO FRANKLINEY VIANA FAUSTINO	SERVIDOR	Membro	CCSAH	19/02/2018	19/11/2018
WENDSON MAX SILVINO	SERVIDOR	Membro	PROGRAD	19/02/2018	19/11/2018
ANTONIO WILTON DE MORAIS JUNIOR	SERVIDOR	Vice-Coordenador	OUVIDORIA	19/02/2018	19/11/2018

Discentes com Planos de Trabalho

Nome	Vínculo	Situação	Início	Fim
------	---------	----------	--------	-----

Discentes não informados

Ações Vinculadas ao PROJETO

Código - Título	Tipo
-----------------	------

Não há ações vinculadas

Ações das quais o PROJETO faz parte

Código - Título	Tipo
-----------------	------

Esta ação não faz parte de outros projetos ou programas de extensão

Objetivos / Resultados Esperados**Objetivos Gerais**

Proporcionar uma maior aproximação da Comissão de Ética Profissional e Ouvidoria com todos que compõem a universidade: Professores, técnicos, alunos e comunidade geral.

Quantitativos Qualitativos**Cronograma****Descrição das atividades desenvolvidas**

Planejamento e reuniões

Período

19/02/2018 a 19/11/2018

Lista de departamentos envolvidos na autorização da proposta**Autorização**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS - PAU DOS FERROS
 DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS
 DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
 OUVIDORIA
 CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS E HUMANAS
 PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

Data Análise**Autorizado**

NÃO ANALISADO
 NÃO ANALISADO
 NÃO ANALISADO
 NÃO ANALISADO
 NÃO ANALISADO
 NÃO ANALISADO