



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

DCA

3ª REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DE 2020

Data: 22 de Maio de 2020 (Sexta-feira)

Horário: 09h30min às 11h00min

Local: Reunião Virtual pelo Google Meet



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 e o representante estudantil, relacionados na lista anexa, a se fazerem presentes na **3ª Reunião Extraordinária de 2020 do DCA**, com data, local e horário, abaixo determinados, para cumprir a seguinte pauta:

1. Apreciação e deliberação sobre as justificativas de ausências enviadas ao email (dca@ufersa.edu.br);
2. Apreciação e aprovação da ata da 2ª Reunião Extraordinária de 2020 do DCA;
3. Apreciação e aprovação dos programas dos componentes curriculares:
ANI0023 ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMESTICOS I (1200080)
ANI0337 ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS II (1200083)
ANI0037 ANESTESIOLOGIA (1200094)
ANI0404 CLINICA CIRURGIA DE GRANDES ANIMAIS
ANI0398 CLINICA CIRURGICA DE PEQUENOS ANIMAIS
ANI0396 DIAGNOSTICO POR IMAGEM (1200103)
4. Apreciação e aprovação dos projetos de pesquisa:
 - Obtenção, caracterização e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americanas, Linnaeus, 1758) ALEXANDRE RODRIGUES SILVA
 - APERFEIÇOAMENTO DO DILUENTE PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) POR MEIO DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, ANTIOXIDANTES E DETERGENTES. ALEXANDRE RODRIGUES SILVA
 - USO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS FELINO EM ESTÁGIO AVANÇADO CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA

- ESTUDO DA INFECÇÃO CLÍNICA NATURAL PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV), ACHADOS DE IMAGENS E FATORES DE RISCO NAS COINFEÇÕES JOAO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES
- AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS PARA REGIÕES SEMIÁRIDAS LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS
- BIOQUÍMICA URINÁRIA DE EQUÍDEOS MICHELLY FERNANDES DE MACEDO
- PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) PARA TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM EQUÍDEOS MICHELLY FERNANDES DE MACEDO
- PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE BOA CONSTRICTOR MICHELLY FERNANDES DE MACEDO
- Atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro em camundongos MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA
- Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA
- Morfometria do leitão ao nascimento e sua relação com o desmame RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA
- Suplementação aminoacídica na ração de fêmeas suínas em lactação sobre o desempenho da leitegada RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA
- Monitoramento farmacoterapêutico da dipirona (metamizol) e tramadol em asininos (*Equus asinus*) VALERIA VERAS DE PAULA

Data: 22 de Maio de 2020 (Sexta-feira)

Local: Reunião Virtual pelo Google Meet

Horário: 09:30H às 11:00H

Mossoró-RN, 20 de maio de 2020

José Ernandes Rufino de Sousa
Chefe do Departamento de Ciências Animais (DCA)

RELAÇÃO DOS CONVOCADOS

	CONVOCADO	ASSINATURA
1	ALEXANDRE PAULA BRAGA	
2	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA	
3	ALEX AUGUSTO GONCALVES	AFASTAMENTO
4	ALEX MARTINS VARELA DE ARRUDA	
5	AMBROSIO PAULA BESSA JUNIOR	
6	ARACELY RAFAELLE FERNANDES RICARTE	
7	CARLOS CAMPOS CAMARA	
8	CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA	
9	DEBORA ANDREA EVANGELISTA FAÇANHA	
10	FELIPE DE AZEVEDO SILVA RIBEIRO	AFASTAMENTO
11	GENILSON FERNANDES DE QUEIROZ	
12	GUELSON BATISTA DA SILVA	
13	HUMBERTO GOMES HAZIN	
14	IVANILSON DE SOUZA MAIA	
15	Jael Soares Batista	
16	JEAN BERG ALVES DA SILVA	
17	JESANE ALVES DE LUCENA	
18	JOSE ERNANDES RUFINO DE SOUSA	
19	JOSEMIR DE SOUZA GONCALVES	
20	JULIANA FORTES VILARINHO BRAGA	
21	KÁTIA PERES GRAMACHO	
22	LERNER ARÉVALO PINEDO	
23	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS	
24	MARCELLE SANTANA DE ARAUJO	
25	MARCELO AUGUSTO BEZERRA	
26	MARCELO BARBOSA BEZERRA	
27	MAURÍCIO FRAGA VAN TILBURG	

28	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO	
29	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	AFASTAMENTO
30	PATRICIA DE OLIVEIRA LIMA	
31	PEDRO CARLOS CUNHA MARTINS	
32	RAIMUNDO ALVES BARRETO JUNIOR	
33	RAQUEL LIMA SALGADO	
34	REGINA VALERIA DA CUNHA DIAS	
35	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA	
36	ROGÉRIO TAYGRA VASCONCELOS FERNANDES	
37	STHENIA DOS SANTOS ALBANO AMORA	
38	VALDIR MARTINS DA FONSECA FILHO	
39	VALERIA VERAS DE PAULA	
40	WIRTON PEIXOTO COSTA	
REPRESENTANTE DISCENTE		
1	JOSIANY DE SOUZA CARNEIRO	



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
3ª Reunião Extraordinária de 2020

2. Apreciação e aprovação da ATA da 2ª Reunião extraordinária de 2020 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 VINTE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

1 No décimo nono dia do mês de maio do ano de dois mil e vinte, às nove horas e trinta
2 minutos, através da plataforma virtual Google Meet, foi realizada a Segunda Reunião
3 Extraordinária de dois mil e vinte do Departamento de Ciências Animais. Estiveram
4 presentes os seguintes membros: **José Ernandes Rufino de Sousa (Chefe do**
5 **departamento), Alexandre Rodrigues Silva, Alex Martins Varela de Arruda, Carlos**
6 **Eduardo Bezerra de Moura, Débora Andrea Evangelista Façanha, Genilson**
7 **Fernandes de Queiroz, Humberto Gomes Hazin, Jael Soares Batista, Josemir de**
8 **Souza Gonçalves, Jean Berg Alves da Silva, Juliana Fortes Vilarinho Braga, Kátia**
9 **Peres Gramacho, Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis, Marcelle Santana de**
10 **Araújo, Michelly Fernandes de Macedo, Pedro Carlos Cunha Martins, Raimundo**
11 **Alves Barreto Júnior, Regina Valéria da Cunha Dias, Rennan Herculano Rufino**
12 **Moreira, Rogério Taygra Vasconcelos Fernandes, Valéria Veras de Paula, Wirton**
13 **Peixoto Costa.** Justificaram a ausência os docentes: **Jesane Alves de Lucena, Marcelo**
14 **Augusto Bezerra, Sthenia dos Santos Albano Amora.** Docentes em afastamento: **Alex**
15 **Augusto Gonçalves, Felipe de Azevedo Silva Ribeiro, Moacir Franco de Oliveira.**
16 Tendo verificado a existência de quórum, o Chefe do departamento, **José Ernandes**
17 **Rufino de Sousa,** iniciou a leitura dos pontos da convocação, e, após verificar que todos
18 estavam de acordo com a mesma, declarou aberta a reunião e apresentou a pauta a
19 seguir: **PONTO 1: Apreciação e deliberação sobre as justificativas de ausências**
20 **enviadas ao e-mail (dca@ufersa.edu.br);** Aprovado por unanimidade. **PONTO 2:**
21 **Apreciação e aprovação da Ata da Terceira Reunião Ordinária do DCA em dois mil e**
22 **vinte.** Aprovada pela maioria dos presentes. **PONTO 3: Apreciação e aprovação da Ata**
23 **da Primeira Reunião Extraordinária do DCA em dois mil e vinte.** Aprovada também
24 pela maioria dos presentes. **PONTO 4: Apreciação e deliberação dos pontos de pauta**
25 **da 1ª Reunião Extraordinária de 2020 do CONSEPE. Ponto 1. Apreciação e deliberação**



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 VINTE
DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS**

26 sobre a Ata da Segunda e Terceira Reuniões Ordinárias de dois mil e vinte; Ponto
27 2. Apreciação e deliberação sobre renovações de afastamento; **Aprovado** por todos.
28 Ponto 3. Apreciação e homologação sobre designação pelo Reitor, ad referendum do
29 Consepe, de renovação de afastamento de servidores docentes. **Aprovado** por todos.
30 Ponto 4. Apreciação e emissão de parecer ao Consuni sobre processo de redistribuição;
31 A Assembleia se absteve em relação a esse ponto. Ponto 5. Apreciação e deliberação
32 sobre alteração do calendário da pós-graduação 2020.1, aprovado anteriormente pela
33 decisão Consepe/Ufersa nº 093/2019; **Aprovado** pela Assembleia com duas abstenções.
34 Ponto 6. Apreciação e deliberação sobre minuta de resolução que dispõe sobre a oferta
35 opcional de componentes curriculares em Período Suplementar Excepcional em função
36 da pandemia de COVID-19, durante a suspensão emergencial do calendário acadêmico
37 2020.1 da graduação; **Aprovado** com as seguintes alterações: Texto de Disposição
38 sugerido por Ricardo – PDF: Dispõe sobre a oferta opcional de componentes curriculares
39 em Período Suplementar Excepcional em função da pandemia de COVID-19, durante a
40 suspensão emergencial do calendário acadêmico 2020.1 da graduação na Universidade
41 Federal Rural do Semi- Árido (Ufersa). Texto do CONSIDERANDO sugerido por Relator
42 Quirino criar: CONSIDERANDO a Portaria Ufersa/GAB Nº 208/ 2020, que dispõe sobre
43 as medidas a serem adotadas no âmbito da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –
44 Ufersa, em virtude da necessidade de mitigar ameaças de propagação do COVID-19; No
45 segundo considerando foi aprovado o texto de Relator Quirino criar: CONSIDERANDO a
46 Orientação Normativa Ufersa/GAB Nº 1 de 27 de abril de 2020, que estabelece
47 orientações sobre o período letivo de que trata a Resolução CONSUNI/UFERSA Nº
48 012/2017; Foi acatado a supressão do último considerando sugerido por Ricardo – PDF.
49 Art;1 permanece com a redação original. Art; 2 redação sugerida por Lívio – CCBS: Art. 2º
50 O Período Suplementar Excepcional consiste na oferta excepcional e opcional de



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 VINTE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

51 componentes curriculares por meio de atividades pedagógicas não presenciais (APNP)
52 enquanto durar a suspensão do calendário acadêmico 2020.1. Bem como a sugestão do
53 parágrafo único Hudson – CMC - criar: Parágrafo Único. O retorno do Calendário
54 Acadêmico 2020.1 é condicionado à conclusão do Período Suplementar Excepcional. Art;
55 3 redação sugerida por Lívio – CCBS: Supressão do Art. 3º e o seu Parágrafo único passa
56 a pertencer ao Art. 2º. Justificativa: o texto estava redundante com o Art. 2º. Paragrafo
57 único do art. 3 seguiu a redação de Lívio – CCBS: Parágrafo único. As APNP constituem-
58 se de um Plano/Programa Especial de Estudos Domiciliares disponibilizado aos discentes
59 no SIGAA, podendo ser mediadas por tecnologias e/ou plataformas virtuais de ensino e
60 aprendizagem institucionais, a critério do docente. Art; 4 permanece com a redação
61 original. Art; 5 foi escolhida a redação sugerida por Ricardo – PDF Art. 5º O Período
62 Suplementar Excepcional será opcional aos docentes e discentes, e destinado aos(às)
63 discentes com vínculo ativo na Ufersa. Justificativa: proporcionar a participação dos
64 discentes que não conseguiram se matricular no semestre 2020.1 Art. 6 a Assembleia
65 seguiu a sugestão do professor Torres CCA: Verificar a possibilidade de contemplar
66 disciplinas com carga horária com mais de 60h, e conseqüentemente com duração maior
67 que 5 semanas). Ficando o parágrafo único com a redação sugerida por Lívio – CCBS:
68 Parágrafo único. Serão mantidas a ementa e a carga-horária dos componentes
69 curriculares oferecidos em período regular, assim como respeitadas as exigências de
70 pré-requisitos e co-requisitos. Justificativa: Os co-requisitos também deverão ser
71 respeitados. Art. 7 redação da PROGRAD - Art. 7º Os docentes que optarem por ofertar
72 componente curricular em Período Suplementar Excepcional deverão efetuar a solicitação
73 ao Departamento que o componente curricular está vinculado em conformidade com o Art.
74 4º. Parágrafo primeiro com a redação da PROGRAD - § 1º. No ato da solicitação o
75 docente deverá apresentar o Plano de Curso do Componente Curricular com o programa



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 VINTE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

76 de estudos, por meio de formulário disponibilizado pela PROGRAD, contendo no mínimo
77 os seguintes itens. Art; 8 Texto original. Art. 9 foi aprovado com o texto do professor Torres
78 CCA: Art. 9º. A aprovação e acompanhamento das Turmas de Período Suplementar
79 Excepcional são de competência do Departamento ao qual a disciplina está vinculada,
80 assegurando o cumprimento MÍNIMO OBRIGATÓRIO do Programa Geral do Componente
81 Curricular; Art; 10 aprovado com o texto de Torres CCA: Art. 10. Dispõe apenas que a
82 matrícula será feita via sigaa e o artigo 12º dispõe que o critério de matrícula será o valor
83 do IEA e nada mais descreve. O DCA sugere mesclar esses dois artigos que tratam do
84 mesmo tema e criar parágrafos especificando os critérios, sujeitos e ações necessárias
85 para a efetivação da matrícula. Por exemplo, a análise e efetivação da solicitação de
86 matrícula será feita pela Prograd? Art. 11 foi escolhida a redação original. O parágrafo
87 secundofica com a redação de PROEC: § 2º Os discentes aprovados em componentes
88 curriculares ofertados no Período Suplementar Excepcional, caso estejam matriculados
89 neste mesmo componente no semestre 2020.1 regular, terão esta última matrícula
90 excluída de seu Histórico Escolar. Sedo acatada a sugestão de se criar um parágrafo
91 terceiro por Quirino – CE - CRIAR: §3º A matrícula em atividade ou unidade curricular de
92 TCC ou projeto de TCC, poderá ser feita adicionalmente aos dois componentes
93 curriculares previstos no caput, desde que cumpridos os procedimentos estabelecidos na
94 RESOLUÇÃO CONSEPE/UFERSA N° 003/2019, de 22 de setembro de 2019 e atender
95 às prerrogativas do PPC do curso ao qual o aluno está vinculado, bem como um quarto
96 parágrafo sugerido pelo professor Torres CCA: Propõe § 3º que disponha também sobre o
97 que acontecerá em caso de reprovação? A reprovação constará no histórico? Art. 12
98 Todos se abstiveram, uma vez que votou-se pela junção do art. 10 com o mesmo.
99 Parágrafo único do art. 13 ficou assim: PROGRAD - Parágrafo Único. O registro de
100 frequência será vinculado à entrega de atividades definidas no Plano de Curso. Art. 14



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 VINTE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

101 redação dada por PROGRAD: Art. 14. Será permitido o trancamento de matrícula em
102 disciplina oferecida em Turmas de Período Suplementar Excepcional conforme calendário
103 definido pela PROGRAD. Art. 15 optou-se pela redação de Lívio – CCBS: Art. 15. A
104 matrícula nos componentes curriculares do tipo Trabalho de Conclusão de Curso e
105 Atividades Complementares serão realizadas pelas coordenações de curso. Todos foram
106 contrários a supressão do parágrafo primeiro do artigo 15. Art. 16 redação de Quirino –
107 CE Art. 16. O prazo para a consolidação das turmas será estabelecido no calendário letivo
108 definido pela PROGRAD. A maioria da Assembleia foi a favor da sugestão da PROGRAD-
109 criar artigo: Art. 18. Fica vedada a oferta de componentes curriculares que possuam carga
110 horária de laboratório. Bem como foram favoráveis a sugestão de Hudson – CMC- criar:
111 Art. XX. A UFERSA oferecerá capacitação a docentes e a discentes, antes do início das
112 atividades do período suplementar excepcional, para uso de plataformas digitais e de
113 metodologias de ensino-aprendizagem adequadas a EAD, estas especialmente aos
114 docentes. Encerrando a ordem do dia e nada mais havendo a tratar, o Chefe do
115 Departamento de Ciências Animais, professor José Ernandes Rufino de Sousa,
116 agradeceu a presença de todos e deu por encerrada a reunião e, para constar, eu, Maria
117 Verlangia Alves Peixoto, Secretária Executiva, lavrei a presente ata, que depois de lida e
118 achada conforme pelos presentes, segue assinada por mim e pelo Chefe do DCA,
119 professor José Ernandes Rufino de Sousa e demais membros quando aprovada.

Chefe do Departamento:

José Ernandes Rufino de Sousa _____

Membros Presentes:

Alexandre Rodrigues Silva _____

Abrósio Paula Bessa Júnior _____

Alex Martins Varela de Arruda _____



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 VINTE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

Carlos Eduardo Bezerra de Moura _____

Débora Andrea Evangelista Façanha _____

Genilson Fernandes de Queiroz _____

Guelson Batista da Silva _____

Humberto Gomes Hazin _____

Jael Soares Batista _____

Josemir de Souza Gonçalves _____

Jean Berg Alves da Silva _____

Juliana Fortes Vilarinho Braga _____

Kátia Peres Gramacho _____

Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis _____

Marcelle Santana de Araújo _____

Marcelo Barbosa Bezerra _____

Michelly Fernandes de Macedo _____

Moacir Franco de Oliveira _____

Pedro Carlos Cunha Martins _____

Raimundo Alves Barreto Júnior _____

Raquel Lima Salgado _____

Regina Valéria da Cunha Dias _____

Rennan Herculano Rufino Moreira _____

Rogério Taygra Vasconcelos Fernandes _____

Valéria Veras de Paula _____

Wirton Peixoto Costa _____

Secretário:

Maria Verlangia Alves Peixoto _____



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
3ª Reunião Extraordinária de 2020

3. Apreciação e aprovação dos programas dos componentes curriculares:



Componente Curricular: ANI0023 - ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMESTICOS I (1200080)

Créditos: 6 créditos

Carga Horária: 90 horas

Unidade Responsável: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

Tipo do Componente: DISCIPLINA

Ementa: Anatomia Veterinária Geral Osteologia Juntas (Artrologia, Sindesmologia) Miologia Neuroanatomia Pele e anexos.

Modalidade: Presencial

Dados do Programa

Ano-Período: 2020.1

Quantidade de Avaliações: 3

Objetivos

Objetivo geral:

Discutir conceitos introdutórios sobre estudo da anatomia veterinária, bem como fundamentos anatomofuncionais dos sistemas esquelético, articular, muscular, circulatório e nervoso, da pele e seus anexos; de forma integrada e aplicada a compreensão da clínica e cirurgia dos animais domésticos.

Objetivos específicos:

- Discutir sobre estudo da anatomia veterinária: conceitos, histórico, divisões e métodos;
- Esclarecer aspectos gerais da terminologia anatômica veterinária;
- Diferenciar os termos anatômicos de posição e direção nos animais domésticos;
- Demonstrar os sistemas esquelético, articular e muscular e suas constituintes;
- Descrever os sistemas circulatório e nervoso e seus constituintes;
- Demonstrar pele e seus anexos;
- Descrever as variações anatômicas do aparelho locomotor entre os animais domésticos;
- Descrever as variações anatômicas dos sistemas circulatório e nervoso entre os animais domésticos;
- Definir sistemas nervoso central e periférico;
- Diferenciar sistemas nervoso somático e visceral e seus componentes;
- Estabelecer relações interdisciplinares, destacando conhecimentos morfofuncionais e suas associações às demais disciplinas do curso de Medicina Veterinária.

Conteúdo Programático

Unidade	Tópicos e Conteúdo	Nº de Horas	
		Teórico	Prático
I	Introdução ao estudo da Anatomia Veterinária: conceito, histórico, divisão, objetivos; Nomenclatura anatômica; conceito de normal e variação em anatomia; fatores gerais de variação anatômica; Planos de delimitação, eixos de construção e planos de secção dos mamíferos domésticos; Antimetria, metameria, paquimeria e estratificação; Termos de posição e direção; Introdução à osteologia veterinária; Generalidades sobre o estudo dos ossos; Classificação e constituição dos ossos; Irrigação, drenagem e inervação dos ossos; Descrição dos ossos e das particulares da superfície dos ossos do membro torácico nas espécies domésticas; Descrição dos ossos e das particulares da superfície dos ossos do membro pélvico nas espécies domésticas; Descrição dos ossos e das particulares da superfície dos ossos do esqueleto axial nas espécies domésticas (cabeça, coluna vertebral, costelas e esterno); Introdução à Artrologia Veterinária. Conceitos, classificação das juntas; Articulações (juntas) sinoviais; Movimentos das juntas; Inervação e irrigação das juntas; Orlas, discos e meniscos.	12	18
II	Introdução ao estudo da anatomia macroscópica dos músculos; Variedades de músculos: músculos liso, cardíaco e estriado esquelético; Elementos anatômicos de um músculos esquelético; Fáscia muscular; Origem e inserção; Classificação anatômica dos músculos; Classificação funcional dos músculos;	12	18

	Ação muscular; Anexos musculares; Músculos do membro torácico; Músculos do membro pélvico; Músculos da cabeça e pescoço; Músculos tóraco-abdominais; Generalidade sobre o sistema cardiovascular; Aorta torácica e abdominal: origens e ramificação Sistema da veia cava cranial, cava caudal e porta hepático Pele e anexos.		
III	Sistema linfático: generalidades Linfáticos em geral e órgãos hematopoéticos Generalidades sobre o estudo do sistema nervoso: origem, classificação e divisões; Meninges, ventrículos, plexo coróide e líquido; Telencéfalo e diencéfalo; Tronco encefálico; Cerebelo; Nervos cranianos; Medula espinal; Nervos espinhais e plexos nervosos; Sistema nervoso autônomo; Sistema nervoso entérico; Vias neuronais.	12	18

Competências e Habilidades

- Reconhecer as relações entre a forma e a função dos órgãos e os sistemas;
- Identificar variações anatômicas dos ossos, articulações e músculos dos animais domésticos e suas implicações na clínica de cada espécie;
- Descrever a anatomia dos vasos sanguíneos comumente utilizados na venopunção e aferição da pressão arterial nos animais domésticos;
- Ilustrar vias neuronais óptica, olfativa, auditiva, vestibular, proprioceptiva, motoras, viscerais e da dor;
- Praticar coleta de líquido cefalorraquidiano na cisterna cerebelomedular e espaço interarqueado em cadáveres de animais;
- Reconhecer a anatomia das regiões dos bloqueios nervosos comuns na prática da medicina veterinária;
- Planejar a difusão de conhecimentos anatômicos para tutores, importantes nos cuidados com a saúde dos animais;
- Avaliar casos clínicos que permitam a aplicação dos conhecimentos de anatomia adquiridos na disciplina.

Metodologia

No ensino de anatomia dos animais domésticos serão empregadas metodologias ativas, como aprendizado baseado em problemas (ABP), sala de aula invertida, simulações, check list, problematização; bem como aulas expositivas dialógicas especialmente de temas e conceitos de maior complexidade; aulas práticas com peças anatômicas e cadáveres de animais formolizados, dissecações, estudos de casos e discussão de artigos científicos, atividades lúdico-interativas e trabalhos em equipe.

A avaliação se processará de forma contínua, sendo indispensável à participação ativa do aluno quanto a exposição de dúvidas, questões, problemas, participação nas atividades propostas, trabalho em equipe e se completará com a discussão e entrega de estudos de casos, relatórios de dissecações, súmula de artigos científicos e aplicação de provas teóricas e práticas.

Referências Bibliográficas Obrigatórias

Dyce, K. M.. Tratado de anatomia veterinária . . Elsevier. 2010. ISBN: 978-85-352-3672-9 (ENC.)

Frandsen, Rower D.. Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda . 6.ed.. Guanabara Koogan. 2011. ISBN: 978-85-277-0962-9 (Broch.)

Konig, Horst Erich. Anatomia dos animais domésticos . 6.ed.. Artmed. 2016. ISBN: 978-85-8271-299-3 (Broch.)

Referências Bibliográficas Complementares

Getty, Robert. Sisson/Grossman: anatomia dos animais domésticos. . Guanabara Koogan. 1981. ISBN: 85-201-0079-1 (Enc.)

MacCracken, Thomas O.. Spurgeon atlas colorido de anatomia de grandes animais: fundamentos. . Guanabara Koogan. 2004. ISBN: 978-85-277-0888-4 (Broch.)

Ashdown, Raymond R. Atlas colorido de anatomia veterinária de equinos . 2.ed.. Elsevier. 2011. ISBN: 978-85-352-5038-1

APROVADO PELO DEPARTAMENTO EM

APROVADO PELO CONSEPE EM

Para conferir as informações contidas neste documento, acesse https://sigaa.ufersa.edu.br/sigaa/public/componentes/busca_componentes.jsf, informando o código do componente curricular e o nível de ensino correspondente.

SIGAA | Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação - (84) 3317-8210 | Copyright © 2006-2020 - UFERSA - srv-sigaa02-prd.ufersa.edu.br



Componente Curricular: ANI0037 - ANESTESIOLOGIA (1200094)

Créditos: 4 créditos

Carga Horária: 60 horas

Unidade Responsável: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

Tipo do Componente: DISCIPLINA

Ementa: CODIGO ANTIGO: 1200094

Modalidade: Presencial

Dados do Programa

Ano-Período: 2020.1

Quantidade de Avaliações: 3

Objetivos

1. Estudar a farmacodinâmica e farmacocinética dos principais fármacos utilizados em anestesia.
2. Avaliação e monitoração do paciente durante o período peri-operatório.
3. Emprego de técnicas anestésicas nas diferentes espécies.
4. Estudar a dor no paciente cirúrgico e saber aliviá-la;
5. Estudar a reanimação cardiorrespiratória e cerebral.
6. Estudar os equipamentos de anestesia, bem como os circuitos de anestesia

Conteúdo Programático

Unidade	Tópicos e Conteúdo	Nº de Horas	
		Teórico	Prático
I	Introdução à Anestesia Avaliação pré-anestésica Medicação pré-anestésica: Anticolinérgicos. Tranquilizantes: Fenotiazinas, butirofenonas e benzodiazepínicos Sedativos: Alfa2-agonistas. Estudo da dor e analgésicos opioides.	12	8
II	Anestesia Geral Intravenosa: Não Barbitúrica: Dissociativos, Imidazólicos e Fenólicos. Barbitúricos Intubação Anestesia Geral Inalatória Equipamentos de Anestesia	12	8
III	Anestésicos Locais Técnicas de anestésias locais Técnicas Anestésicas em eqüinos Ressuscitação Cardiopulmonar e Cerebral	12	8

Competências e Habilidades

Competencias e habilidades

Metodologia

As metodologias empregadas são aulas expositivas com utilização de projetor multimídia, textos e discussão com os alunos, aulas práticas com atendimento de pacientes para a aplicação das técnicas anestésicas e fármacos estudados. Utilização de cadáveres para treino das técnicas utilizadas em anestesia. Estudos dirigidos e conteúdos deixados no SIGAA para complementação do ensino.

Referências Bibliográficas Obrigatórias

CORTOPASSI, S. R. G.; FANTONI, T. D. Anestesia em cães e gatos. 2 ed. São Paulo: Roca, 2010. 620pp.
TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. Lumb's & Jones Anestesiologia e analgesia em veterinária. 5 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2017, 1056pp.
LUNA, S. P. L.; CARREGARO, A. B. Anestesia e Analgesia em Equídeos, Ruminantes e Suínos. São Paulo: MedVet, 2019696p.

Referências Bibliográficas Complementares

DOBERTY, T.; VALVERDE, A. Manual de Anestesia & Analgesia em Equinos. São Paulo: Roca, 2008. 334pp.
DUKE, J. Segredos em Anestesiologia. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 584p.
MANICA, J. Anestesiologia Princípios e Técnicas. 3 ed. São Paulo: Artmed, 2004 1386pp.
CANGIANI, L.M.; POSSO, I.P.; POTÉRIO, G.M.B.; NOGUEIRA, C.S. Tratado de Anestesiologia SAESP. 8 ed. São Paulo: Atheneu. V. 1 e 2, 2018.4000p
MASSONE, F. Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas Texto e Atlas. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 428 pp.

APROVADO PELO DEPARTAMENTO EM

APROVADO PELO CONSEPE EM

Para conferir as informações contidas neste documento, acesse https://sigaa.ufersa.edu.br/sigaa/public/componentes/busca_componentes.jsf, informando o código do componente curricular e o nível de ensino correspondente.

SIGAA | Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação - (84) 3317-8210 | Copyright © 2006-2020 - UFRSA - srv-sigaa02-prd.ufersa.edu.br



Componente Curricular: ANI0337 - ANATOMIA DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS II (1200083)

Créditos: 6 créditos

Carga Horária: 90 horas

Unidade Responsável: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

Tipo do Componente: DISCIPLINA

Ementa: Esplanologia. Conceito de Viscera. Cavidade Celomáticas. Sistema Respiratório, Sistema Digestório, Sistema Urinário, Sistemas Genitais Masculino e Feminino, Sistema endócrino e Órgãos do sentido.

Modalidade: Presencial

Dados do Programa

Ano-Período: 2020.1

Quantidade de Avaliações: 3

Objetivos

Objetivo geral:

Proporcionar fundamentos anatômicos referentes às cavidades celomáticas, esplanologia e órgãos dos sentidos, de forma integrada com outros aspectos morfofisiológicos e aplicados a compreensão da clínica, cirurgia e reprodução dos animais domésticos.

Objetivos específicos:

- Discutir conceitos sobre órgãos e vísceras;
- Descrever cavidades celomáticas, seus revestimentos e limites;
- Demonstrar sistemas viscerais e as vísceras que os compõe;
- Identificar a vascularização e inervação das vísceras;
- Descrever as variações anatômicas das vísceras entre os animais domésticos;
- Demonstrar os órgãos dos sentidos e sua constituição;
- Estabelecer relações interdisciplinares, destacando conhecimentos morfofuncionais e suas associações às demais disciplinas do curso de Medicina Veterinária.

Conteúdo Programático

Unidade	Tópicos e Conteúdo	Nº de Horas	
		Teórico	Prático
I	Esplanologia: conceito de órgãos, vísceras, classificação e divisão das cavidades do corpo Cavidade torácica Coração e vasos da base Sistema respiratório: conceitos e generalidades Sistema respiratório: nariz externo, cavidade nasal, seios paranasais, nasofaringe e laringe Sistema respiratório: traqueia, brônquios, pulmões, pleura e músculos respiratórios Inervação e vascularização dos órgãos do sistema respiratório Generalidades sobre endocrinologia Glândulas endócrinas	12	18
II	Cavidade abdominal Sistema digestório: conceitos e generalidades Sistema digestório: boca, glândulas salivares, faringe e esôfago Sistema digestório: estômago dos animais domésticos Sistema digestório: Intestinos e peritônio Sistema digestório: Fígado e pâncreas Inervação e vascularização dos órgãos do sistema digestório Sistema urinário: generalidades e arquitetura renal Sistema urinário: rins, ureteres, bexiga e uretra	12	18
III	Cavidade pélvica Sistema genital masculino: conceitos e generalidades Sistema genital masculino: testículos, envoltórios testiculares, epidídimo, ductos deferentes e glândulas anexas Sistema genital masculino: pênis, músculos associados a ereção e prepúcio Inervação e vascularização dos órgãos do sistema genital masculino Sistema genital feminino: conceitos e generalidades Sistema genital feminino: ovários e tubas uterinas dos animais domésticos	12	18

Sistema genital feminino: útero, vagina, vulva e glândulas anexas dos animais domésticos		
Sistema genital feminino: placenta e outros anexos fetais		
Inervação e vascularização dos órgãos do sistema genital feminino		
Estesiologia: olho e anexos		
Estesiologia: orelha		

Competências e Habilidades

- Reconhecer as relações entre a forma e a função dos órgãos e os sistemas;
- Diferenciar as vísceras que compõem os diversos sistemas viscerais do corpo animal;
- Localizar as vísceras contidas nas cavidades celomáticas e suas relações de sintopia;
- Praticar a dissecação das cavidades celomáticas, seus revestimentos e vísceras;
- Investigar a constituição dos órgãos dos sentidos e sua relação com o sistema nervoso;
- Comparar os sistemas orgânicos entre espécies domésticas, identificando as variações anatômicas e suas implicações na fisiologia própria de cada espécie;
- Praticar toracocentese, entubação endotraqueal, passagem de sonda nasogástrica, drenagem do ducto nasolacrimal em cadáveres de animais;
- Planejar a difusão de conhecimentos anatômicos para tutores importantes nos cuidados com a saúde dos animais;
- Avaliar casos clínicos que permitam a aplicação dos conhecimentos de anatomia dos sistemas viscerais e órgãos dos sentidos.

Metodologia

No ensino de anatomia dos animais domésticos serão empregadas metodologias ativas, como aprendizado baseado em problemas (ABP), sala de aula invertida, simulações, check list, problematização; bem como aulas expositivas dialógicas especialmente de temas e conceitos de maior complexidade; aulas práticas com peças anatômicas e cadáveres de animais formolizados, dissecações, estudos de casos e discussão de artigos científicos, atividades lúdico-interativas e trabalhos em equipe.

A avaliação se processará de forma contínua, sendo indispensável à participação ativa do aluno quanto a exposição de dúvidas, questões, problemas, participação nas atividades propostas, trabalhos em equipe e se completará com a discussão e entrega de estudos de casos, relatórios de dissecações, súmula de artigos científicos e realização de provas teóricas e práticas.

Referências Bibliográficas Obrigatórias

Dyce, K. M.. Tratado de anatomia veterinária . . Elsevier. 2010. ISBN: 978-85-352-3672-9 (ENC.)

Konig, Horst Erich. Anatomia dos animais domésticos . 6.ed.. Artmed. 2016. ISBN: 978-85-8271-299-3 (Broch.)

Frandsen, Rower D.. Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda . 7.ed.. Guanabara Koogan. 2011. ISBN: 978-85-277-1818-9 (Broch.)

Referências Bibliográficas Complementares

MacCracken, Thomas O.. Spurgeon atlas colorido de anatomia de grandes animais: fundamentos. . Guanabara Koogan. 2004. ISBN: 978-85-277-0888-4 (Broch.)

Getty, Robert. Sisson/Grossman: anatomia dos animais domésticos. . Guanabara Koogan. 1981. ISBN: 85-201-0079-1 (Enc.)

Ashdown, Raymond R. Atlas colorido de anatomia veterinária de equinos . 2.ed.. Elsevier. 2011. ISBN: 978-85-352-5038-1

APROVADO PELO DEPARTAMENTO EM

APROVADO PELO CONSEPE EM

Para conferir as informações contidas neste documento, acesse https://sigaa.ufersa.edu.br/sigaa/public/componentes/busca_componentes.jsf, informando o código do componente curricular e o nível de ensino correspondente.



Componente Curricular: ANI0396 - DIAGNOSTICO POR IMAGEM (1200103)

Créditos: 4 créditos

Carga Horária: 60 horas

Unidade Responsável: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

Tipo do Componente: DISCIPLINA

Ementa: Radiologia Veterinária (introdução ao estudo da radiologia veterinária; propriedades, aplicação e segurança radiológica; técnicas e posicionamentos radiográficos em medicina veterinária; interpretação radiográfica); Ultrassonografia Veterinária (introdução ao estudo da ultrassonografia veterinária; propriedades e aplicação do ultrassom diagnóstico; técnicas e posicionamentos ultrassonográficos em medicina veterinária; interpretação de exames ultrassonográficos); Endoscopia Veterinária e outros métodos de diagnóstico por imagem (tópicos introdutórios).

Modalidade: Presencial

Dados do Programa

Ano-Período: 2020.1

Quantidade de Avaliações: 3

Objetivos

Introduzir conceitos básicos sobre o estudo dos meios de Diagnóstico por Imagem em Medicina Veterinária, com ênfase em radiologia e ultrassonografia, apresentando também tópicos de endoscopia e outras técnicas por imagem em animais domésticos e silvestres.

Conteúdo Programático

Unidade	Tópicos e Conteúdo	Nº de Horas	
		Teórico	Prático
I	Introdução ao estudo do Diagnóstico por Imagem em Medicina Veterinária; Introdução à Radiologia e Ultrassonografia Veterinária; Endoscopia veterinária e outras técnicas por imagem; Propriedades em radiologia e ultrassonografia veterinárias; Técnicas de segurança em radiologia e ultrassonografia veterinárias; Técnicas radiográficas contrastadas; Projeções radiográficas ortogonais e janelas acústicas em medicina veterinária; Interpretação de exames por imagem;	10	10
II	Anatomia por imagem e principais enfermidades do aparelho locomotor de pequenos animais - apendicular; Anatomia por imagem e principais enfermidades do aparelho locomotor de grandes animais - apendicular; Anatomia por imagem e principais enfermidades do aparelho locomotor de pequenos animais - axial; Diagnóstico por imagem do aparelho locomotor de animais silvestres;	8	12
III	Diagnóstico por imagem da cavidade torácica de pequenos animais; Diagnóstico por imagem do aparelho digestório de pequenos animais; Diagnóstico por imagem do aparelho gênito-urinário de pequenos animais; Diagnóstico por imagem abdominal e torácico de animais silvestres.	8	12

Competências e Habilidades

Nesta disciplina os discentes terão as noções básicas das principais técnicas por imagem em medicina veterinária, facilitando o entendimento das enfermidades e ajudando no tratamento e obtenção de prognóstico.

Metodologia

Aulas teóricas expositivas;
Aulas práticas na UFERSA e em clínicas e fazendas externas;
Discussão de casos clínicos;
Análise e discussão de artigos científicos.

Referências Bibliográficas Obrigatórias

O'Brien, Robert T.. Radiologia torácica para o clínico de pequenos animais . . Roca. 2003. ISBN: 857141437-1 (Enc.)

Kealy, J. Kevin. Radiologia e ultrassonografia do cão e do gato . 5.ed.. Elsevier. 2012. ISBN: 978-85-352-4510-3 (Broch.)

Carvalho, Cibele Figueira. Ultra-sonografia em pequenos animais . Roca. 2004. ISBN: 85-7241-514-9 (Enc.)

Referências Bibliográficas Complementares

Heuwieser, W.. Exame de gestação em bovinos por meio de ultrassonografia: guia para diagnóstico preciso e conduta econômica na prática veterinária. . MedVet. 2010. ISBN: 978-85-62451-04-1 (Broch.)

. Diagnóstico de radiologia veterinária . . Elsevier. 2010. ISBN: 978-85-352-3563-0 (Enc.)

APROVADO PELO DEPARTAMENTO EM

APROVADO PELO CONSEPE EM

Para conferir as informações contidas neste documento, acesse
https://sigaa.ufersa.edu.br/sigaa/public/componentes/busca_componentes.jsf, informando o código do componente curricular e o nível de ensino correspondente.

SIGAA | Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação - (84) 3317-8210 | Copyright © 2006-2020 - UFERSA - srv-sigaa02-prd.ufersa.edu.br

**Componente Curricular:** ANI0398 - CLINICA CIRURGICA DE PEQUENOS ANIMAIS**Créditos:** 4 créditos**Carga Horária:** 60 horas**Unidade Responsável:** DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS**Tipo do Componente:** DISCIPLINA**Ementa:** CÓDIGO ANTIGO: 1200105**Modalidade:** Presencial

Dados do Programa

Ano-Período: 2020.1**Quantidade de Avaliações:** 3

Objetivos

1. Proporcionar uma visão global sobre as afecções cirúrgicas que mais frequentemente acometem animais domésticos de pequeno porte (ênfoque cães e gatos);
2. Conduzir casos clínicos referentes a estas afecções, com vistas a elaborar os diagnósticos;
3. Realizar os procedimentos cirúrgicos casuísticos;
4. Integrar os discentes na realização de estudos em grupo, normatização de trabalhos, familiarização e uso de terminologias técnicas, amadurecimento de raciocínio crítico e abordagens discursivas ante os temas a serem ministrados.
5. Embasar o encaminhamento, quando necessário, dos casos mais complexos aos centros mais especializados, com histórico clínico adequadamente elaborado e suspeita clínica fundamentada.

Conteúdo Programático

Unidade	Tópicos e Conteúdo	Nº de Horas	
		Teórico	Prático
I	INTODUÇÃO À DISCIPLINA, PLANO DE ENSINO, AULAS PRÁTICAS AFECÇÕES CIRÚRGICAS NA CABEÇA Ouvido externo: Otohematomas. Boca: Fraturas mandibulares e maxilares. Cirurgias extraoculares: do globo ocular e órbita; blefaroplastias; cirurgias em membranas nictantes (prolapsos de glândulas lacrimais); agenesia de ducto nasolacrimal; enucleação, exenteração e evisceração de globo ocular. AFECÇÕES CIRÚRGICAS NO PESCOÇO E TÓRAX Afecções do esôfago: corpos estranhos esofágicos (cervicais e torácicos), rupturas e estenoses. Afecções da traquéia: estenose e colapso traqueal, rupturas traumáticas. Afecções de glândulas salivares: mucocelos e rânulas salivares. Aulas práticas: Casuísticas do HOVET relacionadas aos temas	12	12
II	AFECÇÕES CIRÚRGICAS NO ABDÔMEN Afecções gástricas: gastrotomias, gastrectomias, gastropexias; dilatação e torção gástrica, dilatação vólculo-gástrica; piloroplastias, piloromiotomias. Afecções intestinais: obstruções, torções, intussuscepções, prolapsos e amputações retais; Patologias de saco perianal. Hérnia perianal. Afecções do sistema urinário: Cistotomias, ectopias ureterais, hipospadias. Afecções do sistema reprodutor feminino: tumores mamários, piometra, edema e prolapso vaginal, prolapso uterino. Afecções do sistema reprodutor masculino: hipertrofias prostáticas benignas, abscesso prostáticos. Aulas práticas: Casuísticas do HOVET relacionadas aos temas	12	12
III	SISTEMA AO/ASIF Introdução, histórico, cursos, princípios técnicos ortopédicos, instrumentais e implantes metálicos utilizados, princípios e objetivos da fixação interna; aspectos e indicação do uso de fixadores esqueléticos internos e externos. Principais implantes metálicos ortopédicos: pinos lisos de "Steinman e Rush", pinos de rosca central, pinos de Schanz, pinos de rosca total. Parafusos para ossos corticais e esponjosos. Fios metálicos. Hastes bloqueadas. Prótese total de quadril (acetábulo, colo e cabeça femural). Placas: neutras, PCD, PCD-L, bloqueadas. AFECÇÕES CIRÚRGICAS ÓSSEAS E ARTICULARES	6	6

<p>Fraturas em membros torácicos e pélvicos. Luxação patelar. Displasia coxo-femoral. Ruptura de ligamentos do joelho (ligamentos cruzados craniais e caudais, laterais e colaterais).</p> <p>AFECÇÕES CIRÚRGICAS NA COLUNA ESPINAL Instabilidade atlantoaxial; Discopatias (Hansen I, Hansen II e Hansen III) cervicais, tóraco-lombares e lombares; síndrome compressão de cauda eqüina; Traumatismos na coluna vertebral. Abordagens e principais técnicas utilizadas na resolução de enfermidades ou afecções pós-traumáticas da coluna espinal: laminectomias dorsais, hemilaminectomias, corpectomias, fenestrações de discos intervertebrais (na extrusão ou protusão de discos intervertebrais; Resoluções com uso de pinos metálicos, placas ósseas, parafusos, fios metálicos, cimentos ósseos (resinas e outros polímeros) e combinações.</p> <p>Casuísticas do HOVET relacionadas aos temas</p>		
---	--	--

Competências e Habilidades

A Disciplina é proposta com o objetivo de proporcionar aos alunos o conhecimento teórico e a vivência básica sobre as principais patologias tratáveis cirurgicamente, que ocorrem em animais de companhia (com ênfase em caninos e felinos domésticos). Abordando, de forma global, considerações sobre as definições; fisiopatologias clinicamente relevantes; os diagnósticos; tratamentos cirúrgicos; a descrição da técnica cirúrgica mais adequada; os cuidados e avaliações pós-operatórios; possíveis complicações pós-operatórias e, os prognósticos prováveis, distribuídos nos tópicos que se seguem. I. Afecções cirúrgicas na cabeça; II. Afecções cirúrgicas no pescoço e tórax; III. Afecções cirúrgicas abdominais; IV. Afecções cirúrgicas locomotoras (ósseas e articulares); V. Afecções cirúrgicas na coluna e medula espinal.

Metodologia

A metodologia utilizada para alcançar os objetivos de ensino da disciplina será acolhida pela somatória de três elementos, conforme segue.

TÉCNICAS

Através de aulas expositivas e práticas, estudos práticos (casuísticas), estudos bibliográficos e de separatas.

RECURSOS DIDÁTICOS

Aulas e seminários expositivos com uso de instrumentais multimídias, quadro branco e pincel, protótipos, instrumentais especiais, aprendizagem de técnicas cirúrgicas em peças anatômicas ou cadáveres animais, acompanhamento e atendimentos de pacientes hospitalares.

INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

Através dos meios preconizados no regimento geral da UFERSA, com maior foco na realização de provas escritas, cirurgias práticas no HOVET, atendimentos de extensão, avaliações de relatórios das aulas práticas, seminários em aulas discursivas, participação em aulas e por trabalhos individuais.

Referências Bibliográficas Obrigatórias

1. FOSSUM, T. W. Cirurgia de pequenos animais. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2015.
2. SLATTER, D. Fundamentos de oftalmologia veterinária. São Paulo: ROCA. 3ª. Ed. 2007. 686p.
3. SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. Barueri, SP: Manole. 3ª. Ed. Vol.1 e 2. p. 1-2713. 2007.

Referências Bibliográficas Complementares

1. BOJRAB, M.J. Cirurgia dos pequenos animais. São Paulo:ROCA. 1991.
2. DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. Cirurgia ortopédica em cães e gatos. São Paulo: Roca. 4ª.Ed. 2006. 496p.
3. PRESTES, N.; ALVARENGA, F. C.L. Obstetrícia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006. 241p.
4. SOUZA, H.J.M. Coletâneas em medicina e cirurgia felina. Rio de Janeiro: L.F. Livros. 2003. 475p.
5. WHEELER, S.J.; SHARP, J.H. Diagnóstico e tratamento cirúrgico das afecções espinais do cão e gato. São Paulo: Manole. 1999.

APROVADO PELO DEPARTAMENTO EM

APROVADO PELO CONSEPE EM

Para conferir as informações contidas neste documento, acesse https://sigaa.ufersa.edu.br/sigaa/public/componentes/busca_componentes.jsf, informando o código do componente curricular e o nível de ensino correspondente.



Componente Curricular: ANI0404 - CLINICA CIRURGIA DE GRANDES ANIMAIS

Créditos: 4 créditos

Carga Horária: 60 horas

Unidade Responsável: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS

Tipo do Componente: DISCIPLINA

Ementa: CÓDIGO ANTIGO: 1200110

Modalidade: Presencial

Dados do Programa

Ano-Período: 2020.1

Quantidade de Avaliações: 3

Objetivos

1. Proporcionar uma visão global sobre as afecções cirúrgicas que mais frequentemente acometem animais domésticos de grande porte (com ênfase em equídeos e ruminantes);
2. Conduzir casos clínico-cirúrgicos referentes a estas afecções, com vistas a elaborar os diagnósticos;
3. Realizar os procedimentos cirúrgicos casuísticos;
4. Integrar os discentes na realização de estudos em grupo, normatização de trabalhos, familiarização com terminologias técnicas, amadurecimento de raciocínio crítico e abordagens discursivas ante os temas a serem ministrados.
5. Embasar o encaminhamento, quando necessário, dos casos mais complexos aos profissionais ou centros mais especializados, com histórico clínico adequadamente elaborado e suspeita clínica fundamentada.

Conteúdo Programático

Unidade	Tópicos e Conteúdo	Nº de Horas	
		Teórico	Prático
I	INTRODUÇÃO À DISCIPLINA, PLANO DE ENSINO, INFORMES		
	AFECÇÕES CIRÚRGICAS NA REGIÃO DA CABEÇA Narinas e anexos: sinusites; trepanação dos seios nasais e paranasais. Olhos e anexos: traumatismos de pálpebras; úlcera de córnea; obstrução, atresia e agenesia de ducto nasolacrimal; enucleação de globo ocular. Boca e língua: fraturas em mandíbulas; fraturas dentárias (repulsão de dentes molares); traumatismos da língua (lacerações); afecções do palato (travagem, palatite crônica). Crânio: cisto dentífero e do temporal.	12	12
II	AFECÇÕES CIRÚRGICAS NA REGIÃO CERVICAL Esôfago: obstrução esofágica. Traquéia: obstrução e estenose traqueal; fratura e necrose de anéis traqueais (traqueotomia e traqueostomia). Hemiplegia laríngea. Aulas práticas: casuísticas do HOVET relacionadas aos temas		
	AFECÇÕES CIRÚRGICAS ABDOMINAIS Sistema digestório de equídeos: Abdome agudo equino Obstrução intestinal simples e estrangulativa (síndrome cólica: vólvulo, intussuscepção, compactações, enterólitos e fecalomas). Sistema digestório de ruminantes: Reticulite traumática e suas complicações (reticuloperitonite, reticulopericardite, reticulopleuropneumonia e síndrome de indigestão vagal); deslocamentos, torções e compactações abomasais; compactação, dilatação e torção cecal; enterotomias e enterectomias; prolapso retal e atresia anal. AFECÇÕES CIRÚRGICAS GENITO-URINÁRIAS Pênis, Prepúcio e Testículos: hematoma do pênis; Balanopostite; Abscesso prepucial; Circuncisão e Falectomias; Acropostites-fimose (balanopostite); Criptorquidismos. Sistema Urinário: Urolitíases e Obstruções uretrais em bovinos e equinos; Ruptura vesical em potros. Útero, Cérvix e Vagina: Prolapsos; Torção uterina; Laceração perianal em éguas e vacas, Procedimento de Kaslick. Glândula mamária: Reparo de laceração em tetas. Aulas práticas: casuísticas do HOVET relacionadas aos temas	12	12
III	AFECÇÕES CIRÚRGICAS EM LOCOMOTOR Fraturas em membros de equinos. Desmotomias patelares em equinos e em bovinos. Afecções podais em ruminantes: Amputações de falanges. Afecções	6	6

podais em equinos: Síndrome do navicular; Compressão do ligamento anular em equinos. Miotenectomia extensora digital lateral; Tenectomia dos tendões flexores digitais superficiais, profundos e, check superior e inferior; Tenectomia cúnea; Neurectomia digital palmar e plantar em equinos; Fraturas em metacarpos e falanges de equinos; Amputação de dígitos em bovinos.		
--	--	--

Aulas práticas: casuísticas do HOVET relacionadas aos temas

Competências e Habilidades

A Disciplina é proposta com o objetivo de proporcionar aos alunos o conhecimento teórico e a vivência básica sobre as principais patologias tratáveis cirurgicamente, que ocorrem em animais de grande porte (equídeos e ruminantes). Abordando, de forma global, considerações sobre as definições; fisiopatologias clinicamente relevantes; os diagnósticos; tratamentos cirúrgicos; a descrição das técnicas cirúrgicas mais adequadas; os cuidados e avaliações pós-operatórios; possíveis complicações pós-operatórias e, os prognósticos prováveis. Distribuídos nos tópicos que se seguem. I. Afecções cirúrgicas na região da cabeça; II. Afecções cirúrgicas na região cervical III. Afecções cirúrgicas abdominais; IV. Afecções cirúrgicas genito-urinárias; V. Afecções cirúrgicas locomotoras.

Metodologia

A metodologia utilizada para alcançar os objetivos de ensino da disciplina será acolhida pela somatória de três elementos, conforme segue.

TÉCNICAS

Através de aulas expositivas e práticas, estudos práticos (casuística), estudos bibliográficos e de separatas.

RECURSOS DIDÁTICOS

Aulas e seminários expositivos com uso de instrumentais multimídias, quadro branco e pincel, protótipos, instrumentais especiais, aprendizagem de técnicas cirúrgicas em peças anatômicas ou cadáveres animais, acompanhamento e atendimentos de pacientes hospitalares.

INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

Através dos meios preconizados no regimento geral da UFERSA, com maior foco na realização de provas escritas, cirurgias práticas no HOVET, atendimentos de extensão, avaliações de relatórios das aulas práticas, seminários em aulas discursivas, participação em aulas e por trabalhos individuais.

Referências Bibliográficas Obrigatórias

1. AUER, S. Equine Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders. 3ª.Ed., vol.1, 2006. 1390p.
2. ROSENBERGER, G. Exame Clínico dos Bovinos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 3ª. Ed. 1993. 419p.
3. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo: Roca, 1985. 341p.

Referências Bibliográficas Complementares

1. ADAMS, S. B.; FESSLER, J.F. Atlas of equine surgery. Philadelphia: W.B. Saunders. 2000. 428p.
2. KNOTTENBELT, D.C.; PASCOE, R.R. Afecções e distúrbios do cavalo. São Paulo: Manole. 1988. 432p.
3. OEHME, F.W. Textbook of Large Animal Surgery. Baltimore: Williams & Wilkins, 2a. ed., 1988. 714p.
4. PRESTES, N.; ALVARENGA, F. C.L. Obstetrícia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006. 241p.
5. WHITE, N.A.; MOORE, J.N. Current Practice of Equine Surgery. Philadelphia: Lippincott, 1990, 763p.

APROVADO PELO DEPARTAMENTO EM

APROVADO PELO CONSEPE EM

Para conferir as informações contidas neste documento, acesse https://sigaa.ufersa.edu.br/sigaa/public/componentes/busca_componentes.jsf, informando o código do componente curricular e o nível de ensino correspondente.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
Departamento de Ciências Animais
3ª Reunião Extraordinária de 2020

4. . Apreciação e aprovação dos projetos de pesquisa:

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20020-2020

Título: Obtenção, caracterização e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americana, Linnaeus, 1758)

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: ema, espermatozoide, epidídimo, reprodução, biobanco

E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/07/2020 a 31/08/2023

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Reprodução Animal

Especialidade: Inseminação Artificial Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

As emas (Rhea americana) são aves nativas da América do Sul, que possuem grande importância ecológica na manutenção de ecossistemas. No entanto, apesar de seu papel primordial, Segundo a União Internacional para Conservação da Natureza as emas encontram-se globalmente quase ameaçadas. O declínio na população das emas tem como um dos principais causadores a caça pela pele e carne, visto que essa espécie também possui potencial econômico. Nesse contexto, pesquisar os aspectos reprodutivos e aplicar biotécnicas reprodutivas é de fundamental importância para auxiliar na conservação bem como na multiplicação das emas em cativeiro para fins comerciais. Dessa forma o objetivo da presente tese é estabelecer protocolos eficientes para a obtenção, avaliação e conservação de espermatozoides de emas, além disso, propõem-se caracterizar as mudanças espermáticas durante a maturação dos espermatozoides. Para tanto serão utilizadas emas provenientes do abate programado do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). No primeiro experimento espermatozoides serão obtidos por flutuação de diferentes segmentos do complexo epidídimo-ducto deferente. As amostras serão processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão a fim de se caracterizar as mudanças que ocorrem durante a passagem do espermatozoide por essas estruturas. No segundo experimento os espermatozoides serão obtidos pelas técnicas de flutuação e lavagem retrograda, para se comparar esses dois métodos de obtenção. Após a coleta serão validadas diferentes técnicas de avaliações espermáticas: CASA, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, acrossoma e cromatina espermática, e atividade mitocondrial. No terceiro experimento os espermatozoides serão obtidos, pela melhor técnica testada no experimento 2, criopreservados em diferentes diluidores (TRIS, TES, ACP e OVODYL™) suplementados com 15% de gema de ovo de galinha e 6% de dimetilcetamida e avaliados conforme os testes validados também no experimento 2. Por fim, os dados coletados serão submetidos a análises estatísticas e em todos os casos será adotado nível de significância $p < 0,05$. Com isso, espera-se descrever os espermatozoides de emas, estabelecer protocolos para avaliação e congelamento de espermatozoides de emas.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

Do ponto de vista socioeconômico, as aves exercem papel fundamental como fonte de alimento saudável e rico em proteínas; sua carne tenra e nutritiva é considerada de baixo teor calórico e os ovos, energéticos e revigorantes, são apreciados em todos os meios, tanto rural como urbano (MALAVAZZI, 1999). Nesse contexto a criação de emas (rheicultura) no Brasil está aumentando tendo em vista sua carne e plumas de grande valor no mercado agropecuário (MOURA et al., 2012; CERVI et al., 2016). Além disso, possuem importância ecológica na manutenção da biodiversidade. No entanto, devido a caça, bem como a destruição e fragmentação de seu habitat, além da destruição de ovos por máquinas agrícolas, queimadas e predação, as emas (Rhea americana) estão quase globalmente ameaçadas (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016).

Para que as emas tenham mais destaque socioeconômico na avicultura brasileira bem como para garantir sua conservação, faz-se necessário investir em pesquisas que favoreçam o conhecimento das características peculiares desta espécie, incluindo os aspectos morfofisiológicos e biotecnologias relacionadas à sua reprodução (GÓES, 2004). Estudos envolvendo os aspectos reprodutivos das emas já foram relatados como por exemplo, a caracterização ultraestrutural da espermiogênese (PHILLIPS; ASA, 1989), a morfologia dos ovários (PARIZZI et al., 2007), a morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca (SANTOS et al., 2011), a obtenção de sêmen e a caracterização de alguns parâmetros espermáticos GÓES et al., 2010), sendo praticamente inexistente a aplicação de técnicas reprodutivas visando a conservação do seu material genético.

Nesse contexto, a criopreservação de espermatozoides aparece como uma valiosa ferramenta para a conservação de material genético de diversas espécies animais (COSTA; MARTINS, 2008), dentre as quais a ema. Assim, em inúmeras espécies de aves, protocolos de criopreservação de espermatozoides vêm sendo testados, mostrando resultados promissores (BLANCO et al., 2000; BLESBOIS et al., 2007; PEIXOTO, 2010; EHLING et al., 2012). Nas emas, não existem relatos de criopreservação de espermatozoides; no entanto, nos avestruzes, espécie mais próxima das emas (GIANNONI, 1996), Smith (2016) relatou a aplicação desta técnica, estabelecendo importantes parâmetros, como por exemplo, as curvas de congelamento e descongelamento utilizadas, que poderão ser extrapoladas e adaptadas para as emas.

Uma das primeiras etapas, no entanto, para a formação de um banco de germoplasma em emas consiste na obtenção dos espermatozoides. No geral, em aves, os espermatozoides destinados à criopreservação podem ser obtidos por meio da técnica de massagem digital, no entanto este método exige contenção física e condicionamento dos animais, o que pode lhes causar estresse (CARVALHO; FRENEAU; SANTOS, 2006). Em emas, já foram obtidas amostras de sêmen por esta técnica, no entanto muitos ejaculados obtidos não continham espermatozoides ou estavam contaminados dificultando as análises (GÓES et al., 2010). Uma alternativa também interessante à formação de bancos de recursos genéticos, consiste na obtenção de espermatozoides de animais que vieram subitamente a óbito. Em aves, entretanto, a aplicação desta possibilidade é ainda pouco usual. Um dos poucos relatos desta técnica foi reportado em codornas por Góis (2018), que obteve espermatozoides a partir dos ductos deferentes, uma vez que é este o local de armazenamento de espermatozoides em aves. O autor demonstrou então, ser possível a obtenção de espermatozoides viáveis (60%) e com motilidade ($79,16 \pm 0,95\%$) (GÓIS, 2018). Por outro lado, em mamíferos, espermatozoides são correntemente obtidos do epidídimo de animais abatidos por meio dos métodos de flutuação e lavagem retrógrada (BEZERRA et al., 2014). Assim, é possível que a adaptação destas metodologias para a ema possibilite a recuperação de espermatozoides em todo o seu trânsito desde o epidídimo ao ducto deferente, fornecendo subsídios não só para seu armazenamento, mas também para a realização de análises que permitam compreender a maturação espermática nesta espécie.

Neste sentido, avaliar a qualidade das amostras espermáticas obtidas, além de permitir a compreensão de fenômenos fisiológicos, permite também a avaliação da eficiência de protocolos de conservação espermática. Em emas, Góis et al. (2010) reportaram a avaliação espermática no tocante aos parâmetros de volume do sêmen, concentração, motilidade e morfologia. No entanto, para aumentar a acurácia em predir o potencial fecundante de uma amostra espermática, outros testes complementares vêm sendo propostos para diferentes espécies. Dentre esses, podem ser citados a Análise Computadorizada de Sêmen (CASA), que fornecem dados cinéticos dos espermatozoides (EHLING et al., 2012; SMITH et al., 2016), o teste hiposmótico que avalia a funcionalidade da membrana plasmática (SMITH et al., 2016), a avaliação da integridade da membrana plasmática, da cromatina, do acrossoma e o teste de função mitocondrial por meio de fluorescência (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009; PARTYKA et al., 2012; SMITH et al., 2016; GÓIS, 2018; PARTYKA et al., 2012).

Uma vez obtidos e submetidos à análise inicial, os espermatozoides devem ser processados em um meio diluente que lhes proporcione ação tamponante, nutrientes, substrato energético, estabilidade da membrana plasmática e manutenção da pressão osmótica (DONOGHUE et al., 2000). Em aves já foram descritos a utilização de diluentes para refrigeração e congelamento de espermatozoides tais como o ácido N, N-bis (2-hidroxi-etil) -2-aminoetano sulfônico (BES), ácido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano sulfônico (TES) (DONOGHUE et al., 2000), Água de Coco em Pó (ACP) (RONDON et al., 2008; FREITAS et al., 2018), Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) (BAKST; SEXTON, 1979; van der LAAN, 2007) e o OVODYL™ (MORRELL et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; SŁOWIN SKA et al., 2007; 2012; CIERESZKO et al., 2011).

Outro fator de suma importância para o sucesso da criopreservação de espermatozoides é a escolha dos crioprotetores e suas concentrações adequadas, capaz de reduzir os danos causados pelas baixas temperaturas (BONGALHADO, 2013). Essas substâncias são divididas em crioprotetores externos e internos dependendo do seu local de ação em relação a célula (van der LAAN, 2007). Alguns exemplos de crioprotetores externos já relatados em criopreservação de espermatozoides de aves são a gema de ovo de galinha (SANTOAGO-MORENO et al., 2012; ABOUELEZZ et al., 2015) e a Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (van der LAAN, 2007; SHAHVERDI et al., 2015). Quanto aos crioprotetores internos, já foram utilizados em aves o glicerol (WISHART, 1995), o etilenoglicol (EG) (KURBATOV et al., 1980), a dimetilformamida (DMF) (EHLING et al., 2012), o dimetilsulfóxido (DMSO) (SMITH, 2016), e a metilacetamida (MA) (EHLING et al., 2012; PARTYKA et al., 2012; SMITH, 2006). Assim, tendo em vista a importância das emas, justifica-se a realização deste estudo por possibilitar a compreensão de eventos relativos à sua maturação espermática no epidídimo e armazenamento no ducto deferente. Além disso, pretende-se obter informações relativas à aplicação de metodologias de obtenção de espermatozoides em animais abatidos e o desenvolvimento de um protocolo para a criopreservação de espermatozoide. Tais conhecimentos poderão auxiliar a conservação da espécie através da formação de bancos de germoplasma.

Objetivos

Objetivo Geral

- Estabelecer protocolos eficientes para a obtenção, avaliação e conservação de espermatozoides de emas (Rhea americana).

Objetivos Específicos

- Testar os métodos de obtenção de espermatozoides por flutuação e lavagem retrógrada do ducto deferente em emas.
- Caracterizar as mudanças estruturais que ocorrem durante a maturação do espermatozoide ao longo do seu trajeto no epidídimo e ducto deferente
- Caracterizar a morfometria do espermatozoide de emas.
- Testar e validar métodos adequados para avaliações de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, morfologia, condensação de cromatina e integridade do acrossoma de espermatozoides de emas.
- Comparar os diluentes TRIS, TES, ACP e OVODYL™ na criopreservação dos espermatozoides de emas.

Metodologia

Locais de execução e bioética

Os animais utilizados serão provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). A obtenção dos espermatozoides a partir dos complexos epidídimo-ducto deferente, avaliações e refrigeração serão realizados no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), o processamento das amostras para as microscopias eletrônicas será realizado no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada e as imagens serão obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFERSA. O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEU -UFERSA) sob parecer 05/2020.

Animais experimentais e manejo

Para o experimento, serão utilizadas carcaças de animais que tenham vindo a óbito ou animais que tenham se acidentado sendo necessária a eutanásia. Estes animais deverão ser adultos em idade reprodutiva \pm 2,0 anos de idade e com peso médio de 34,0 kg. A coleta dos complexos testículos-epidídimos ocorrerá durante a estação reprodutiva, entre os meses de maio ou junho e indo até novembro ou dezembro. Para cada fase experimental espera-se um "N" de pelo menos 5 animais.

Desenho Experimental

A presente tese será dividida em três experimentos:

- No primeiro experimento, os espermatozoides serão obtidos por flutuação de diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto. As amostras serão processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão afim de se caracterizar as mudanças que ocorrem durante a passagem do espermatozoide por essas estruturas. Além disso, uma alíquota das amostras de espermatozoides será utilizada para a caracterização morfológica através do software ImageJ®.
- No segundo experimento os espermatozoides serão obtidos pelas técnicas de flutuação e lavagem retrógrada, para se comparar esses dois métodos de coleta. Após a obtenção dos espermatozoides, serão validadas diferentes técnicas de avaliações espermáticas: CASA, teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática, acrossoma e cromatina espermática, e, atividade mitocondrial.
- No terceiro experimento, os espermatozoides serão obtidos pela melhor técnica testada no experimento 2 e avaliados conforme os testes validados também no experimento 2. Posteriormente, as amostras serão criopreservadas testando-se os diluentes descritos na figura 4.

Obtenção dos espermatozoides

Os complexos testículo-epidídimo-ducto deferente esquerdo e direito serão dissecados e lavados externamente com solução fisiológica a 38°C. Para a obtenção de espermatozoides do primeiro experimento será utilizada a técnica de flutuação separadamente em diferentes seguimentos do complexo epidídimo-ducto deferente. Resumidamente, esses seguimentos serão fatiados com bisturi em uma placa de Petri contendo solução fisiológica a 38°C. Após 5 minutos em posição estática, os tecidos serão removidos e a suspensão será avaliada (CARY et al., 2004).

No segundo experimento, o ducto deferente será fatiado integralmente sem divisões. Para a lavagem retrógrada, resumidamente, serão realizadas ligaduras nas duas extremidades do ducto deferente, a fim de evitar o extravasamento dos espermatozoides. Na sequência, o segmento será mantido em posição vertical, a ligadura da extremidade inferior retirada e será feita a injeção de solução fisiológica a 38°C no lúmen, com auxílio de uma seringa e agulha imediatamente abaixo da ligadura superior remanescente, fazendo com que os espermatozoides sejam carregados e recuperados na outra extremidade, sendo acondicionados em tubos apropriados (SILVA et al., 2011).

Morfometria Espermática

Esfregaços de rosa de Bengala serão preparados utilizando-se uma alíquota de 5 μ L de espermatozoides que será incubada com 45 μ L do corante Rosa de Bengala. Posteriormente, serão retirados 10 μ L da amostra e depositados sobre uma lâmina que será coberta com uma laminula e selada para posterior análise. Campos aleatórios da lâmina serão fotografados através a microscopia de luz conectada a software analisador de imagem. Com células serão analisadas a partir das fotomicrografias medindo-se estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda separadamente por meio do software ImageJ® (SAYED et al., 2017).

Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Para a análise da MEV, os espermatozoides serão fixados no reagente de Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) a 27 ° C. Após o período de fixação as amostras serão centrifugadas a 800 x g por 10 min, em seguida três lavagens de 5 min cada serão realizadas com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, os pellets formados serão desidratados e submetidos a banhos de acetona em concentrações crescentes (50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada. Os pellets serão desfeitos e uma gota (300 μ L) da suspensão será depositada em uma laminula de vidro e seca ao ar. As laminulas serão montadas em stubs com a ajuda de fita de carbono. Para metalização, os stubs serão colocados em um metalizador e metalizados com uma camada de ouro de 20 nm para posterior observação com um microscópio eletrônico de varredura (BEZERRA et al., 2018).

Processamento e avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Para a análise da MET, será utilizada a metodologia de Soares e Beletti et al (2006) com modificações, resumidamente, os espermatozoides serão fixados em glutaraldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação por 48 horas, as amostras serão centrifugadas a 800 x g por 10 min, em seguida lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2) duas vezes por 10 minutos e então, pós-fixados por quatro horas em glutaraldeído a 3% e uma hora em tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio a 1,25%. Finalmente, o pellet será incluído em resina Epon e posteriormente será cortado em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos. Os cortes serão contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Por fim os cortes serão examinados em microscópio eletrônico.

Avaliações espermáticas

Após a coleta dos espermatozoides, será mensurado o volume recuperado utilizando pipetas e tubos graduados. Uma pequena alíquota da solução contendo espermatozoides será depositada sobre lâmina de vidro e levada ao microscópio de luz (100x, 400x), onde serão avaliados a motilidade espermática (0-100%) e o vigor (0-5). A concentração espermática será avaliada em câmara de Neubauer (SMITH, 2016).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides, serão confeccionados esfregaços com o corante Rosa de Bengala. Onde serão analisadas 200 células espermáticas por lâminas sob microscopia de luz (100x), sendo classificadas em morfológicamente normais ou portadores de alterações subdivididas de acordo com a região espermática afetada (cabeça, peça intermediária, cauda) (GÔES, 2003)

Teste Hiposmótico

Alíquotas de sêmen (10 μ L) serão adicionadas a 90 μ L de várias soluções hiposmóticas e incubadas por 40 minutos a 37 ° C. Para tanto, serão utilizadas água destilada (0mOsm / L) e soluções de frutose (50, 100, 150 e 200mOsm / L). Após a incubação, as avaliações serão realizadas sob microscopia de contraste de fase (x1000). Um total de 200 espermatozoides serão contados em pelo menos cinco campos e classificados como reativos ou não reativos com base na presença ou ausência de caudas enroladas (inchadas), respectivamente. A porcentagem de espermatozoides com defeitos na cauda (com base na avaliação da morfologia espermática) será subtraída da porcentagem de espermatozoides reativos (SANTOS et al., 2013).

Flash Frozen

Para a validação das avaliações de integridade da membrana plasmática, acrossoma, cromatina e atividade mitocondrial será realizado o flash frozen. Resumidamente, as amostras serão divididas em duas alíquotas: uma mantida viável e a outra submetida à congelamento rápida em nitrogênio líquido, seguida de descongelamento lento por três vezes consecutivas para causar injúrias à membrana celular (CELEGHINI, 2005). Três tratamentos serão feitos a partir destas alíquotas com as seguintes proporções de espermatozoides frescos e espermatozoides submetidos ao flash frozen: 100:0 (T100), 50:50 (T50) e 0:100 (T0).

Avaliação da integridade do acrossoma

Para avaliação acrossomal, amostras de espermatozoides serão fixadas em 0,5 mL de solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente por 15 min e, em seguida, armazenadas a 4°C até serem processadas para coloração acrossomal. Os espermatozoides fixos serão então centrifugados por 8 min a 3000g e o sobrenadante descartado. Os pellets serão lavados duas vezes com 0,5 mL de acetato de amônio 0,1 M (pH 9,0) e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 50 μ L da solução de acetato de amônio. Uma alíquota desta suspensão será espalhada nas lâminas de microscópio e deixada secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas serão inundadas com coloração de Coomassie (Coomassie Blue G-250 a 0,22%; 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água desionizada) por 90 s (Larson e Miller 1999), lavada com água desionizada, seca à temperatura ambiente e preservada permanentemente, colocando uma laminula sobre uma gota de meio de montagem. De cada amostra, 200 espermatozoides serão avaliados individualmente quanto à integridade acrossomal, utilizando microscopia de campo claro a 1000x. A integridade acrossômica será classificada como: (1) intacta (coloração escura uniforme sobre a região do acrossoma com coloração clara ou inexistente da região pós-acrossomal); (2) danificado (coloração não uniforme ou irregular sobre a região acrossomal); ou (3) não intacto (ausência total de coloração acrossomal ou coloração apenas no segmento equatorial; a região pós-acrossomal geralmente é levemente corada em azul) (THIANGTUM et al., 2006).

Avaliação da Condensação da Cromatina

Para a avaliação da integridade da cromatina serão confeccionados esfregaços utilizando-se 10 μ L das amostras que serão fixados em 3:1 etanol:ácido acético por 1 min e em etanol a 70% por 3 min, posteriormente, serão submetidos a imersão em solução 4M de HCl por 25 min, lavados em água destilada e secados a temperatura ambiente. Em seguida, 5 μ L de Azul de Toluidina serão depositados sobre o esfregaço, sendo coberto por uma laminula e imediatamente avaliado em microscopia de campo claro, serão contadas 500 células e classificadas em negativos e positivos. Os espermatozoides levemente corados em azul claro serão considerados normais (negativos) e aqueles corados em azul escuro à violeta serão considerados com cromatina alterada (positivos).

Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e atividade Mitocondrial por Fluorescência

A associação de sondas fluorescentes diacetato de 6-diacetato de carboxifluoresceína (0,46 mg C-FDA / 1 ml de dimetilsulfóxido) e iodeto de propídio (Solução salina 0,9% PI / 1 ml 0,5 mg) será testada para avaliação da membrana plasmática, para isso, alíquotas de sêmen (5 μ L) serão diluídas em 20 μ L da solução fluorescente e mantidas em ambiente escuro por dez minutos. Em seguida, serão preparadas lâminas para microscopia recobertas com laminula, as quais serão avaliadas em microscopia de epifluorescência (400x). Serão avaliadas 200 células, espermatozoides marcados em vermelho (IP) serão considerados sem membrana íntegra espermatozoides marcados em verde (-CFDA) serão considerados com membrana degenerada (SOUZA et al., 2013).

A associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo, Hoechst33342, FITC-PS e CMXRos (Mito Tracker Red) será utilizada para avaliar simultaneamente a integridade

de membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial. Para tanto, serão colocados 150µL das amostras (25 x 106 spzt/mL) em um microtubo, posteriormente será adicionado 2µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL em DPBS) que serão incubados por 10 minutos a 37° C, em seguida serão adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 0,5 µL de CMXRos (500 µM em DMSO) e 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS) e incubados por 8 minutos a 38,5° C. Em seguida, as lâminas para microscopia poderão ser preparadas, colocando uma alíquota sobre uma lâmina e recobrimo com lamínula. As avaliações serão realizadas em microscopia de epifluorescência (1000x). Serão avaliadas 200 células, espermatozoides marcados em vermelho (IP) serão considerados com membrana degenerada, espermatozoides marcados em azul (Hoechst) serão considerados com membranas íntegras, espermatozoides com acrossoma marcado em verde-amarelado serão considerados com acrossoma lesionado e espermatozoides com peças intermediárias marcadas em vermelho serão considerados com atividade mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007).

Congelamento e descongelamento dos espermatozoides de emas

Para a congelamento dos espermatozoides de emas, serão utilizadas como base, as metodologias propostas por Santiago-Moreno et al. (2012) e Smith et al. (2016) com algumas modificações. Dessa forma, inicialmente as amostras serão diluídas nos tratamentos conforme mostrado na figura 4. Serão resfriadas a uma taxa de 1°C/min até a temperatura final de 5°C. Posteriormente será adicionada a dimetilcetamida pré-resfriada de modo que a concentração final seja 6% e a concentração de espermatozoides seja de 100 milhões/ml. As amostras então serão equilibradas por 15 min a 5°C, em seguida envasadas nas palhetas, em seguida, congeladas uma taxa padronizada de 5 °C/min de 5 °C a -20 °C, nucleação a -20 °C e de -20 °C a -80 °C a uma taxa de 10 °C/minuto. Depois disso, as palhetas serão mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C. As palhetas serão então descongeladas após pelo menos uma semana por 1 minuto e 20 segundos a 5 °C, posteriormente, as amostras serão transferidas para tubos em banho maria a 38° C e serão avaliadas conforme citado para o material fresco.

Análise Estatística

Todas as variáveis serão expressas como média e erro padrão, a análise de homocedasticidade será realizada pelo teste de Levene e a normalidade será verificada através do teste de Shapiro-Wilk e partir desta análise inicial, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias.

Referências

- ABOUELEZZ, F. M.; CASTANO, C.; TOLEDANO-DIAZ, T.; ESTESO, M. C.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; et al. Sperm-egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. *Theriogenology*, 83: 1541-1547, 2015.
- AGUIAR, L. M. S.; MAURO, R. A. *Ema - Rhea americana*. Fauna e Flora do Cerrado, 2004. Disponível em: < <http://www.cnpqg.embrapa.br/series/ema/Ema.htm> >.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTINEZ, F.; CHAMORRO, C.; PAZ, P. Evaluation of three different extenders for use in emergency salvaging of epididymal spermatozoa from a cantabric brown bear. *Reprod Dom Anim*, 46: 85-90, 2011.
- AZEVEDO, C. S.; SILVA, M. C.; TEIXEIRA, T. P.; YOUNG, R. J.; GARCIA, Q. S.; RODRIGUES, M. Effect of passage through the gut of Greater Rheas on the germination of seeds of plants of cerrado and caatinga grasslands. *Emu*, 113: 177-182, 2013.
- BAKST, M. R. A microscopist's view of poultry reproductive tracts and gamete. *Brit. Poultry Sci.*, 72: 940-43, 1993.
- BAKST, M. R.; SEXTON, T. J. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *J Reprod Fert*, 55, 1-7, 1979.
- BENEZ S.M. Aves: criação, clínica, teoria e prática. Robe, São Paulo, 1998.
- BEZERRA, J. A. B.; SILVA, A. M.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of Recovery Method and Centrifugation on Epididymal Sperm from Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Zoo Sci*, 31: 338-342, 2014.
- BHAT, G.; MAITI, B. R. Sex accessories morphology and during the seasonal testicular cycle of a subtropical wild avian species, the yellow-throated parrot *Petronia xanthocolis*, Burton. *Biol. Rhythm Res.*, 31:41-49, 2000.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Rhea americana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22678073A92754472. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016.3.RLTS.T22678073A92754472.en>, 2016.
- BLANCO, J. M.; GEE, G.; WILDT, D. E.; TSELUTIN, K.; DONOGHUE, A. M. Semen cryopreservation in poultry and non-domestic species: A comparative approach to understanding the fundamentals of avian spermatozoa cryobiology, *British Poultry Science*, 41: 6-7, 2000.
- BLESBOIS, E. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63, 213-222, 2007.
- BONGALHARDO, D. C. Production and preservation of rooster semen. *Rev Bras Reprod Anim*, 37: 131-135, 2013.
- BRUNING, D. E. Social structure and reproductive behavior in the greater rhea. *Living Bird*, 13: 251-294, 1974.
- BURROWS, W. H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16: 19-24, 1937.
- CARRER, C. C.; KORNFIELD, M. E. A criação de avestruzes no Brasil. Pirassununga, SP, 304p, 1999.
- CARVALHO, S. F. M. Estudo de morfologia macroscópica, microscópica testicular e epididimária em emas (*Rhea americana*, Linnaeus - 1758) (RHEIDAE). Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor Ciência Animal junto a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009.
- CARVALHO, S. F. M.; FRENEAU, G. E.; SANTOS, A. L. Q. Methods for semen collecting in ostrich (*Struthio camelus*, Linnaeus, 1758) and emu (*Dromaius novaehollandiae*, Linnaeus, 1758), and some quantitative and qualitative characteristics. *Biosci J*, 22: 159-168, 2006.
- CARY, J. A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J. T.; DUOOS, L.; FAHNING, M. L. A. Comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J*, 41: 45-35, 2004.
- CAVALCANTE, A. K. S. Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.
- CERVI, R. C.; CAFÉ, M. B.; CAVALLIERI, A. L. F.; ANDRADE, M. A. Physical, chemical and microbiological features in ratitas eggs - A review. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ*, 3: 107-116, 2016.
- CIERESZKO, A.; DIETRICH, G. J.; LISZEWSKA, E.; KRZYWIŃSKI, A.; KOBUS, A. Short-term storage and cryopreservation of black grouse and capercaillie semen. *European Journal of Wildlife Research*, Springer Verlag, 57: 383-388, 2010.
- CODENOTTI, T. L.; BENINCA, D.; ALVAREZ, F. Etograma y relacion de la conducta con la edad en el ñandú. *Doñana, Acta Vertebrata*, Sevilla, 22: 65-86, 1995.
- CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. Cooperative breeding between males in the Greater Rhea *Rhea americana*. *IBIS*, 139: 568-571, 1997.
- CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. Mating behavior of the male greater rhea. *The Wilson Bulletin*, 113: 85-89, 2001.
- COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; COGNIE, Y.; CHAI, N.; LEGENDRE, X.; MAUGE, R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55: 649-659, 2001.
- COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Univ Ci Saúde*, 6(1):39-55, 2008.
- DANI, S. A *ema Rhea americana*. Belo Horizonte, Fundação Acangaú, 136p, 1993.
- DE REVIERS, M. Transport, survie et pouvoir fécondant des spermatozoides chez les vertébrés. *Ins. Natl. Santlé. Rech. Méd.*, 26: 35-60, 1974.
- DONOGHUE, A. M.; WISHART, G. J. Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 213-232, 2000.
- EHLING, C.; TAYLOR, U.; BAULAIN, U.; WEIGEND, S.; HENNING, M.; RATH, D. Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture and Forestry Research*, 3 (62): 151-158, 2012.
- FERNANDEZ, G. J.; REBOREDA, J. C. Male parental care in greater rheas (*Rhea americana*) in Argentina. *Auk: a journal of ornithology*, Lawrence, 120: 418-428, 2003.
- FOOTE, R. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. *J Androl* 21: 355, 2000.
- FREDIANI, M. H.; GUIDA, F. J. V.; SALGADO, P. A. B.; GONÇALVES, D. R.; BLANK, M. H.; NOVAES, G. A.; PEREIRA, R. J. G. Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. *Theriogenology*, 125:140-151, 2019.
- FREITAS, B. K. M.; CRUZ, F. G. G.; RUFINO, J. P. F.; FEIJÓ, J. C.; MELO, R. D.; MELO, L. D. Powdered coconut water as preservative of semi-heavy cocks semen. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, 19: 216-222, 2018.
- FROMAN, D. P.; KIRBY T. D. Reprodução em aves, p.207-242. In: Hafez E.S.E. (Ed.), *Reprodução Animal*. 7ª ed. Manole, São Paulo, 2004.
- FRANZO, V. S.; VULCANI, V. A. S. Epidídimo e testículo de aves: Revisão literária. *PUBVET, Londrina*, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 852, 2010.
- GIANNONI, M. L. Emas e Avestruzes - uma alternativa para o produtor rural. *Jaboticabal: FUNEP*, 49, 1996.
- GÓES, P. A. Características reprodutivas de emas machos (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no Estado de São Paulo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004.
- GÓES, P. A. A.; CAVALCANTE, A. K. S.; NICHÍ, M.; PEREZ, E. G. A.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Reproductive Characteristics of Captive Greater Rhea (*Rhea americana*) Males Reared in the State of São Paulo, Brazil. *Braz J of Poultry Sci*, 2: 57-62, 2010.
- GÓIS, R. C. S. Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) em codorna (*Coturnix coturnix* japônica Linnaeus, 1758) macho: características seminais, estudo histopatológico e histomorfométrico do parênquima testicular. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do SemiÁrido, 2018.
- GOPINGER, E.; BORELLI, A. S. F.; XAVIER, E. G.; BONGALHARDO, D. C.; DIONELLO, N. J. L.; ZANUSSO, J. T.; ROLL, V. F. B. Effect of flaxseed oil in the diet of male quail (*Coturnix coturnix coturnix*) on semen characteristics and biometric evaluation of testicles. *RPCV*, 107: 177-181, 2012.
- GRUNDER, A. A.; PAWLUCZUK, F. A. Comparison of procedures for collecting semen from rangers and insemination geese. *Poultry Science*, 70: 1975-1980, 1991.
- GVARYAHU, G.; ROBINSON, B.; MELTZER, A.; PEREK, M.; SNAPPIR, N. An improved method for obtaining semen from Muscovy ducks and some its quantitative and qualitative characteristics. *Poultry Science*, 63: 548-553, 1984.
- HEROLD, F. C.; AURICH, J. E.; GERBER, D. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with TriladyITM but the addition of seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*, 61: 715-724, 2004.
- HICKS-ALLDREDGE, K. D. Ratite reproduction. In: Tully TN, Shan SM. *Ratites: management, medicine and surgery*. Malabar: Krieger Publishing Company; 188p, 1996.
- HOSKEN, F. M.; SILVEIRA, A. C. Criação de Emas. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, P362, 2003.
- KOTLOWSKA, M.; DIETRICH, G.; WOJTCZAK, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 67: 276-286, 2007.
- KOZDROWSKI, R.; NIZ 'AN' SKI, W.; DUBIEL, A.; OLECH, W. Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 31, 2011.
- KURBATOV, A. D.; NARUBINA, L.; IVANOV, B.G.; BUBLIAEVA, G. B.; MOSKALENKO, L. I.; Effect of ETG on cock sperm at temperatures above and below 08C. *Bull. VNIIRG* 43: 15-20, 1980.
- LAKE, P. E. Male genital organs, p.2-61 In: King A.S. & McLelland J. (Eds), *Form and Function in Birds*. Vol.2. Academic Press, London, 1981.
- LEIDENS, D. Efeitos da exposição ao chumbo no sistema reprodutivo de *Chrysomus ruficapillus* (AVES: Icteridae). Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, 2013.
- MACHADO, A.B.M.; G.A.B. FONSECA; R.B. MACHADO; L.M.S. AGUIAR & L.V. LINS. Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 605p, 1998.
- MALAVAZZI, G. - *Avicultura: manual de práticas*. São Paulo: Nobel, 156p, 1999.

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20021-2020

Título: APERFEIÇOAMENTO DO DILUENTE PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) POR MEIO DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, ANTIOXIDANTES E DETERGENTES.

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: Cateto; Antimicrobianos; Antioxidantes; Detergentes; Criopreservação

E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/07/2020 a 28/12/2021

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Reprodução Animal

Especialidade: Inseminação Artificial Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

No intuito de desenvolver estratégias para a conservação do germoplasma de catetos, têm sido estabelecidos estudos voltados para o aprimoramento do protocolo de criopreservação, sendo esta uma ferramenta muito importante para a formação de bancos de germoplasma. Diante disso, o presente estudo objetiva avaliar o efeito da adição de antimicrobianos, antioxidantes e detergentes no meio de congelamento de sêmen de catetos. Para tanto, serão utilizados 12 animais machos, sexualmente maduros com idade média de 40 meses, provenientes do Centro de multiplicação de animais silvestres (UFERSA-Mossoró/RN). Os animais serão inicialmente contidos com o auxílio de puçá, seguido de indução anestésica com o propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) a 5 mg/kg em bolus, via endovenosa. Posteriormente, os animais serão submetidos a um protocolo de eletroejaculação como já estabelecido para a espécie e as amostras serão coletadas em tubos plásticos graduados. As amostras serão analisadas quanto ao aspecto, coloração, volume, pH, concentração espermática, morfologia espermática, funcionalidade da membrana, estado de condensação da cromatina, atividade mitocondrial e viabilidade espermática, estresse oxidativo intracelular, teste de ligação a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha e análise microbiológica do sêmen. Adicionalmente, os parâmetros cinéticos serão obtidos mediante a análise computadorizada de sêmen (CASA). As amostras serão diluídas em Tris-gema-glicerol e criopreservadas, utilizando-se as substâncias a serem testadas nas distintas fases experimentais. Na primeira fase, serão testados os antimicrobianos gentamicina a 70 µg/mL e a combinação penicilina/estreptomicina na concentração 100.000 UI/mL/1 mgE/mL de estreptomicina. Na segunda fase, serão testados os antioxidantes: superóxido dismutase – SOD (0, 150 ou 300 UI/mL), catalase – CAT (0, 200 ou 400 UI/mL) e sua combinação (SOD 150 UI/mL + CAT 200 UI/mL) durante a congelamento. Na última fase, será realizada a congelamento das amostras com o uso do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) em suas respectivas concentrações (0%, 0,1%, 0,3% e 0,5%), bem como um grupo controle positivo com o Equex a 0,5%. Os resultados serão expressos em média e erro padrão. As análises serão realizadas pelo software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados obtidos serão avaliados quanto à sua normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A partir destes, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias e identificação de diferenças entre os tratamentos, considerando-se a significância de $P < 0,05$. Desta forma, espera-se identificar o antimicrobiano bem como o agente antioxidante e a concentração ideal do detergente SDS para a congelamento do sêmen de catetos, de modo a aumentar as taxas de células potencialmente viáveis e a longevidade espermática após a descongelamento.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

O cateto (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) é um taiaçuídeo silvestre cuja população é classificada como globalmente estável, porém encontra-se em declínio em alguns biomas, principalmente a Mata Atlântica. Assim, seu desaparecimento nos ecossistemas acarretaria uma grande perda ecológica, haja vista que os catetos atuam como dispersores de sementes e servem de presas para grandes carnívoros (Gongora et al., 2011). Aliado à sua importância ecológica, a espécie possui um estimado potencial produtivo, sendo bem adaptados ao cativeiro. Visto isso, vem sendo criados com propósito científico em pesquisas conservacionistas, visando o uso sustentável da espécie, bem como com o propósito econômico, devido à alta palatabilidade da sua carne e boa aceitação de sua pele no mercado internacional para fabricação de produtos de couro (Garcia et al., 2015). Além disso, tecnologias desenvolvidas para os catetos podem servir de modelos para espécies filogeneticamente próximas como o Tayassu pecari (Keuroghlian et al., 2013) e Catagonus wagneri (Altrichter et al., 2015), que são vulneráveis à extinção.

Nesse contexto, fica evidente o impacto positivo que o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas poderia trazer para a conservação e multiplicação da espécie. Dentre as biotécnicas, destaca-se a criopreservação de germoplasmas, em especial do sêmen, ferramenta importante para a formação de bancos genéticos (Domingues et al., 2011). A criopreservação de sêmen permite que o material genético de diferentes espécies e regiões sejam armazenados por um indefinido período de tempo a baixas temperaturas (Pegg, 2007). Neste sentido, desde 2010 (Castelo et al., 2010a) quando foi relatada o primeiro trabalho com criopreservação de sêmen em catetos, diversos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de aprimorar o protocolo. Desta forma, foram já definidas diferentes etapas como o uso da suplementação energética ao meio diluente (Castelo et al., 2010a), as curvas de congelamento/descongelamento (Castelo et al., 2010a; Silva et al., 2013), e os crioprotetores em diferentes concentrações (Alves et al., 2013; Souza et al., 2015; Souza et al., 2016).

Estando definido um meio base capaz de promover a conservação em torno de 50% de espermatozoides móveis após a descongelamento, o próximo passo para a otimização do diluente seria a busca por aditivos que promovessem melhorias à qualidade espermática pós-descongelamento. Neste sentido, a incorporação de agentes antimicrobianos torna-se necessária visto que a maioria dos microrganismos resultantes do processamento do sêmen pode sobreviver a baixas temperaturas (-196°C) (Bielanski; Vajta, 2009), causando danos às células espermáticas (Prieto-Martínez et al., 2014), ou contribuindo para a disseminação de doenças infecciosas através da inseminação artificial (Eanglesome; Garcia, 1997).

Em adição, o processo de criopreservação pode ocasionar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando em proporções equilibradas, estão envolvidas nos processos de capacitação espermática, hiperativação e reação acrossomal (O'Flaherty et al., 2006; Rao et al., 2015; Aitken et al., 2017). No entanto, acima do necessário, ocasionam efeitos negativos à membrana celular, motilidade espermática (Griveau; Lelannou, 1997), DNA e mitocôndrias (Aitken; Marshall, 2002). Sabe-se que existem mecanismos fisiológicos presentes no plasma seminal capazes de regular o excesso da produção de EROs. Porém, durante a criopreservação, tais mecanismos fisiológicos não costumam ser suficientemente eficientes para prevenir o dano espermático, fazendo-se importante o uso de antioxidantes de modo a permitir uma constância nos níveis de EROs no meio, mantendo a qualidade do sêmen pós-descongelamento (Halliwell; Gutteridge, 1999).

Finalmente, é necessário relatar que um dos principais desafios observados na criopreservação do sêmen de catetos é o baixo período de sobrevivência espermática, no qual os seus parâmetros já são reduzidos aos 15 minutos pós-descongelamento (Campos et al., 2014). Neste sentido, seria justificada a avaliação de detergentes à base de dodecil sulfato de sódio (SDS), os quais são conhecidos por promover um aumento na longevidade espermática em outras espécies (Wu et al., 2013).

Em suma, este trabalho objetiva aprimorar o protocolo de criopreservação na espécie a partir da adição de antimicrobianos, antioxidantes e detergentes ao meio diluente de congelamento. Para melhor subsidiar a compreensão do assunto, segue-se revisão de literatura a respeito destas temáticas.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

- Investigar a eficiência do uso de antimicrobianos, antioxidantes e detergentes como aditivos ao meio diluente de congelamento de sêmen de catetos (Pecari tajacu).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar a ação dos antimicrobianos: penicilina e estreptomicina (1000 UI e 1 mgE) e gentamicina (70 µg) sobre o crescimento bacteriano, qualidade seminal e potencial ligante das células espermáticas após o processo de congelamento-descongelamento do sêmen.
- Investigar a ação dos antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) (0, 150 ou 300 UI/mL), catalase (CAT) (0, 200 ou 400 UI/mL) e sua combinação (150 UI/mL de SOD e 200 UI/mL de CAT) sobre os parâmetros espermáticos, estresse oxidativo e potencial ligante de espermatozoides de catetos durante após a descongelamento de sêmen;
- Identificar a concentração ideal do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) (0%, 0,1%, 0,3% e 0,5%) em comparação ao Equex STM® (Nova Chemical, Scituate, MA12) a 0,5% e sua ação sobre a longevidade espermática.

Metodologia

LOCAL DO EXPERIMENTO

As atividades experimentais serão realizadas conforme a autorização SISBIO n. 37329. Os protocolos experimentais serão submetidos à apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFERSA. As coletas acontecerão no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) (5°100' S, 37°100' W) e as avaliações no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), ambos situados na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em Mossoró/RN (50 12' 48" S de latitude, 370 18' 44" W de longitude e altitude de 37 m), cujo clima predominante é o semiárido. Os reagentes utilizados serão obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), em caso contrário, serão citados no texto.

ANIMAIS

Para cada Fase Experimental, serão utilizados doze machos sexualmente maduros, com idade média de 40 meses, mantidos sob fotoperíodo natural. Os animais serão separados em grupos de três animais e mantidos em piquetes (20 m x 3 m), com área coberta (3 m x 3 m) sob fotoperíodo natural de 12 h. Os animais receberão alimentação comercial para suínos e frutas tropicais da estação, além de água à vontade.

CONTENÇÃO E ELETROEJACULAÇÃO

Previamente à coleta, os animais serão mantidos em jejum alimentar de 12 h. Desse modo, serão então contidos com o auxílio de uma puçá, procedendo-se a indução anestésica com o propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) a 5 mg/kg em bolus, via endovenosa (Souza et al., 2009). No decorrer do procedimento, os animais terão seus parâmetros fisiológicos de temperatura, frequência cardíaca e respiratória constantemente monitorados. Os animais serão dispostos em decúbito lateral, no qual será efetuada a higienização da região peniana utilizando solução fisiológica a 37° C. Após a limpeza, será feita a coleta por intermédio da aplicação do protocolo de electroejaculação como já estabelecido anteriormente para a espécie (Castelo et al., 2010), através de um dispositivo portátil (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brasil) conectado a uma fonte de 12 V, utilizando uma sonda tran retal com 15 cm de comprimento e 1,3 cm de diâmetro, inserindo aproximadamente 12 cm no reto do animal. Os ejaculados serão coletados em tubos de plástico graduados e imediatamente avaliados.

AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

Serão procedidas avaliações quanto ao aspecto, coloração, volume por meio de sucessivas pipetagens, bem como do pH através de tiras indicadoras de pH (Neutralit®, Merck, Bucareste, Romênia) (Souza et al., 2009).

1 Concentração espermática

Em seguida, os ejaculados serão avaliados microscopicamente quanto a concentração espermática (em milhões de espermatozoides/mL) a partir da contagem em câmara de Neubauer efetuando a diluição de alíquotas de 10 µL de sêmen (1:2) em 1 mL de solução formalizada tamponada (10%) (Silva et al., 2014).

2 Morfologia espermática

A morfologia espermática será avaliada a partir de esfregaços de 5 µL de sêmen corados em 45 µL de rosa de bengala, contando 200 células por lâmina através da microscopia de luz (1000x) com auxílio do óleo de imersão e classificando-as quanto a presença de defeitos espermáticos (Sousa et al., 2013).

3 Funcionalidade da membrana

Para a funcionalidade da membrana será utilizado o teste hipo-osmótico, no qual 5 µL de sêmen será incubado durante 40 minutos em 45 µL de água destilada (0 mOsm/L) para avaliar a resposta osmótica dos espermatozoides. Por tanto, serão contados 200 células, sob microscopia de luz, e aqueles espermatozoides apresentando caudas enroladas e edemaciadas serão consideradas como apresentando membrana funcional (%) (Santos et al., 2013).

4 Análise do estado de condensação da cromatina

A análise do estado de condensação da cromatina decorrerá de esfregaços de sêmen fixados em etanol (3:1): ácido acético durante 1 min, seguida de etanol a 70% durante 3 min e solução de HCl 4 M durante 25 min. Posteriormente será feita a coloração em azul de toluidina (azul 0,025% toluidina em tampão McIlvaine (citrato de sódio: pH fosfato = 4,0), onde os espermatozoides corados de azul claro serão classificados como normais (negativos) e aqueles corados de violeta a azul escuro serão considerados como tendo cromatina alterada (positiva) (Beletti et al., 2004; Castelo et al., 2015).

5 Atividade mitocondrial e viabilidade espermática

A atividade mitocondrial e viabilidade espermática serão avaliadas mediante a incubação do sêmen (10 µL) em 5 µL de Hoechst 342 (H342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (998,4 µL de DPBS + 1,6 µL da solução estoque: 25 µg/mL) em banho seco a 37° C por 8 minutos. Em seguida, será acrescentado 5 µL de CMXRos (Mito Tracker red®, Molecular Probes, M-7512) (1 mL de TRIS + 0,1 µL da solução estoque: 50 µg/94 µL) e 3 µL de IP (Iodeto de Propídio, Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA) (980 µL de DPBS + 20 µL da solução estoque: 25 µg/mL) por mais 10 minutos, seguida da avaliação em microscópio de epifluorescência (Episcopic Fluorescent attachment EFA Halogen Lamp Set. Leica. Kista, Sweden) contando-se um total de 200 células, cujos espermatozoides com cabeça marcada em azul (H-342) serão julgados com membrana intacta e aqueles com cabeça total ou parcialmente marcada em vermelho (IP) serão ditos com membrana não intacta e com peça intermediária marcada em vermelho serão considerados com função mitocondrial (Sousa et al., 2013).

6 Análise computadorizada do sêmen

Adicionalmente, será realizada a análise computadorizada de sêmen (CASA – IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, USA), a fim de obter detalhes a respeito da cinética espermática. Quanto aos parâmetros analisados incluirão: número de células contadas, motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade média da trajetória (VAP; mm/s), velocidade linear progressiva (VSL; mm/s), velocidade curvilínea (VCL; mm/s), amplitude lateral da cabeça (ALH; mm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz), índice de progressão (STR; %) e índice de linearidade (LIN; %). Ainda a população total de espermatozoides será subdividida em quatro categorias: rápida, com VAP > VMV; médio, com VLV < VAP < VMV; lento, com VAP < VLV; e estático, a proporção de células que não estarão se movendo (Souza et al., 2016).

7 Teste de ligação a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha

Para a análise da capacidade ligante das células espermáticas submetidas aos diferentes tratamentos, será utilizado o teste de ligação a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha. Para isto, serão utilizados ovos de galinha frescos e não férteis, no qual as membranas serão obtidas mediante separação da gema e da clara e o excesso de clara será retido em papel filtro com posterior separação das membranas. Após separação das membranas, estas serão lavadas sucessivas vezes em solução fisiológica a 37° C e submetidas a cortes de 1 cm² com o auxílio de uma cubeta de espectrofotômetro empregada como molde, no qual para cada tratamento serão destinadas duas membranas. Conjuntamente, será feita a diluição das amostras espermáticas (1:1) em solução de meio de incubação (114 mM NaCl; 3,1 mM KCl; 0,4 mM NaH₂PO₄; 10 mM lactato de cálcio; 25 mM NaHCO₃; 10 µg/mL vermelho fenol; 1,4 mM cafeína; 2,0 mM CaCl₂.2H₂O; 0,5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; 6 mg/mL BSA; 5,5 mM glicose; 0,45 mM piruvato de sódio; 40 µg/mL sulfato de gentamicina; pH 7.4-7.8) (Campos et al. 2017), e posteriormente centrifugadas a 700 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante será descartado e o pellet re-diluído a fim de obter uma concentração final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL (Campos et al., 2017). Cada fragmento da membrana perivitelina será mantido em placa de 4 poços com 1 x 10⁶ espermatozoides/mL a 38,5° C por 20 min em banho-maria. Após a incubação, cada membrana será lavada em gotas de 100 µL de meio de incubação para a retirada dos espermatozoides não ligados à membrana. Por fim, as membranas serão estendidas sobre uma lâmina e recobertas com laminula e avaliadas quanto ao número de espermatozoides ligados em seis campos distintos e aleatórios através da microscopia contraste de fase (ABM-200 Series Biological Microscope, China) (Campos et al., 2017).

CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN

Para a congelação, os ejaculados serão inicialmente diluídos em Tris adicionado de glicerol (3%) e gema de ovo (20%). Em cada fase do experimento o diluente base será adicionado de diferentes concentrações de antibióticos, antioxidantes ou detergentes, conforme citado posteriormente. As amostras serão então refrigeradas a 15° C durante 40 minutos em caixas isotérmicas e posteriormente estabilizadas a 5° C por mais 30 min em incubadora biológica (Quimis, Diadema, SP, Brazil). Em seguida será feito o envase em palhetas plásticas de 0,25 mL e finalmente as palhetas serão posicionadas em contato com o vapor do nitrogênio (5 cm) por 5 minutos e então acondicionadas em botijão criobiológico a - 196° C. Decorrido pelo menos 1 semana, as amostras serão descongeladas em banho maria a 37° C por 1 minuto conforme reportado anteriormente (Silva et al., 2013).

FASES DO EXPERIMENTO

1ª fase: Adição dos antimicrobianos durante a congelação de sêmen

A princípio, uma alíquota de 100 µl de cada ejaculado será destinada para a análise da concentração bacteriana. Em seguida, as amostras de sêmen serão diluídas em Tris-gema (20%) e glicerol (3%), adicionado ou não dos antimicrobianos, constituindo os seguintes grupos: (A) Controle (sem antimicrobiano) (B) 70 µg/mL de gentamicina; (C) 1000 UI/mL de penicilina + 1 mg/E de estreptomina (Santos et al., 2019) e posteriormente expostas à refrigeração, no qual seus parâmetros cinéticos serão novamente verificados e então realizada a congelação. Após pelo menos 1 semana, as amostras serão descongeladas e submetidas às mesma avaliações do sêmen fresco, incluindo a análise microbiológica.

Para a análise microbiológica do sêmen, será inoculada uma alíquota de 100 µl de cada amostra em 900 µl de solução salina estéril a 0,85%, obtendo-se a diluição 10⁻¹, seguindo-se com uma diluição seriada até 10⁻⁵. Em seguida, alíquotas de 100 µl de cada diluição serão semeadas, com auxílio de uma alça de Drigalski, na superfície de placas de Petri contendo Plate Count Agar (Hi Media, Mumbai, Índia), todas em duplicata e incubadas em estufa bacteriológica (Fanem LTDA, São Paulo, Brasil) a 35 ± 1° C por 24 a 48 horas (Tortora, 2005). Após esse período as colônias serão contadas em cada placa e o número de microrganismos será expresso em Unidade Formadora de Colônia – UFC/ml multiplicado pelo inverso de cada diluição. As colônias com aspectos diferentes serão isoladas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Hi Media, Mumbai, Índia) e identificadas a partir de suas características macroscópicas, morfotintórias e perfil bioquímico (Macfaddin, 2000).

2ª fase: Adição de antioxidantes durante a congelação de sêmen

A segunda fase consistirá na congelação das amostras com os antioxidantes, constituindo-se dos passos de diluição em diluente Tris-gema (20%) e glicerol (3%),

adicionado do melhor antimicrobiano definido na fase anterior. Nesta fase, será utilizado um grupo controle sem adição de antioxidantes, e grupos teste suplementados com superóxido dismutase (SOD) a 150 ou 300 UI/mL (Roca et al., 2005), catalase (CAT) a 200 ou 400 UI/mL (Roca et al., 2005) e ambos combinados (SOD: 150 UI/mL e CAT: 200 UI/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Roca et al., 2005), bem como um grupo controle sem antioxidantes. Decorrido pelo menos uma semana, as amostras serão descongeladas e efetuadas as mesmas avaliações descritas para o sêmen a fresco.

Nesta fase, o sêmen fresco e descongelado será também avaliado quanto ao estresse oxidativo intracelular por meio da microscopia de fluorescência, utilizando-se o marcador 2', 7'-dichlorofluoresceína (H2DCFDA) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Desta forma, 2 µL de diacetato de 2', 7'-dichlorofluoresceína (5 mM) serão adicionados a 1 mL de suspensão espermática, homogeneizados e incubados a 37° C durante 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente, as amostras serão incubadas com 5 µL de IP por mais 10 minutos a 37° C no escuro e lavados três vezes em solução PBS. Por fim, serão analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51TF, Tokyo, Japan) a fim de determinar a porcentagem de espermatozoides viáveis com EROs intracelular, onde a intensidade de fluorescência das imagens serão quantificadas através do software ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) (Pang et al., 2016). A intensidade do sinal de fundo será subtraída dos valores obtidos para as imagens de tratamento. O grupo sem suplementação antioxidante (EOSA0) será avaliado como calibrador e o valor medido de cada micrografia de tratamento será dividido pela média do calibrador para gerar níveis de expressão relativos (unidades de fluorescência arbitrárias).

3ª fase: Adição de detergente durante a congelação de sêmen

Na última fase, os ejaculados serão congelados mediante diluição em Tris-gema (20%), glicerol (3%), adicionados de antimicrobianos e antioxidantes conforme definidos nas fases anteriores. As amostras diluídas serão então distribuídas nos seguintes grupos: controle negativo sem detergente, controle positivo contendo 0,5% de Equex STM® (Nova Chemical, Scituate, MA12 – Bezerra et al. 2019), e os grupos teste suplementados com dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5%. Decorrido pelo menos uma semana, as amostras serão descongeladas e submetidas às mesmas avaliações do sêmen a fresco.

Neste experimento, para análise da sobrevivência espermática após a descongelação, as células serão submetidas também a um teste de termorresistência (TTR), no qual as amostras serão mantidas a 37° C e avaliadas quanto a viabilidade, atividade mitocondrial, funcionalidade da membrana e cinética espermática através do CASA nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min, descartando aquelas que não se mostrarem móveis (Campos et al., 2014).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão expressos em média e erro padrão. As análises serão realizadas pelo software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados obtidos serão avaliados quanto à sua normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A partir destes, serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para a comparação das médias e identificação de diferenças entre os tratamentos, considerando a significância de $p < 0,05$.

Referências

- Althouse, G.C.; Kuster, C.E.; Clark, S.G.; Weisiger, R.M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, v.53, p.1167-76, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00261-2)
- Althouse, G.C.; Lu, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.573-84, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.031>
- Althouse, G.C.; Pierdon, M.S.; Lu, K.G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*, v. 70, p.1317-1323, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.010>
- Althouse, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim.*, v. 43, p. 374-378, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x>
- Altrichter, M., Taber, A., Noss, A., Maffei, L. e Campos, J. 2015. *Catagonus wagneri*. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2015: e.T4015A72587993. 27 de julho de 2019 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T4015A72587993.en>
- Alves, H. M.; Oliveira, I. R. S.; Castelo, T. S.; Lima, G. L.; Souza, A. L. P.; Moreira, M. A. P.; Paula, V. V.; Silva, A.R. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (Tayassu tajacu) semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, p. 506 - 511, 2013. <https://doi.org/10.1111/rda.12115>
- Anel, L.; Gomes-Alves, S.; Alvarez, M.; Borrigan, S.; Anel, E.; Nicolas, M.; Martinez-Pastor, F.; Paz, P. Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, n.4, p.643 - 651, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.004>
- Anel-López, L.; García-Alvarez, O.; Parrilla, I.; Olmo, D.D.; Santos, M.R.F.; Soler, A.J.; Morales, A.M.; Ortiz, A.M.; Alkmin, D.V.; Tarantini, T.; Roca, J.; Martinez, E.A.; Vazquez, J.M.; Garde, J.J. The Effect of Oxidative Stress on Thawed Bulk-Sorted Red Deer Sperm. *Reprod Dom Anim*, v. 51, p.407-414, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12694>
- Aurich, C.; Spargser, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, n.5, p. 912-918, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.004>
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, v.219, n.1, p. 1-14, 1984. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>
- Bezerra, L. G. P.; Souza, A. L. P.; Silva, H. V. R.; Vasconcelos, F. R.; Moura, A. A. A.; Pereira, A. F.; Oliveira, M. F.; Silva, A. R. Ultrastructural description of fresh and frozen/thawed sperm derived from collared peccaries (Pecari tajacu Linnaeus, 1758). *Microscopy Research and Technique*, v. 81, p. 1301-1309, 2018.
- Bezerra, L.G.P.; Souza, A. L.P.; Lago, A. E.A.; Campos, L.B.; Nunes, T.L.; Paula, V.V.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Addition of Equex STM to Extender Improves Post-Thawing Longevity of Collared Peccaries' Sperm. *Biopreservation And Biobanking*, v. 17, n. 2, p.143-147, 2019. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0096>
- Bianchi, I.; Schaaf, S.; Corrêa, E. K.; Perondi, A.; Lucia, Jr. T.; Dechamps, J. C.; Corrêa, M. N. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 30, n. 1/2, p. 72-77, 2006.
- Bielanski, A.; Vajta, G.. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, Canada, v. 24, n. 10, p.2457-2467, 2009. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep117>
- Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Cormier, N.; Sirard, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v 57, p.1105-1122, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00702-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00702-6)
- Bing, F.C. Assaying the availability of iron. *J. Am. Diet Assoc.*, v.60, n.2, p. 114-122, 1972.
- Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.*, v. 5, n.1, p. 9-19, 2012. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; Love, C.C.; Hartman, D.L.; Blanchard, T.L.; Schumacher, J.; Hinrichs, K. *Manual of Equine Reproduction*. 3. ed. Texas: Mosby, 2011. 336 p.
- Buranaamnuay, K.; Tummaruk, P.; Singlor, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Techakumphu, M.. Effects of straw volume and Equex STM on boar sperm quality after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.69-73, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00996.x>
- Bussalleu, E.; Yeste, M.; Sepúlveda, L.; Torner, E.; Pinart, E.; Bonet, S. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic E. coli on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, v.127, p.176-82, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.018>
- Câmara, T.S.; Nunes, T.G.P.; Toniolli, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. *Ciência Animal*, v. 28, n. 2, p.67-83, 2018.
- Castelo, T. S.; Silva, A. M.; Bezerra, L. G. P.; Costa, C.Y.M.; Lago, A. E. A.; Bezerra, J. A. B.; Campos, L. B.; Praxedes, E. C. G.; Silva, A.R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (Dasyprocta leporina). *Cryobiology*, v. 71, p. 442-447, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.09.005>
- Castelo, T.S., Bezerra, F.S.B., Lima, G.L., Alves, H.M., Oliveira, I.R.S., Santos, E.A.A., Peixoto, G.C.X., Silva, A.R. 2010. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (Tayassu tajacu). *Cryobiology*, v. 61, p. 275-279. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.005>
- Cerolini, S.; Maldjian, A.; Surai, P.; Noble, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, v.58, p.99-111, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00035-4)
- Chatterjee, S.; Gagnon, C. Production of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa Undergoing Cooling, Freezing, and Thawing. *Molecular Reproduction And Development*, v. 59, p.451-458, 2001. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- Cormier, N.; Sirard, M.A.; Beilley, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.*, v. 18, n.4, p.461 - 468, 1997.
- Costa, L. L. M.; Castelo, T. S.; Souza, A. L. P.; Lima, G. L.; Silva, A. R. Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 37, n.1, p. 53-58, 2013.
- De Lamirande, E.; Gagnon, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology Medicine*, v. 14, p.157 - 166, 1993. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90006-g](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90006-g)
- Fraser, L.; Jasiewicz, E.; Kordan, W.. Supplementation of different concentrations of Orvus Es Paste (OEP) to ostrich egg yolk lipoprotein extender improves post-thaw boar semen quality. *Polish Journal Of Veterinary Sciences*, Poland, v. 17, n. 2, p.225-230, 2014.
- Gall, T.J.; Wilson, M.E.; Althouse, G.C. Quantification of bacteria in fractionated boar ejaculates. In: *Swine Conference*, 5, 1998, Minnesota. Proceedings... Minneapolis, Minnesota: The Conference, 1998. p.45. Resumo.
- García, M.G.V., Sánchez, E.Q., Reyes, U.A., Vilchis, O.M., Mora, J.M.V., Blasio, A.L., Guadarrama, V.F. Urogenital system of collared peccary (Pecari Tajacu Chordata: Artiodactyla): an anatomical study. *Ciencia Ergo-sum*, v. 22, p. 54-62, 2015.
- Gavriilouk, D.; Aitken, R.J. Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.868, p.23-47, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2_2
- Ghorbani, M.; Amiri, I.; Khodadadi, I.; Fattahi, A.; Atabakhsh, M.; Tavilani, H. Influence of BHT inclusion on post-thaw attributes of human semen. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, v.61, p.57-61, 2015. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.968267>
- Ginsburg, I. O papel da bacteriólise na fisiopatologia da inflamação, infecção e sequelas pós-infecciosas. *APMIS*, v.110. p. 753 - 770, 2002.

Goldberg, A.M.; Argenti, L.E.; Faccin, J.E.; Linck, L.; Santi, M.; Bernardi, M.L.; Cardoso, M.R.I.; Wentz, I.; Bortolozzo, F.P. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res vet Sci*, v.95, p.362-367, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.06.022>

Gongora, J.; Reyna-Hurtado, R.; Beck, H.; Taber, A.; Altrichter, M.; Keuroghlian, A. 2011. Pecari tajacu. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T41777A10562361. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20112.RLTS.T41777A10562361.en>. Downloaded on 13 August 2018.

Kelly, F.J.; Mudway, I.S. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids*. v.25, p.375-396, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0024-x>

Keuroghlian, A., Desbiez, A., Reyna-Hurtado, R., Altrichter, M., Beck, H., Taber, A.; Fragoso, J.M.V 2013. Tayassu pecari . Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2013: e.T41778A44051115. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20131.RLTS.T41778A44051115.en> . Baixado em 02 julho 2018.

Kuster, C.E.; Althouse, G.C. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*, v.85, p.21-26, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.049>

Macfaddin, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: Lippincott William & Wilkins, 2000, 912p.

Madeira, E.M.; Goularte, K.L.; Pradié, J.; Mondadori, R.G.; Jr, T.L.; Bianchi, I.; Vieira, A.D.; Leite, F.P.L. The Use of Antibiotics in Cryopreservation of Ram Sperm. *International Journal Of Veterinary Medicine: Research & Reports*, v. 2014, p.1-7, 2014. <https://doi.org/10.5171/2014.154947>

Maes, D.; Nauwynck, H.; Rijsselaere, T.; Mateusen, B.; Vyt, P.; De Kruijff, A.; Van Soom, A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology*, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.018>

Maia, M.S.; Azevedo, H.C.; Bicudo, S.D.; Sousa, D.B.; Rodello, L. Efeito da adição do equex-STM ao diluente tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Sci Vet*. v.33, p.311, 2008.

Maia, K.M.; Souza, A.L.P.; Praxedes, E.C.G.; Bezerra, L.G.P.; Silva, A. M.; Campos, L.B.; Moreira, S.S.J. ; Apolinario, C.A.C.; Souza-Junior, J.B.F.; Silva, A.R. Environmental Factors Related to a Semiarid Climate Influence the Freezability of Sperm from Collared Peccaries (Pecari tajacu Linnaeus, 1758). *Biopreservation and Biobanking*, v. 16, p. 186-190, 2018. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0124>

Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

Sousa, P. C.; Santos, E.A.A.; Souza, A.L.P.; Lima, G.L.; Barros, F. F. P. C.; Oliveira, M. F.; Silva, A.R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (Pecari tajacu). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 924-930, 2013. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2013000700014>

Souza, A.L.P.; Lima, G.L.; Peixoto, G.C.X.; Silva, A.M.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (Pecari tajacu) semen. *Theriogenology*, v. 85, p. 1432-1438, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.007>

Storey, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 52, p. 427-37, 2008. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>

Toniolli, R.; Fiúza, R.F.; Jatahy, P.C.; Barros, D.Q.; Santos, B.S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle bacteriano do ejaculado do varrão. *Ciência Animal*, v. 11, n. 1, p.33-38, 2001.

Tortora, G.R. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 962 p.

Trzcińska, M.; Bryła, M. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Polish Journal Of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 3, p.473-480, 2015. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0062>

Trzcinska, M.; Bryła, M.; Gajda, B.; Gogol, P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, v. 83, p.307-313, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.045>

Ubeda, J.L.; Ausejo, R.; Dahmani, Y.; Falceto, M.V.; Usan, A.; Malo, C.; Perez-Martinez, F.C. Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*, v.80, p.565-70, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.022>

Upreti, G.C., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D.M., Vishwanath, R., Smith, J.F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science*, v. 51, p.275-287, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(98\)00082-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00082-7)

Vyt, P.; Maes, D.; Dejonckheere, E.; Castryck, F.; Van Soom, A. Comparative study on five diferente commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim.*, v. 39, p. 8-12, 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x>

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.*, v.60-61, p.481-492, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)

Wu, T.U.; Cheng, F.P.; Chen, H.I.; Yang, C.H.; Tsai, M.Y.; Chang, M.H.; Wang, J.H.; Wu, J.T. The Combinatorial Effect of Different Equex STM Paste Concentrations, Cryoprotectants and the Straw-Freezing Methods on the Post-Thaw Boar Semen Quality. *Reproduction In Domestic Animals, Taiwan*, v. 48, n. 1, p.53-58, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02022.x>

Yamamoto, Y.; Omori, M. Antioxidative activity of egg yolk lipoproteins. *Biosci. Biochem. Biochem.*, v.58, p. 1711-1713, 1994. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1711>

Yániz, J.L.; Marco-Aguado, M.A.; Mateos, J. A.; Santolaria, P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*, v. 122, n. 1-2, p.142-149, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>

Zhang, X.G.; Li, H.; Wang, L.; Hao, Y.Y.; Liang, G.D.; Ma, Y.H.; Yang, G.S.; HU, J.H. The effects of different levels of superoxide dismutase in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Animal Science Journal*, v.88, p. 55-62, 2017. <https://doi.org/10.1111/asj.12574>

Zhu, Z.; Kawai, T.; Umehara, T.; Hoque, S.A.M.; Zenga, W.; Shimada, M. Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 141, p.159-171, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.018>

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
702.982.543-87	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA	DOCENTE	Não informada	Coordenador
325.949.504-59	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	DOCENTE	Não informada	Membro

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021											
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

COLETA DE AMOSTRAS

AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS

AVALIAÇÃO DE RESULTADOS

CONFEÇÃO DE RESUMOS E

ARTIGOS CIENTÍFICOS

AVALIAÇÕES DO PROJETO

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
28/04/2020 15:45	CADASTRO EM ANDAMENTO	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA (<i>alexrs</i>)
28/04/2020 15:54	CADASTRADO	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA (<i>alexrs</i>)
28/04/2020 15:54	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA (<i>alexrs</i>)
12/05/2020 14:22	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20024-2020

Título: USO DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NO TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS FELINO EM ESTÁGIO AVANÇADO

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: plasma, oncologia, cultivo celular, microscopia, felinos, cuidados paliativos

E-mail: carlos.moura@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/07/2020 a 30/06/2024

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Clínica e Cirurgia Animal

Especialidade: Clínica Cirúrgica Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O Carcinoma de células escamosas (CCE) de felinos em estágio avançado se caracteriza por lesões ulcerativas, hemorrágicas e fétidas, comprometendo a qualidade de vida dos animais, sendo desafiador diante das opções de tratamento atualmente disponíveis. O plasma atmosférico frio (CAP) é comumente utilizado pela sua ação antimicrobiana e cicatrização, porém vem emergindo como um tratamento promissor no câncer, promovendo a morte seletiva de células cancerígenas por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Nosso grupo desenvolveu dispositivo de CAP obtido a partir de uma barreira de descarga dielétrica (DBD) destinado a aplicações biomédicas. O presente trabalho objetiva avaliar os efeitos do tratamento com CAP utilizando esse novo dispositivo sobre células tumorais em cultivo e em CCE de felinos em estágios avançados. Os queratinócitos e células de carcinoma serão obtidos a partir de biópsia de pele normal e do tumor de pacientes portadores de CCE atendidos no Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da UFERSA. As células serão expostas ao plasma por tempo e distâncias estabelecidos. O dano térmico provocado sobre as células em cultivo será avaliado pela medida da temperatura utilizando uma câmera de infravermelho. A morfologia, viabilidade, apoptose e propriedades biomecânicas celulares serão investigadas por microscópio eletrônico de varredura, ensaio de MTT, reação de TUNEL e microscopia de força atômica respectivamente. Para as análises in vivo serão incluídos no estudo gatos com CCE (estádios T3 ou T4) encaminhados ao Hospital Veterinário da UFERSA, cujas lesões serão tratadas com sessões de aplicações de plasma DBD. Para avaliar os efeitos desse tratamento, serão obtidas biópsias tumorais, antes e após o tratamento. Esses fragmentos de tecidos serão submetidos a processamento histológico e posterior análises histopatológicas, especialmente relacionadas à identificação e quantificação dos tipos celulares do estroma tumoral, expressão de fatores angiogênicos, pró-inflamatórios e proteínas de choque térmico. A remissão do tumor ao longo do tratamento será avaliada pela mensuração de sua área e os pacientes também serão acompanhados para determinar resposta a terapia e influência na qualidade de vida dos animais. Com os resultados dessa pesquisa, espera-se contribuir no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratamento de câncer.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna, que se desenvolve a partir do epitélio escamoso, acometendo comumente os felinos. A sua causa está associada à exposição crônica à luz ultravioleta, com maior incidência em áreas escassas de pelos e despigmentadas como orelhas, pálpebras, plano nasal e áreas temporais (MURPHY, 2013). Costuma ser agressivo localmente e pouco metastático (GRANDI; RONDELLI, 2016). A capacidade invasiva desse tipo de câncer está relacionada a invasão do tipo coletiva que envolve um grupo de células aderidas que se desconectam do tumor primário (FRIEDL et al., 2012). Além disso, as células cancerígenas invasivas exibem propriedades mecânicas altamente dinâmicas localmente e de forma sincronizada (ABDINE et al., 2018) sujeitas a remodelação constante (BU et al., 2019), sendo caracterizadas como complexos viscoelásticos que podem sofrer deformações durante a progressão tumoral, nos processos de invasão e metástases (MAK; ERICKSON, 2013). Atualmente, essas propriedades mecânicas de células neoplásicas vem sendo investigada por métodos de microscopia de força atômica, no intuito de averiguar a capacidade invasiva e metastática dos tumores (ZEMLA et al., 2018). Os tratamentos disponíveis na oncologia veterinária visam o controle ou a remissão tumoral, bem como a evitar a metástase e preservar a qualidade de vida (MOORE, 2011). As opções terapêuticas mais comuns para o CCE são: excisão cirúrgica (DEMIRUTKU et al., 2012), criocirurgia (QUEIROZ; MATERA; DAGLI, 2008), eletroquimioterapia (SPUGNINI et al., 2015), radioterapia (BERLATO et al., 2018) e terapia fotodinâmica (QUEIROZ et al., 2016). A excisão cirúrgica é a forma mais bem sucedida de tratar lesões avançadas (T3, T4), no entanto para tumores maiores ou invasivos a reconstrução da área acometida pode ser desafiadora limitando-a em função do resultado estético desfigurador (MURPHY, 2013). Portanto, é importante desenvolver terapias que possam controlar a doença e melhorar a qualidade de vida de felinos com CCE cutâneo em estágio avançado, considerando que cuidados paliativos são medidas válidas de tratamento em oncologia (MASON, 2016). O plasma atmosférico a frio (CAP) vem emergindo como um tratamento promissor no câncer que pode complementar o conjunto existente de modalidades de tratamento e, quando combinadas com outras terapias, aumentam sua seletividade e eficácia contra cânceres resistentes (SEMMLER et al., 2020; DAI et al., 2018). O CAP possui as vantagens de ser barato, rápido, de fácil aplicação e, esperançosamente, é uma alternativa confiável, quando comparado aos tratamentos convencionais, que além dos altos custos e efeitos colaterais aos tecidos saudáveis, muitas vezes tem resultados insatisfatórios (SAADATI et al., 2018). O plasma, conhecido como "quarto estado da matéria", é composto por espécies reativas, ou seja, moléculas e átomos excitados, íons positivos, negativos e elétrons em um gás neutro de fundo (WELTMANN et al., 2018). Ele pode ser categorizado em plasma térmico (SAMAL, 2017) e frio (WANG et al., 2013). O plasma térmico é produzido em ambiente a vácuo e necessita de altas temperaturas, sendo utilizado comumente no tratamento de biomateriais (SEO et al., 2014). Por outro lado, o plasma frio atmosférico (CAP) é produzido em temperaturas abaixo de 40°C sob pressão atmosférica, possibilitando aplicação terapêutica segura em animais e humanos (GAY-MIMBRERA et al., 2016). Com o desenvolvimento do CAP para aplicações biomédicas, surgiu um novo campo, a "medicina de plasma", que aliando conhecimentos da física, medicina e outras ciências da vida vem desenvolvendo e testando diferentes fontes e dispositivos de plasma com aplicações biomédicas (LAROUSSE, 2018). Em geral, esses dispositivos podem ser divididos naqueles de descarga direta (por exemplo, DBD: descarga de barreira dielétrica) e os dispositivos de descarga indireta (por exemplo, APPJ: jato de plasma de pressão atmosférica), sendo aqueles gerados em descarga de barreira dielétrica (DBD) mais amplamente utilizados em aplicações biomédicas (BERNHARDT et al., 2019). Esses dispositivos de CAP vem demonstrando efeito anticancerígeno contra o osteossarcoma (TORNIN et al., 2019); câncer de pulmão (KARKI et al., 2019); linfoma (CHENG et al., 2019); glioblastoma (CHEN et al., 2017) câncer de pâncreas (VAN LOENHOUT et al., 2019) câncer de próstata (FOFANA et al., 2020), câncer colorretal (SCHNEIDER et al., 2018), câncer de mama (WANG et al., 2019) e o carcinoma de cabeça e pescoço (GUERRERO-PRESTON et al., 2014). Os mecanismos anticâncer ocorrem principalmente devido a ação seletiva de células cancerígenas as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) produzidos pelo CAP. As RONS causam toxicidade celular dose dependente podendo resultar em necrose, apoptose, senescência, e autofagia reduzindo a adesão, proliferação e migração celular, inclusive desencadear uma resposta imune (SEMMLER et al., 2020). As estimativas indicam que humanos, cães e gatos apresentam risco ao câncer de forma semelhante ao longo da vida, reforçando a hipótese de que observações sobre biologia e epidemiologia do câncer em animais de companhia podem ser extrapoladas diretamente para humanos (MODIANO, 2016). Dessa forma, é possível mesclar dados científicos oncológicos de humanos e veterinários beneficiando claramente o conhecimento do desenvolvimento, progressão e manejo do câncer (SCHIFFMAN; BREEN, 2015). Assim, baseado em estudos prévios, a hipótese é que a aplicação de plasma frio atmosférico exerce efeito antineoplásico sobre CCE de felinos em estágio avançado contribuindo para o controle do câncer nesta espécie.

Objetivos

Objetivo Geral:

- Avaliar a eficácia do plasma frio atmosférico no tratamento do carcinoma de células escamosas felino em estágio avançado.

Objetivos Específicos:

- Investigar o efeito do plasma DBD sobre a viabilidade de queratinócitos e células tumorais de felinos;
- Avaliar o tratamento de CCE cutâneo com dispositivo de plasma DBD;
- Avaliar os efeitos da terapia com CAP sobre a temperatura das células em cultura e tumoral;
- Avaliar as propriedades viscoelásticas das células tumorais tratadas a plasma;
- Identificar efeitos adversos da terapia com CAP;
- Analisar a histopatologia das lesões tumorais tratadas;
- Mensurar a expressão de fatores angiogênicos, pró-inflamatórios e proteínas de choque térmico;
- Avaliar a qualidade de vida dos animais em tratamento;
- Classificar a resposta dos pacientes à terapia com CAP;
- Avaliar o tempo de sobrevida dos pacientes;

Metodologia

Esse trabalho será realizado em quatro etapas:

Etapas 1 - Ensaios in vitro

Dispositivo de plasma atmosférico a frio

O dispositivo de plasma atmosférico obtido por barreira dielétrica (DBD) que será utilizado neste trabalho foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Plasma Aplicado à Agricultura, Saúde e Meio Ambiente do CITED – Centro Integrado de Inovação Tecnológica do Semiárido da Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA.

Obtenção dos queratinócitos e células do carcinoma de células escamosas

Os queratinócitos e células de carcinoma utilizados neste trabalho serão obtidos a partir de fragmentos de pele normal e do tumor de pacientes portadores de CCE do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da UFERSA.

Tratamento de CAP sobre células

Para avaliar o efeito do tratamento de plasma sobre as células em cultivo, as células serão transferidas para placas de 12 poços e divididas em dois grupos: Grupo I (controle de crescimento) - células sem tratamento; Grupo II - células tratadas com plasma DBD, com tensão, a frequência de excitação e a taxa de fluxo de gás de 0,8-1,2 kVrms, 35 kHz e 0,1 L / min, respectivamente.

Efeito do CAP sobre temperatura das células em cultivo

Para avaliar o dano térmico provocado pelo CAP sobre as células em cultivo será mensurada a temperatura das células antes e imediatamente após a aplicação do CAP pelos diferentes dispositivos utilizando uma câmera de infravermelho modelo FLIR SC620. A temperatura das células será mensurada em ambiente fechado cuja temperatura e umidade serão controlados por termo-higrômetro digital com captura de foto a uma distância de 50 centímetros do meio de cultura.

Morfologia das células

Para análise da morfologia celular, 5x10⁴ células serão cultivadas sobre laminulas de vidro por 24h, em seguida submetidas a tratamento por CAP conforme descrito no item anterior. Após tratamento, as células serão fixadas as laminulas com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (PBS), pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% por 2h. Após a pós-fixação, serão desidratadas em série crescente de alcoóis, e metalizadas com ouro. As imagens serão capturadas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

Proliferação/ viabilidade celular

As células (5x10⁴ células/ poço) serão cultivadas por 24h em placas de 12 poços, em triplicata. Depois de submetidas ao tratamento de CAP, será adicionada em cada poço 1mL de solução de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluído em meio de cultura. Após 3 h de incubação, os cristais de formazan produzidos pela redução do MTT serão dissolvidos pela adição de 1 mL de etanol P.A. (Reagente ACS ≥ 99,5%) em cada poço por 15 minutos sob agitação constante. Em seguida, 100 µL de cada poço serão transferidos para placas de cultura de 96 poços e quantificados por espectrofotometria de absorvância a 570 nm em um leitor de microplacas (Quant MKX200, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

Ensaio de TUNEL

A fragmentação do DNA resultante da apoptose será avaliada com o kit de detecção de morte celular in situ (Fluoresceína-DUPT, Roche). Após a fixação, o ensaio TUNEL será realizado por seguindo as instruções do fabricante. A fluorescência verde emitida das células apoptóticas será quantificada por citometria de fluxo. Um total de 50.000 eventos serão adquiridos para cada poço tratado e dos controles no citômetro de fluxo (FACScan, BD Biosciences, San Jose, EUA). A intensidade de fluorescência de cada amostra será obtida por meio do software do próprio aparelho.

Interação células neoplásicas

As análises das propriedades biomecânicas das células neoplásicas tratadas com CAP realizadas em parceria com a Universidade Católica Pontífica do Chile (PUC-Chile).

As células serão colocadas em superfícies metálicas para obtenção das imagens de microscopia de força atômica (AFM) para determinar propriedades biomecânicas da célula, como amortecimento, rigidez e viscoelasticidade em interação com a superfície.

Imagem de microscopia de força atômica (AFM)

Em um AFM (Asylum Research, Santa Bárbara, EUA) serão utilizadas tips BL-TR400 (k = 0,01-0,05 Nm⁻¹) (Olympus) com excitação direta via configuração IDrive para obter mapas de canal 3D. Os canais de deflexão (A0), amplitude (A1), fase (φ) e extensão piezo (altura) serão obtidos com uma amplitude alvo de 200mV e uma velocidade lateral de 10 µm/s. O valor Q (Qfar) será obtido a 5µm sobre a superfície e a fase será bloqueada a 90°. O ponto de contato da amostra será determinado pelo algoritmo bayesiano descrito anteriormente (Rudoy et al., 2010).

Determinação das propriedades viscoelásticas das células endoteliais via AFM

Propriedades viscoelásticas, como rigidez (k-sample), amortecimento (c-sample) e viscoelasticidade (loss tangente) serão determinadas através do protocolo descrito em Cartagena et al. (2014). Resumidamente, as diferentes propriedades podem ser obtidas de acordo com as seguintes equações, onde ωdr é a frequência de excitação cantilever.

Funcionalização de AFM com uma célula

As tips AFM (BL-TR400PB com constante de mola k = 0.09N / m) serão limpas com HCl (37%), acetona e isopropanol durante 15min e depois lavadas com água milliQ. Em seguida, as tips serão incubadas primeiro com poli-L-lisina (1mg / mL em PBS) por 30min em temperatura ambiente e em segundo lugar com colágeno (20mg / mL em PBS) por 2h a 37 ° C. Posteriormente, as tips serão lavadas com PBS e armazenadas a 4°C até o uso. Num poço de placa de cultivo, aproximadamente 1x10³ células serão adicionadas em suspensão (Tyrode / tampão de glicose a pH 7,4) por 30 minutos até serem depositadas no fundo do poço. Posteriormente, o poço contendo as células será colocado no suporte da AFM com a tip quimicamente modificada. Após 10 minutos de incubação para evitar a deriva térmica, o AFM será colocado 2,5 mm sobre a superfície e, usando uma câmera CCD, uma célula específica será selecionada. Usando um tempo de aproximação de 0,5 mm / s e tempo de permanência de 120s, a célula será aderida à tip do AFM. Antes do experimento (interação célula - célula), a tip funcionalizada do AFM será mantida por 15min para estabilizar o sinal de deflexão (Zhang et al., 2004).

Força de adesão entre as células neoplásicas

A força de adesão da célula em interação será medida pela aproximação das curvas de tip em diferentes posições sobre a superfície metálica modificada e as forças serão avaliadas a uma velocidade de retração de 1000nm / s (Shahin et al., 2008).

Etapas 2 - Ensaios in vivo

A pesquisa será realizada após análise e aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) e a inclusão do animal no estudo está vinculada a autorização do tutor pela assinatura do termo de livre consentimento motivado. Serão incluídos no estudo gatos com CCE (estádios T3 ou T4) encaminhados ao Hospital Veterinário da UFERSA, os quais não tenham indicação para serem submetidos à excisão cirúrgica no momento da avaliação clínica. Os animais passarão por exame clínico (hemograma completo, perfil renal e hepático), radiografia de tórax e crânio e biópsia incisional para confirmação diagnóstica. O estadiamento tumoral será registrado de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980). O tamanho tumoral será obtido em centímetros por mensuração com paquímetro em três dimensões anteriormente às sessões com plasma.

Tratamento com CAP

Os pacientes serão submetidos a um ciclo que compreenderá três aplicações de plasma dentro de uma semana, seguido de uma semana sem exposição. A área do tumor será varrida com plasma por 1 min/cm² (METELMANN et al., 2015; METELMANN et al., 2018).

O dispositivo de plasma DBD será ajustado para pulsos de alta tensão 14 (Kv), com frequência entre 100 e 400 Hz e potências dissipadas nas descargas do gás entre 167 a 237 mW. O dispositivo ficará a uma distância de 1 a 2 mm da pele (DAESCHLEIN et al., 2013).

Os efeitos adversos do tratamento com CAP serão avaliados a cada sessão do tratamento e se presentes serão registrados de acordo com critérios estabelecidos pelo grupo de oncologia cooperativa veterinária (VCOG-CTCAE, 2016).

Efeito do CAP sobre a temperatura tumoral

A temperatura dos tumores será mensurada através de análise termográfica em ambiente fechado, com temperatura e umidade controlados por termo-higrômetro digital. As imagens digitais e termográficas serão capturadas antes e após a administração do CAP na primeira sessão a uma distância de 50 centímetros de distância do animal, através de uma câmera termográfica modelo FLIR SC620.

Etapas 3 - Análises anatomopatológicas

Colheita dos tecidos

As colheitas teciduais dos pacientes tratados com o plasma serão realizadas por meio de biópsias incisionais antes e após a terapia. Será realizada tricotomia e antisepsia do tumor e área circundante para que posteriormente os panos de campo sejam posicionados. Em seguida, será realizada incisão em cunha dos tumores, em condições estéreis. As amostras tumorais serão armazenadas em formaldeído tamponado 10% em proporção de 10 partes de formol para 1 parte de tecido. Todos os animais serão medicados após a intervenção com meloxicam (0,1 mg/kg) por via intravenosa.

Avaliação histopatológica

As avaliações histopatológicas serão realizadas antes e após o tratamento dos tumores. As amostras de tecido fixadas serão submetidas a processamento histológico padrão para inclusão em parafina. Seções seriadas de 5 µm de espessura serão obtidas usando micrótomo. Para a análise descritiva microscópica de cada grupo, as seções serão coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para quantificação dos diferentes tipos celulares do estroma tumoral serão utilizadas as lâminas coradas com HE e quando necessário será utilizado corante específico para cada tipo celular. As células visualizadas em microscópio óptico serão identificadas de acordo com a forma e coloração específica quando necessário em fibroblastos/miofibroblastos, adipócitos, células epiteliais, imunes, vasculares e musculares lisas, sendo contadas em 15 campos por grupo usando objetiva de 40X.

Ensaio de tunel

Os cortes histológicos serão desparafinizados em xilol, hidratados em série de etanol com concentrações decrescentes, lavados em água destilada e submetidos a coloração de TUNEL, utilizando o Kit de detecção de morte celular in situ (Fluoresceína-DUPT, Roche), conforme instruções do fabricante. A fluorescência verde emitida das células apoptóticas será detectada em microscópio de imunofluorescência. O DAPI será utilizado como contracoloração para identificar os núcleos das células pela coloração azul. As imagens de fluorescência obtidas serão utilizadas para quantificação da intensidade utilizando software analisador de imagem.

Imunohistoquímica

Cortes de 5µm serão preparados em micrótomo e depositados em lâminas silanizadas. Logo após, estas serão mantidas em estufa por um período de 6h, submetidos à sequência de imersão de desidratação em duas soluções de xilol por 10 minutos cada, depois imersas em soluções decrescentes de etanol em três soluções de álcool absoluto, uma a 95°GL, uma a 80°GL e uma de 70 °GL por cinco minutos cada, e por fim, as amostras permaneceram em água destilada por mesmo tempo.

A recuperação antigênica será realizada por meio da imersão das lâminas em solução de citrato de sódio (pH 6,0) aquecidas em três sessões de 5 minutos (cada) em micro-ondas convencional em potência máxima (750W), evitando a fervura do material imerso. Após o resfriamento das amostras, o material será lavado em solução tampão de tris-triton (TBS - tris(hidroximetil)aminometano, pH 7,6 acrescido de 0,075% de Triton-X- 100) duas vezes e sob agitação, por 5 minutos cada lavagem. Para o bloqueio das reações inespecíficas será utilizado 300 µL de solução de bloqueio (UltraCruz® Blocking reagente - SC 516214), diluído em 2,7 ml de TBS, gotejando sobre os cortes presentes na lâmina até cobri-los. As lâminas contendo os cortes serão armazenadas em câmara úmida por 120 minutos em temperatura ambiente.

Seguindo-se com uma lavagem em solução tris-triton sob agitação, em duas séries de 5 minutos e secas com papel toalha. Logo em seguida, as lâminas serão colocadas em câmara úmida por 12 horas sob refrigeração. No dia seguinte, as lâminas serão lavadas com TBS e imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% por 15 minutos e em ambiente escuro, para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, todos os cortes serão incubados com solução contendo o anticorpo secundário biotilado contra anticorpo de cabra (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP - AB205718), em câmara úmida por 60 minutos em temperatura ambiente e, novamente, lavadas em TBS. Em ambiente escuro, será instilada uma gota do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB) em cada secção, sendo imersas em água destilada após o tempo de cada hormônio (ARO – 60 segundos; Ando – 180 segundos; ERa – 120 segundos). As lâminas serão contra coradas em hematoxilina de Harris por 5 segundos e mergulhadas em álcool absoluto e xilol e, conseguinte, montadas com Permount® (Fisher Chemical). As reações positivas serão reconhecidas pela coloração vermelho amarronzadas, enquanto que as negativas, em tons mais suaves de marrom amareladas a coloração branca.

Etapa 4 - Avaliação do tratamento in vivo

Análise da qualidade de vida

Os pacientes serão avaliados quanto à qualidade de vida, por meio de um questionário respondido por seus tutores 15 dias após o término da terapia. O estado de saúde no momento do preenchimento do questionário será comparado pelos tutores com o estado antes do tratamento (1 – pior; 3 – igual; 5 – melhor). O material será produzido conforme descrito por Lynch et al (2010).

Classificação da resposta à terapia

Os pacientes serão avaliados após o término do tratamento, realizando-se estudo radiográfico da região tumoral, bem como classificação da resposta à terapia conforme estabelecido pelo consenso da associação do grupo de oncologia veterinária - RECIST-VCOG (NGUYEN et al., 2013). Os pacientes serão acompanhados mensalmente por meio de consultas e/ou ligações telefônicas.

Análise estatística

Os valores médios de temperatura serão avaliados por meio do teste de Tukey. A taxa de efeitos adversos será avaliada em percentual. A qualidade de vida será avaliada por meio de estatística descritiva básica, associada ao teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. A taxa de resposta à terapia será avaliada em percentual, comparando o número de pacientes que obtiveram CR ou PR com o total de pacientes por grupo. A sobrevida dos grupos será avaliada utilizando o software Kaplan Meier (SPSS versão 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados serão considerados significantes quando o valor de P for < 0,05.

Referências

1. ABIDINE, Y. et al. Mechanosensitivity of Cancer Cells in Contact with Soft Substrates Using AFM. *Biophysical Journal*, v.114, p.1165-1175, 2018.
2. BAUER, G.; GRAVES, D. B. Mechanisms of Selective Antitumor Action of Cold Atmospheric Plasma-Derived Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Plasma Processes And Polymers*, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1157-1178, 14 out. 2016.
3. BERLATO, D. et al. Response, disease-free interval and overall survival of cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with a fractionated vs a single-dose protocol of strontium plesiotherapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 21, n. 4, p.306-313, 2018.
4. BERNHARDT, T. et al. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 10p.
5. BINENBAUM, Y. et al. Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma. *Plos One*, [s.l.], v. 12, n. 1, 19 jan. 2017.
6. BU, Y. et al. Measuring Viscoelastic Properties of Living Cells. *Acta Mechanica Solida Sinica*, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 599-610, 19 jul. 2019.
7. CHEN, Z. et al. A Novel Micro Cold Atmospheric Plasma Device for Glioblastoma Both In Vitro and In Vivo. *Cancers*, [s.l.], v. 9, n. 12, p. 61-76, 30 maio 2017.
8. CHENG, F. et al. Cold Plasma with Immunomodulatory Properties Has Significant Anti-Lymphoma Activities In Vitro and In Vivo. *Blood*, [s.l.], v. 134, n. 1, p.5307-5307, 13 nov. 2019.
9. CHERNETS, N. et al. Reaction Chemistry Generated by Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Treatment is Responsible for the Tumor Eradication in the B16 Melanoma Mouse Model. *Plasma Processes And Polymers*, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 1400-1409, 12 out. 2015.
10. DAESCHLEIN, G. et al. Comparison between cold plasma, electrochemotherapy and combined therapy in a melanoma mouse model. *Experimental Dermatology*, [s.l.], v. 22, n. 9, p. 582-586, 16 ago. 2013.
11. DAESCHLEIN, G. et al. Treatment of recalcitrant actinic keratosis (AK) of the scalp by cold atmospheric plasma. *Cogent Medicine*, [s.l.], v. 4, n. 1, 6 dez. 2017.
12. DAI, X. et al. The emerging role of gas plasma in oncotherapy. *Trends in biotechnology*, v.36, n.11, p.1183-1198. 2018
13. DEMIRUTKU, A. et al. Pinnal squamous cell carcinoma in cats and the effectiveness of plasma treatment with radical pinnectomy. *Veterinární Medicína*, v. 57, n. 8, p.420-429, 2012.
14. FOFANA, M. et al. Selective treatments of prostate tumor cells with a cold atmospheric plasma jet. *Clinical Plasma Medicine*, [s.l.], v. 17-18, p.1-9, mar. 2020.
15. FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. v.14, p.777-783, 2012.
16. GAY-MIMBRERA, J. et al. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Advances In Therapy*, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 894-909, 3 maio 2016.
17. GILL, V. L. et al. Use of imiquimod 5% cream (Aldara™) in cats with multicentric squamous cell carcinoma in situ: 12 cases (2002 – 2005). *Blackwell Publishing Ltd*. Hoboken, p. 55-64, 2008.
18. GOODFELLOW, M. et al. A retrospective study of 90Strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. *Journal Of Feline Medicine & Surgery*, [s.l.], v. 8, n. 3, p.169-176, jun. 2006.
19. GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. R. Neoplasias Cutâneas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. *Oncologia em Cães e Gatos*. 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 26. p. 501-540. Versão: Ebook.
20. GUERRERO-PRESTON, R. et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *International Journal Of Molecular Medicine*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.941-946, 11 jul. 2014.
21. ISHAQ, M.; BAZAKA, K.; OSTRIKOV, K. Intracellular effects of atmospheric-pressure plasmas on melanoma cancer cells. *Physics Of Plasmas*, [s.l.], v. 22, n. 12, dez. 2015.
22. KARKI, S. B. et al. Miniature Non-thermal Plasma Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Lung Carcinoma Cells. *Plasma Chemistry And Plasma Processing*, [s.l.], v. 40, n. 1, p.99-117, 14 out. 2019.
23. Laroussi, M. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. *Frontiers in Physics*, v.8, n.74, 2020.
24. LIN, A. et al. Nanosecond-Pulsed DBD Plasma-Generated Reactive Oxygen Species Trigger Immunogenic Cell Death in A549 Lung Carcinoma Cells through Intracellular Oxidative Stress. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 18, n. 5, p. 966-989, 3 maio 2017.
25. LYNCH, S. et al. Development of a questionnaire assessing health-related quality-of-life in dogs and cats with cancer. *Veterinary And Comparative Oncology*, [s.l.], v. 9, n. 3, p.172-182, 10 set. 2010.
26. MAK, M.; ERICKSON, D. A serial micropipette microfluidic device with applications to cancer cell repeated deformation studies. *Integrative Biology*, [s.l.], v. 5, n. 11, p. 1374-1384, 16 set. 2013.
27. MASON, S. Palliative care in small animal oncology. In *Practice*, [s.l.], v. 38, n. 5, p.203-217, maio 2016.
28. METELMANN, H. et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. *Clinical Plasma Medicine*, [s.l.], v. 9, p.6-13, mar. 2018.
29. METELMANN, H. et al. Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine*, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 17-23, jun. 2015.
30. MODIANO, J. Comparative Pathogenesis of Cancers in Animals and Humans. *Veterinary Sciences*, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 24-28, 13 set. 2016.
31. MOORE, A. S. Managing Cats with Cancer. *Journal Of Feline Medicine And Surgery*, [s.l.], v. 13, n. 9, p.661-671, set. 2011.
32. MURPHY, S. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 5, p.401-407, 2013.
33. NGUYEN, S. M. et al. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary And Comparative Oncology*, v. 13, n. 3, p.176-183, 2013.
34. NISHIME, T. M. C. et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface And Coatings Technology*, [s.l.], v. 312, p.19-24, fev. 2017.
35. OWEN, L. N. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. *Veterinary Public Health Unit & Who Collaborating Center for Comparative Oncology*. 1980.
36. QUEIROZ, G. F. et al. Comparison of cryosurgery and photodynamic therapy for squamous cell carcinoma in two different populations of cats. In: 3rd World veterinary cancer congress, 2016, Foz do Iguçu. Proceeding of the veterinary cancer society, 2016.
37. QUEIROZ, G. F.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Clinical study of cryosurgery efficacy in the treatment of skin and subcutaneous tumors in dogs and cats. *Vet. Surg.*, v.37, p.438-443, 2008.
38. SAADATI, F., MAHDIKIA, H., ABBASZADEH, H. et al. Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. *Sci Rep v.8*, 7689, 2018.
39. SAMAL, S. Thermal plasma technology: the prospective future in material processing: The prospective future in material processing. *Journal Of Cleaner Production*, [s.l.], v. 142, p. 3131-3150, jan. 2017.
40. SCHARF, C. et al. Improved Wound Healing of Airway Epithelial Cells Is Mediated by Cold Atmospheric Plasma: A Time Course-Related Proteome Analysis. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, [s.l.], v. 2019, 16 maio 2019.
41. SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. : what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 370, n. 1673, 19 jul. 2015.
42. SCHNEIDER, C. et al. Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells. *Biological Chemistry*, [s.l.], v. 400, n. 1, p. 111-122, 19 dez. 2018.
43. SCHUSTER, M. et al. Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer. *Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery*, [s.l.], v. 44, n. 9, p.1445-1452, set. 2016.
44. SEEBAUER, C. et al. Physical plasma in palliative cancer care: Introduction and perspectives. *European Journal Of Molecular & Clinical Medicine*, [s.l.], v. 1, p.28-28, 7 set. 2017.
45. SEO, H. Y. et al. Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air-or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma. *PLoS One*, Korea, v.9, n.11, nov.2014.
46. SEMMLER, M. L. et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers*, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 269-287, 22 jan. 2020.
47. SIVIERO, F. *Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa*. 1. Ed. São Paulo: Roca, 2013. 494 p.
48. SPUGNINI, E. P. et al. Electroporation Enhances Bleomycin Efficacy in Cats with Periocular Carcinoma and Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, n. 5, p.1368-1375, 2015.
49. TOLOSA, E. M. C., et al. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 1. Ed. Manole, 2003. 341 p.
50. TORNIN, J. et al. Pyruvate Plays a Main Role in the Antitumoral Selectivity of Cold Atmospheric Plasma in Osteosarcoma. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13,

Atividade	2020					2021															
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	
ENSAIO TUNEL, HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUIMICA DOS TUMORES																					
ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES																					
ANÁLISE DOS RESULTADOS PARCIAIS																					
PRODUÇÃO DE RESUMOS PARA CONGRESSOS CIENTÍFICOS																					
PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS EM REVISTAS ESPECIALIZADAS																					
ANÁLISE DOS RESULTADOS FINAIS																					
RELATÓRIO FINAL																					
PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS FINAIS EM REVISTAS ESPECIALIZADAS																					

AVALIAÇÕES DO PROJETO		
HISTÓRICO DO PROJETO		
Data	Situação	Usuário
08/05/2020 14:22	CADASTRADO	GENILSON FERNANDES DE QUEIROZ (<i>genilson</i>)
08/05/2020 14:22	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	GENILSON FERNANDES DE QUEIROZ (<i>genilson</i>)
16/05/2020 17:07	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20029-2020

Título: ESTUDO DA INFECÇÃO CLÍNICA NATURAL PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV), ACHADOS DE IMAGENS E FATORES DE RISCO NAS COINFECCÕES

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: HOSPITAL VETERINÁRIO (11.01.00.11.22)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: Felis catus, retrovírus, lentivírus, ultrassonografia, radiografia, ecocardiografia

E-mail: joao.antunes@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/08/2020 a 31/07/2021

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Medicina Veterinária Preventiva

Especialidade: Epidemiologia Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

A imunodeficiência viral felina (FIV) é considerada uma das doenças mais comuns em gatos em todo mundo e largamente difundida na população de gatos domésticos do Brasil. E, apesar de ser extensamente estudada, informações a respeito das alterações hematológicas, bioquímicas e de imagens (radiografia, ultrassonografia e ecocardiografia) em gatos naturalmente infectados não estão completamente elucidadas, principalmente na região nordeste do país. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é a realização da caracterização clínica, epidemiológica, laboratorial e imagística da infecção natural pelo vírus da imunodeficiência viral felina (FIV) em gatos provenientes da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Para tanto, serão utilizados 80 gatos provenientes de atendimentos clínicos do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). Os animais serão divididos em dois grupos experimentais após a realização de um teste imunocromatográfico para a detecção de anticorpos contra o FIV: G1 (40 gatos FIV-positivos) e G2 (40 gatos FIV-negativos). Todos os animais serão submetidos aos exames clínicos e de imagens completos e a coleta de sangue para realização de avaliações hematológicas e bioquímicas, e para a realização de testes sorológicos com intuito de investigar as coinfeccções por *Toxoplasma gondii* e *Leishmania infantum*. Os animais também serão submetidos aos exames de imagem para identificar e caracterizar as possíveis alterações presentes nos felinos. Espera-se, a partir do desenvolvimento desse estudo, esclarecer melhor a infecção natural desta retrovírose, suas coinfeccções e as alterações laboratoriais e de imagens em gatos naturalmente infectados no nordeste do país.

Introdução/Justificativa

(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

A imunodeficiência viral felina (FIV) é uma doença comum em gatos (LITTLE et al., 2020), mas faltam informações que descrevam sua prevalência, aspectos clínicos e, principalmente, achados de imagens no Brasil (TEIXEIRA et al., 2019), o que dificulta traçar um perfil da enfermidade no país. É uma retrovírose causada por um lentivírus (HARTMANN, 2011) que induz imunossupressão crônica podendo predispor a infecções secundárias e coinfeccções (MILLER et al., 2019) como pela *Leishmania infantum* e o *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2009; SOBRINHO et al., 2012), que destacam-se na medicina felina como importantes patógenos zoonóticos (HARTMANN et al., 2013; EGBERINK et al., 2015).

A *Leishmania infantum* é o agente etiológico da leishmaniose felina (PENNISI; PERSICHETTI, 2018), uma doença parasitária zoonótica crônica. As retrovíroses parecem ser um fator de risco à esta doença (FERNANDEZ-GALLEGO et al., 2020) especialmente em áreas endêmicas da leishmaniose canina e humana (PENNISI et al., 2015), porém são limitados os estudos que apresentam uma associação significativa entre essas infecções (SPADA et al., 2013), além de que não há estudos consistentes que descrevam o papel dos gatos na epidemiologia desta doença em condições naturais (PENNISI; PERSICHETTI, 2018).

Bezerra e colaboradores (2019) demonstraram pela primeira vez que felinos da cidade Mossoró, no Rio Grande do Norte, estão sendo expostos a esta zoonose, sugerindo que os mesmos possam estar participando da cadeia epidemiológica de transmissão da leishmaniose visceral. Observou-se soropositividade em 14/91 (15,38%), 26/91 (28,57%) e 3/91 (3,29%) animais para *Leishmania* spp., FIV e FeLV, respectivamente. Nenhuma amostra foi positiva na PCR. Além disso, não foi observada nenhuma associação estatística significativa entre a soropositividade para *Leishmania* spp. e gênero, idade, presença de sinais clínicos, fatores de risco avaliados e positividade para as retrovíroses.

Assim como a *L. infantum*, o *Toxoplasma gondii* está entre os agentes etiológicos mais estudados em gatos (DUBEY et al., 2009). Caracteriza-se por ser um protozoário zoonótico responsável por causar a toxoplasmose (HARTMANN et al., 2013), e tem como hospedeiro definitivo o gato doméstico. A doença possui epidemiologia complexa e diagnóstico complicado devido à grande variedade de sinais clínicos (CALERO-BERNAL et al., 2019). A toxoplasmose clínica já foi documentada em alguns gatos infectados por retrovíroses (HEIDEL et al., 1990). Em estudos experimentais, a infecção pela FIV desencadeou a doença e predisps os gatos à toxoplasmose generalizada aguda (DAVIDSON et al., 1993), mas alguns trabalhos posteriores não identificaram a mesma associação (SPADA et al., 2013). Assim, ainda não há dados suficientes na literatura que permitam afirmar que gatos FIV-positivos são de fato mais predispostos à toxoplasmose.

A FIV, associada ou não as coinfeccções, provoca anormalidades importantes nos órgãos, tornando um desafio a suspeita e o diagnóstico baseado apenas no exame clínico (HARTMANN, 2012). Nesse sentido, exames de imagem são fundamentais para o prognóstico e tratamento, porém são escassos os dados que caracterizem as alterações esperadas nos infectados (RUDAN et al., 2017). Segundo Taffin e colaboradores (2016), a ultrassonografia foi útil na avaliação da patogênese da doença renal em gatos naturalmente infectados.

Exames ecocardiográficos e radiográficos não são rotineiros nesse contexto de FIV e coinfeccções, porém já se demonstraram eficazes no diagnóstico e prognóstico de doenças infecciosas em gatos com endocardite infecciosa (DIXON-JIMENEZ et al., 2011) e pneumonia infecciosa, respectivamente. Nessa última, a infecção viral foi considerada como principal causa de pneumonia em quase 30% dos gatos submetidos à radiografia torácica (MACDONALD et al., 2003).

A avaliação clínica, laboratorial e de imagens permitirá identificar as desordens mais encontradas em gatos naturalmente infectados pela FIV, bem como suas coinfeccções e, a partir disso, auxiliar no mapeamento da doença no nordeste brasileiro, de forma a contribuir com a medicina felina em melhorar a abordagem diagnóstica e terapêutica desses pacientes na rotina clínica. Além disso, estudos de caso-controle são necessários para investigar o papel da infecção natural pelo FIV como um fator de risco para outras infecções.

Objetivos

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização clínica, epidemiológica, laboratorial e de imagem da infecção natural pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) em gatos provenientes da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil hematológico e bioquímico de gatos infectados naturalmente pelo FIV e suas coinfeccções;
- Avaliar a coinfeccção por *Leishmaniose* e *Toxoplasmose*;
- Determinar as principais alterações nos exames de ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e ecocardiografia em gatos infectados naturalmente pelo FIV e suas coinfeccções;
- Avaliar os fatores de risco para infecção natural pelo FIV bem como para suas coinfeccções.

Metodologia

METODOLOGIA

Serão utilizados 80 gatos provenientes de atendimentos clínicos do Hospital Veterinário (HOVET) Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA, protocolo de número 23091.008147/2017-28.

O presente trabalho será dividido em três experimentos. O primeiro experimento consiste na caracterização clínica e epidemiológica de gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência felina. Para isso, os animais serão divididos em dois grupos experimentais: G1 (40 gatos FIV-positivos) e G2 (40 gatos FIV-negativos). Para identificar os animais quanto à infecção pelo FIV e formar os grupos será realizado um teste imunocromatográfico para a detecção de anticorpos contra o FIV e de antígenos do FeLV (Alere FIV Ac/FeLV Ag Test Kit, Alere®). O teste será realizado conforme recomendações do fabricante, utilizando amostras de sangue total. Todos os animais serão submetidos a exame clínico completo e as informações concernentes ao animal (sexo, idade, raça), alterações clínicas e o estilo de vida dos mesmos serão registradas em fichas individuais. Em seguida, amostras de sangue de 5 mL serão colhidas por meio de venopunção da jugular e acondicionadas em tubos de vidro com e sem EDTA. As amostras sem EDTA serão posteriormente centrifugadas a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos para separação do soro. Tais amostras serão

destinadas para realização de exames hematológicos e bioquímicos, sendo que o restante do soro e sangue total será transferido imediatamente para tubos plásticos tipo eppendorf e armazenados a -20°C até a execução de testes sorológicos posteriormente.

O segundo experimento será a realização da avaliação hematológica, bioquímica, radiográfica torácica, ecocardiográfico e ultrassonográfica abdominal dos felinos. Todos os animais serão submetidos à avaliação hematológica e bioquímica, por meio de hemograma completo e perfil bioquímico, no intuito de se caracterizar as alterações mais comumente observadas nos gatos infectados pelo FIV. Para a avaliação hematológica, amostras de sangue total com EDTA serão analisadas utilizando um contador hematológico automatizado (Scil Vet abc™). A contagem diferencial de leucócitos será feita por avaliação manual de esfregaços sanguíneos corados com corantes hematológicos do tipo Diff-Quick (Panótico Rápido, Renilab, Brasil), utilizando microscópio óptico. As avaliações bioquímicas serão realizadas a partir de amostras de soro em analisador bioquímico semi-automático (Bioplus BIO-200), com os kits reagentes apropriados. Os parâmetros avaliados serão: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), creatinina, ureia, proteína total e albumina.

Em relação aos exames de imagem, os animais serão submetidos à varredura abdominal por meio de ultrassonografia para identificar e caracterizar as possíveis alterações viscerais presentes nos felinos dos dois grupos estudados. O exame ecocardiográfico (bidimensional, modo-M, Doppler colorido e pulsado) também será realizado para possíveis alterações na fisiopatologia cardíaca. Para realização do exame ecocardiográfico/ultrassonográfico, o animal será posto em decúbito lateral direito, depois esquerdo, bem como o ventro-dorsal e submetido à tricotomia ampla de abdômen e tórax cranial, bilateralmente. Com transdutores linear e setorial de frequência entre (5 – 10) MHz (Infinit 7V, Ultramedic), os exames de imagem serão realizados com ajuda de gel a base de água para a melhor condução das ondas sonoras. As radiografias realizadas no HOVET serão obtidas em decúbito lateral direito/esquerdo e ventro-dorsal para as radiografias torácicas e abdominais com o auxílio do aparelho de raio-x fixo convencional analógico (X-Rad, 120 kVp, 400 mA e 5-6 mAs). As imagens obtidas serão preparadas na processadora automática para filmes de raios X Macrotec MX-2 (Macrotec Ind. e Com. de Equipamentos LTDA) e digitalizadas. Todos os exames de imagem serão laudados e tabulados para análise estatística entre os grupos.

No terceiro experimento será realizada a detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii será feita por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando taquizoítos de T. gondii da cepa RH. Controles positivos e negativos serão utilizados em todas as reações e o ponto de corte (cut off) adotado será 1:40 (SOUSA et al., 2014). Ainda nesta etapa a detecção de anticorpos anti-Leishmania infantum serão realizados duas metodologias sorológicas: RIFI e ELISA. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) será executada conforme descrito por Noé e colaboradores (2015). Serão empregadas como antígenos as formas promastigotas de Leishmania infantum, sendo considerado reagente o título igual ou superior de 80 (PENNISI et al., 2012). Controles negativos e positivos serão incluídos em cada lâmina. Já para o ELISA, será utilizada a técnica previamente descrita, a partir do uso de placas de poliestireno de 96 poços, previamente sensibilizadas com antígeno solúvel de L. infantum. O valor do ponto de corte será determinado a partir de amostras de sangue de gatos provenientes de área não endêmica para a leishmaniose visceral, e a média e os desvios padrão serão calculados. O valor da média somado ao triplo do valor do desvio padrão será considerado o ponto de corte (VIDES et al., 2011). Para a análise estatística será utilizado o programa estatístico SPSS versão 22. Os dados obtidos serão avaliados e então serão estabelecidos os testes estatísticos mais adequados para correlacionar o questionário/ficha clínica com a variável "animais infectados" com as diversas outras possíveis variáveis dentre os fatores de risco: sexo, idade, raça, alterações clínicas, estilo de vida (acesso à rua, contato com outras espécies animais), coinfeções, alterações hematológicas/bioquímicas e alterações ultrassonográficas, radiográficas e ecocardiográficas.

Referências

- ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CANAVATE, C.; DEDET, J-P.; GRADONI, L.; TER HORST, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; MORENO, J. The Relationship Between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clinical Microbiology Review*, v. 21, p. 334-359, 2008.
- ARBOUR, J.; BLAIS, M. C.; CARIOTO, L.; SYLVESTRE, D. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001-2009). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 48, p. 256-260, 2012.
- ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S.H. Is the Cat an Important Reservoir Host for Visceral Leishmaniasis? A Systematic Review with Meta-analysis. *Journal Venomous Animals Including Tropical Diseases*, v. 25, 2019.
- ATTA, M. G.; LONGENECKER, J. C.; FINE, D. M.; NAGAJOTHI, N.; GROVER, D. S.; WU, J.; RACUSEN, L. C.; SCHEEL, P. J. JR.; HAMPER, U. M. Sonography As A Predictor Of Human Immunodeficiency Virus-Associated Nephropathy. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v. 23, n. 5, p. 603-610, 2004.

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
096.062.824-06	ZACARIAS JACINTO DE SOUZA JÚNIOR	DISCENTE	Não informada	Membro
087.118.887-25	JOAO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES	SERVIDOR	Não informada	Coordenador
046.296.653-40	CAMILA PONTES LANDIM	DISCENTE	Não informada	Membro
071.718.884-10	THAYS RIBEIRO PACÓ	DISCENTE	Não informada	Membro
074.916.564-20	MOISES DANTAS TERTULINO	DISCENTE	Não informada	Membro
094.564.844-83	JOSE ARTUR BRILHANTE BEZERRA	DISCENTE	Não informada	Membro

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021						
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
SELEÇÃO DOS ANIMAIS												
SOROLOGIA, EXAMES DE IMAGEM E ANÁLISE LABORATORIAL												
ANÁLISE DOS RESULTADOS, REDAÇÃO DE RESUMOS PARA O SEMIC												
AVALIAÇÕES DO PROJETO												

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
15/05/2020 09:59	CADASTRO EM ANDAMENTO	JOAO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES (<i>joao.antunes</i>)
15/05/2020 10:32	CADASTRADO	JOAO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES (<i>joao.antunes</i>)
15/05/2020 10:32	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	JOAO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES (<i>joao.antunes</i>)
16/05/2020 23:20	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20018-2020

Título: AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FORRAGEIRAS PARA REGIÕES SEMIÁRIDAS

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: GRAMÍNEAS, LEGUMINOSAS, NATIVAS, CULTIVADAS, FORRAGEM

E-mail: liz@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 15/07/2020 a 31/08/2023

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Zootecnia

Sub-Área: Pastagem e Forragicultura

Especialidade: Avaliação, Produção e Conservação de Forragens

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O estudo de espécies forrageiras nativas e cultivadas é de grande importância para os alunos das áreas de ciências Agrárias. Esta possibilidade de conhecer o máximo de espécies forrageiras, auxilia o aluno em formação para melhor utilização destes recursos na alimentação animal, bem como no aprimoramento de suas atividades junto a consultorias e extensão. Baseado nesta percepção, o objetivo deste projeto é semear no setor de Forragicultura e Pastagem, espécies forrageiras, gramíneas e leguminosas, com potencial forrageiro, para serem utilizadas em aulas práticas e na avaliação de seu comportamento morfo-fisiológico e estrutural. Serão utilizados canteiros de alvenaria já construídos no setor de forragicultura, receberão tratamento de solo e preparação da área para recebimento das espécies. Contará com a melhoria do sistema de irrigação e com o monitoramento dos alunos ligados ao projeto. As sementes serão adquiridas por empresas da área de sementes forrageiras, coleta em propriedades e de produtores particulares. As espécies serão implantadas na área e serão avaliadas algumas variáveis: produção de matéria seca (Kg MS/ha), altura, número de folhas e/ou ramos, valor nutritivo e morfogênese. As avaliações serão a cada quatro semanas. Serão implantados o máximo de espécies possíveis (gramíneas, Leguminosas e outras). Após coleta de dados os integrantes do projeto farão resumos e artigos que possibilitem a divulgação do trabalho com as espécies forrageiras no setor de forragicultura da UFRSA-RN

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

As pastagens cultivadas vêm ocupando áreas cada vez maiores no Brasil, principalmente devido ao padrão de produção que se firmou nos últimos anos, exigindo cultivares mais produtivos e adaptados. Estima-se que dos 180 milhões de hectares de pastagens existentes no país, cerca de 100 milhões de hectares são de pastagens cultivadas (Dias-Filho, 2014).

A quase totalidade dos cultivares de plantas forrageiras tropicais foi obtido por processos de coleta e, ou introdução praticados por instituições de pesquisa. Entre essas espécies, os gêneros *Brachiaria* e *Panicum* apresentam maior importância. Cerca de 80% da área de pastagens cultivadas no Brasil utiliza cultivares desses gêneros (Fernandes et al., 2000). Segundo Valle et al. (2003), esses dois gêneros de plantas forrageiras dizem respeito a aproximadamente 85% das sementes comercializadas para implantação, recuperação ou renovação de pastagens. Porém, na região nordeste o gênero *Cenchrus* tem se destacado pela sua notável adaptação às condições do semi-árido (Dantas Neto et al., 2000). Dentre as leguminosas arbustivas a *Leucaena leucocephala* é a mais estudada e é relativamente bem disseminada em todo o Brasil, tendo o seu uso se consolidado na formação de bancos de proteína. No semi-árido tem sido utilizada como componente do sistema CBL (caatinga, buffel, leucaena). Entre outras leguminosas o *Guandu* e *Gliricídia* também são utilizadas na dieta de ruminantes no Nordeste brasileiro. Nesse contexto, a perspectiva e a necessidade de aumentar a diversidade das pastagens passa pelo lançamento de novos cultivares, mas só esta medida não constitui solução eficaz. Nascimento Jr. et al. (2004) chamaram a atenção para o fato de já existir uma ampla gama de opções de espécies e cultivares de plantas forrageiras, sendo o problema, portanto, mais relacionado com a necessidade de melhor conhecimento das plantas forrageiras existentes e de seu potencial de uso nos diferentes ecossistemas.

O desenvolvimento, crescimento e senescência de folhas e perfilhos são os principais processos fisiológicos que determinam o fluxo de tecidos na planta e consequentemente sua capacidade de produção. A produtividade das gramíneas forrageiras está diretamente relacionada com sua capacidade de emitir folhas de meristemas remanescentes após a desfolhação, característica de extrema importância para o restabelecimento da área foliar e consequentemente para a persistência da planta forrageira na pastagem. Dessa forma, torna-se essencial que estudos de dinâmica de produção das gramíneas forrageiras por meio de avaliações de características morfogênicas, além daquelas de produção, sejam conduzidos a fim de gerar conhecimentos básicos para definição de estratégias ideais de manejo. Estudos de características morfogênicas, estruturais e produtivas de plantas forrageiras tem sido bastante difundidos no Brasil e os resultados dessas pesquisas muito tem auxiliado na condução do manejo adequado das forrageiras, principalmente para os ecossistemas do Brasil Central. Considerando-se as peculiaridades do Estado do Rio Grande do Norte, torna-se essencial a avaliação de forrageiras que possam ser utilizadas em sistemas de produção animal, afim de se identificar aquelas mais adaptadas e com máximo potencial produtivo para a região em estudo.

Nesse sentido, avaliações ecofisiológicas, via morfogênese e estrutura do pasto, estudo morfo-anatômicos e nutricional, assim como de produção de forragem serão de suma importância para identificação de cultivares adaptados, definição de práticas de manejo eficientes tanto para produtividade e caracterização quanto para sustentabilidade dos sistemas de produção animal na região de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte.

Este projeto tem como meta: Identificar espécies Nativas e Cultivadas adaptados às condições edafoclimáticas da região de Mossoró, bem como outras espécies que estejam alocadas no setor de produção de alimento forrageiro da UFRSA e/ou regiões próximas. Caracterizar o padrão de crescimento, via fluxo de tecidos, das gramíneas e leguminosas forrageiras na região de Mossoró. Selecionar materiais promissores para utilização em futuros experimentos. Reestruturar o campo agrostológico da UFRSA que retornará a ser utilizado para aulas práticas da disciplina de forragicultura. Incluir a participação de alunos na condução do experimento para que possam adquirir conhecimento prático e científico na área de forragicultura e pastagem, bem como incentivá-los à pesquisa. Criar e consolidar um grupo de pesquisa em forragicultura e pastagem na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, fortalecendo o Programa de Mestrado em Produção Animal (UFRN/UFRSA).

Objetivos

- Plantar e avaliar espécies forrageiras que consigam se adaptar as condições locais de semiárido;
- Avaliar aspectos agronômicos, morfogênicos e estruturais das espécies;
- Avaliar a qualidade das espécies forrageiras;
- Avaliar o consumo de algumas espécies na alimentação de ovinos e/ou bovinos;
- Implantar o maior número de espécies forrageiras, entre gramíneas e leguminosas, para conhecimento didático e científico na UFRSA. Disponibilizá-los para as disciplinas de Forragicultura e qualquer outra disciplina afim.

Metodologia

O experimento será conduzido na área física estruturada para produção de alimento forrageiro da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFRSA), em Mossoró, RN. Os capins utilizados serão das espécies variadas, adquiridas por empresas de sementes, produtores rurais e coletadas em propriedades particulares, bem como outras espécies que estejam alocadas no setor de produção de alimento forrageiro da UFRSA e/ou regiões próximas.

Serão implantados em canteiros no setor de forragem da UFRSA, de dimensionamento de 2 x 1,5 m.

As espécies serão semeadas em linhas contínuas, sendo que a densidade de semeadura considerará a recomendação para cada cultivar e o VC% (valor cultural) das sementes utilizadas. A profundidade da semeadura será entre 3 e 4 cm. O campo será mantido permanentemente livre de plantas daninhas e será realizado o controle de formigas durante todo o período de avaliação. Além de reestruturar e reavaliar algumas áreas já plantadas.

O experimento tem previsão de duração de 36 meses. Antes da implantação dos cultivares, serão retiradas amostras de solo (cinco para cada área de 432 m²) nas camadas de 0-10 e 0-20 cm de profundidade para verificar o grau de fertilidade. De posse dessas informações, serão realizadas as correções e adubações de acordo com as exigências nutricionais de cada gênero.

As plantas deverão ser cortadas (uniformização) 8 semanas após a emergência, data a partir da qual serão determinados os futuros cortes de avaliação a cada 4 semanas durante a época de maior precipitação. A altura de corte deverá ser de 15 a 20 cm. Essas alturas de corte deverão ser respeitadas durante todo o período de avaliação e espécies forrageira estudada.

Serão feitas medidas de altura do dossel (cm) determinada antes de cada corte utilizando-se uma régua graduada em centímetros, sendo medidos cinco pontos aleatórios por unidade experimental. A altura de cada ponto corresponderá à altura média do dossel em torno da régua. A altura no momento do corte também será tomada, para assegurar que a altura de corte pré-estabelecida seja cumprida.

O primeiro dado de produção de forragem considerará o acúmulo de forragem entre a semeadura e o corte de uniformização. Após a eliminação das bordaduras a área útil será cortada e pesada no campo individualmente para estimativa do acúmulo de MS total. Será retirada uma sub-amostra (mínima de 500 gramas), que será pesada, para determinação do peso verde, e separação das frações lâmina foliar, colmos e material morto. Esses componentes serão levados à estufa de ventilação forçada a

Atividade	2020					2021													
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
REVISÃO DE LITERATURA E TABULAÇÃO DOS DADOS																			
ORGANIZAÇÃO DE ARTIGO E RESUMOS EXPANDIDOS																			
ELABORAÇÃO DE BANNERS E RELATÓRIO DOS EXPERIMENTOS COM AS ESPÉCIES FORRAGEIRAS																			
IMPLANTAÇÃO DE NOVOS CANTEIROS																			
MANUTENÇÃO DA IRRIGAÇÃO																			

AVALIAÇÕES DO PROJETO

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
09/09/2019 09:19	CADASTRADO	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS (<i>liz</i>)
09/09/2019 09:19	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS (<i>liz</i>)
25/09/2019 16:00	SUBMETIDO	IVANILSON DE SOUZA MAIA (<i>ivanilson.maia</i>)
Parecer (19/09/2019) : PROJETO APROVADO NA 9ª REUNIÃO ORDINÁRIA DO DCA		
22/10/2019 08:15	RETORNADO PARA CORREÇÕES	NAELSON EXPEDITO ALVES DA SILVA (<i>naelson</i>)
Parecer : Não aprovamos projetos com captura de telas. Você pode utilizar as mesmas informações importantes do projeto que colocou no SIGAA, porém, coloque numa estrutura de projeto de pesquisa (pode utilizar nosso modelo disponível na página da PROPPG).		
04/11/2019 10:45	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS (<i>liz</i>)
17/11/2019 21:38	SUBMETIDO	JOSE ERNANDES RUFINO DE SOUSA (<i>ernandes25</i>)
Parecer (14/11/2019) : Aprovado.		
05/12/2019 09:41	RETORNADO PARA CORREÇÕES	KATIANE DANTAS SOARES (<i>katiane</i>)
Parecer : Alterar vigência do projeto		
04/05/2020 12:56	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS (<i>liz</i>)
18/05/2020 09:45	RETORNADO PELO DEPARTAMENTO	JOSE ERNANDES RUFINO DE SOUSA (<i>ernandes25</i>)
Parecer (18/05/2020) : Projeto retornado para ajuste no cronograma de atividades, conforme orientação da PROPPG.		
18/05/2020 11:39	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	LIZ CAROLINA DA SILVA LAGOS CORTES ASSIS (<i>liz</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20023-2020

Título: BIOQUÍMICA URINÁRIA DE EQUÍDEOS

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: urina; GGT; UPC

E-mail: michelly@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/07/2020 a 01/07/2022

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Patologia Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O uso de enzímia na triagem de doença renal tem sido um procedimento diagnóstico ativamente adotado na medicina humana, sendo considerado um indicador sensível e não invasivo, de disfunção renal precoce (Bayly et al., 1986; Fuentes et al., 1997; Hinchcliff et al., 1988).

Elevações na atividade urinária de GGT, bem como a proteinúria, são consideradas metodologias adequadas para averiguação da morfofuncionalidade renal, pois o alto peso molecular das enzimas, e outras proteínas, impede a sua filtração a partir do sangue pelo glomérulo normal (Hinchcliff et al., 1988; Meyer et al., 2005).

Portanto, não existe correlação entre o aumento da atividade sérica da GGT e o aumento da atividade de GGT na urina, que neste caso, é originada da borda em escova do epitélio tubular renal proximal (Hinchcliff et al., 1988; Meyer et al., 2005).

Assim como a proteinúria que configura-se como uma das primeiras alterações a surgir quando o paciente inicia uma lesão renal.

Entretanto, para o correto e precoce diagnóstico de lesões renais, é necessário estabelecer parâmetros de normalidade em animais hígidos, das espécies em questão, ainda não disponíveis na literatura, e posteriormente, detectar alterações na atividade enzimática urinária de animais com suspeita de nefropatias tubulares.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

Os exames complementares como a bioquímica sérica, hematologia e urinálise fornecem importantes informações para avaliação do estado clínico do animal, monitoramento durante o tratamento, quando este é indicado, e prognóstico da evolução da doença.

Dentre os exames complementares, a gama glutamiltransferase (GGT) é uma enzima que tem sido destacada em inúmeros estudos. A GGT urinária apresenta concentração máxima nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e alça de Henle dos néfrons. Geralmente, quando ocorrem aumentos duas a três vezes superior ao valor basal indica lesão no epitélio tubular, sendo por isso considerada um marcador precoce de dano tubular renal em cães (UECHI et al., 1994; GRAUER & LANE, 1997; CLEMO, 1998). Entretanto, esses mesmos parâmetros não foram ainda determinados em equídeos hígidos e ainda não se conhece como ou se estes se alteram quando ocorrem afeções renais em animais dessas espécies.

Esse projeto auxiliará discentes da graduação em Medicina Veterinária e pós-graduandos a melhor compreender o estado funcional dos rins de equídeos a partir das análises laboratoriais propostas.

Objetivos

Geral:

Estabelecer a atividade enzimática da Gama Glutamiltransferase Urinária (GGTu) e determinar a UPC (relação proteína/creatinina) em equídeos hígidos.

Específicos:

Determinar a relação entre a atividade enzimática da GGT e creatinina urinária em equídeos hígidos;

Verificar a influência da densidade urinária na atividade enzimática de GGT e UPC em equídeos hígidos;

Correlacionar o perfil sérico e urinário de GGT, bem como, de outros parâmetros relacionados à morfofuncionalidade renal em equídeos hígidos.

Metodologia

ANIMAIS E LOCAL DE ANÁLISES

Para este estudo, serão utilizados 30 equídeos hígidos (10 equinos, 10 asininos e 10 muaras) alocados ou atendidos no setor de grandes animais do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob os cuidados dos médicos veterinários residentes e técnico, ou de proprietários particulares da região.

O material coletado será analisado no laboratório de Patologia Clínica situado no Hospital Veterinário e no Laboratório Didático de Patologia Clínica e Farmacologia Geral da UFERSA.

EXAME FÍSICO

Os animais serão avaliados em local apropriado, utilizando brete de contenção. Serão analisados os valores de frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) com auxílio de estetoscópio, grau de desidratação por meio da avaliação da exsiccose, tempo de preenchimento capilar (TPC) por pressão na mucosa oral (gengiva) e temperatura retal (TR) utilizando termômetro clínico digital.

COLETA DE SANGUE E URINA

Os animais serão submetidos à venopunção jugular para obtenção de 10 ml de sangue, que serão subdivididos em dois frascos, sendo: 5 ml no frasco contendo ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para exame hematológico e obtenção de plasma e, 5 ml em frasco sem anticoagulante para obtenção de soro.

Serão coletados 10 ml de urina sendo este volume acondicionado em frascos estéreis apropriados. Os frascos serão identificados e encaminhados ao laboratório.

ANÁLISE LABORATORIAL

As amostras de sangue obtidas em tubos com anticoagulante, serão homogeneizadas em equipamento apropriado antes realização das análises hematológicas.

As amostras obtidas em tubos sem anticoagulantes serão submetidas à centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. Ao término da centrifugação, o soro será removido e com auxílio de uma pipeta, alíquotados em microtubos para posterior análise bioquímica. Em soro serão mensurados os parâmetros bioquímicos: ureia, creatinina, AST, GGT e proteinograma.

No sangue total, além das análises hematológicas que incluem eritograma, leucograma, plaquetograma, será determinado o teor de fibrinogênio. Serão realizadas contagens manuais, incluindo contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas, determinação do hematócrito e concentração de hemoglobina por espectrofotometria.

A glicose sérica será mensurada por meio de aparelho glicosímetro portátil. A partir dos valores obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina, serão calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

As contagens diferenciais de leucócitos serão realizadas em esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido, enumerando-se 100 células e estabelecendo-se as fórmulas leucocitárias relativa e absoluta.

As análises bioquímicas serão realizadas em aparelho semiautomatizado utilizando kits comerciais específicos para determinação dos valores de ureia, creatinina, AST, GGT e proteinograma.

A urinálise será composta por avaliação física (cor, aspecto, turbidez, pH, densidade), química por meio de tiras reagentes e sedimentoscopia. A bioquímica urinária determinará a relação proteína/creatinina (UPC) e atividade enzimática de GGT (diluição de 1:25) através de kits comerciais específicos. Para apresentação dos valores finais de GGT urinária serão procedidos cálculos para correção em função da densidade urinária.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, será utilizado o teste comparação de médias, pelo método de Tukey. Permitindo comparar resultados de tratamento dos animais entre si. Se ocorrer distribuição não-paramétrica dos dados. Os mesmos serão analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis. A significância adotada será $p < 0,05$.

Referências

- BAYLY, W. M., BROBST, D. F., ELFERS, R. S., & REED, S. M. (1986). Serum and urinary biochemistry and enzyme changes in ponies with acute renal failure. The Cornell veterinarian, 76(3), 306-316.
- CLEMO, F. A. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. Toxicologic Pathology, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 29-32, 1998.
- FUENTES, V. O., GONZALEZ, H., SANCHEZ, V., FUENTES, P., & ROSILES, R. (1997). The effect of neomycin on the kidney function of the horse. Journal of Veterinary Medicine Series A, 44(1-10), 201-205.
- GRAUER, G. F.; LANE, I. F. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, S. J.. Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato / Stephen J. Ettinger; tradução Sônia de Aguir Gomes do Nascimento, Fernando Gomes do Nascimento. - São Paulo: Manole, 1992.2557p: il.
- HINCHCLIFF, K. W.; MCGUIRK, S. M.; MACWILLIAMS, P. S. Gentamicin nephrotoxicity. In: Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA). 33: 67-75. 1988.
- MEYER, C.; GUTHRIE, A. J.; STEVENS, K. B. Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. Journal of the South African Veterinary Association, v. 76, n. 1, p. 26-32, 2005.
- UECHI, M.; TERUI, H.; NAKAYAMA, T.; ISHIKAWA, R.; WAKAO, Y.; TAKAHASHI, M. Evaluation of urinary enzymes in dogs with early renal disorder. The Journal of Veterinary Medical Science, Tokyo, v. 56, n. 3, p. 555-556, 1994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7948390 > Acesso em: 10 maio. 2019

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada Função
064.206.033-90	VICTOR HUGO TEIXEIRA BATISTA	DISCENTE	Não informada Membro
012.082.234-29	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO	DOCENTE	Não informada Coordenador

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021					20											
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	A
ATUALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA																						
ATENDIMENTO DE ANIMAIS																						
COLETA DE SANGUE E PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA PREPARO DO PRP																						
ANÁLISE DOS DADOS																						
ELABORAÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS PARA SUBMISSÃO																						

AVALIAÇÕES DO PROJETO

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
06/05/2020 17:16	CADASTRO EM ANDAMENTO	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (<i>michelly</i>)
06/05/2020 17:46	CADASTRADO	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (<i>michelly</i>)
06/05/2020 17:46	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (<i>michelly</i>)
16/05/2020 12:38	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20030-2020

Título: PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) PARA TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM EQUÍDEOS

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: ferida; reparação; terapia

E-mail: michelly@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/07/2020 a 01/07/2022

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Patologia Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

Em função das dificuldades encontradas em alguns casos clínicos para a cicatrização adequada de feridas, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) caracteriza terapêutica promissora para acelerar e estimular o processo de cura em lesões cutâneas. Este tratamento consiste na utilização de um concentrado de plaquetas obtido através da centrifugação do sangue e posterior obtenção de plasma do paciente, e possui as vantagens de estimular a cicatrização, sem toxicidade, sendo inclusive incapaz de promover imunorreação.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

O interesse de desenvolver uma pesquisa nessa área está na relevante casuística de lesões cutâneas em animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, e pelo fato de que as pesquisas que trazem o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) nas reparações teciduais, têm apresentado excelentes resultados, além de tratar-se de uma alternativa de baixo custo e fácil preparo.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto biológico, utilizado para a promoção de melhor reparo tecidual, por meio dos fatores de crescimento presentes em sua composição. Essa terapia possui diversas vantagens sobre os tratamentos convencionais, por proporcionar um tratamento personalizado, pouco invasivo e com aceleração da recuperação funcional, além de oferecer baixo risco devido a sua natureza autóloga (Anitua et al., 2012; Textor e Tablin, 2013).

É um hemoderivado, utilizado terapêuticamente, de fácil obtenção, com boa relação custo/benefício para se obter altas concentrações de fatores de crescimento, melhorando a reparação e regeneração de tecidos (Nikolidakis & Janses 2008). Adicionalmente tem sido bastante estudado na medicina equina, sendo empregado principalmente em enfermidades como tendinite (Maia et al. 2009), desmíte, osteoartrite (Carmona et al. 2009) e cicatrização de feridas (De Rossi et al. 2009), entretanto, ainda não foi estabelecido um protocolo padrão para a sua obtenção através da centrifugação do sangue total em todos os equídeos.

As plaquetas armazenam fatores de crescimento, que são peptídeos sinalizadores responsáveis pela regulação do metabolismo celular. Esta regulação ocorre pelas vias de sinalização intracelular através da interação com um complexo de receptores de superfície celular. Isto resultará no aumento da transcrição dos fatores e produção de proteínas que desencadeiam a proliferação e diferenciação celular, além do aumento da produção da matriz extracelular (Dahlgren et al. 2001) e estimulam ainda a angiogênese facilitando o processo de reparação tecidual (Bosch et al. 2011).

Por fim, foi elaborado um estudo prévio para aquisição de informações acerca dos diferentes protocolos e preparo do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em equinos e, com base nessas referências, selecionou-se um desses protocolos, que deverá ser adotado neste estudo, sendo de relevância primordial para a execução do projeto, ademais, o trabalho auxiliará discentes da graduação em Medicina Veterinária e pós-graduandos a melhor compreender o processo de cicatrização de feridas cutâneas em equídeos com componentes do próprio indivíduo, a partir das análises laboratoriais propostas.

Objetivos

Geral:

Analisar a eficácia do PRP (Plasma Rico em Plaquetas) na cicatrização de feridas cutâneas em equídeos.

Específicos:

Traçar perfil epidemiológico de dados dos animais atendidos no HOVET, com lesões de pele, para estabelecer uma relação causal;

Determinar se os protocolos adotados para obtenção de PRP, nos equinos, são eficazes para asininos e muarens.

Observar se há aceleração na reparação tecidual de lesões cutâneas em todas as espécies de equídeos quando se utiliza o PRP.

Metodologia

ANIMAIS E LOCAL DE ANÁLISES

Para este estudo, serão utilizados equídeos alocados ou atendidos no setor de grandes animais do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob os cuidados dos médicos veterinários residentes e corpo técnico. O material coletado será analisado no laboratório de Patologia Clínica situado no Hospital Veterinário e Laboratório Didático de Patologia Clínica e Farmacologia Geral da UFERSA.

Serão utilizados, ao todo, vinte animais (n=20) divididos, de acordo com a casuística de atendimento, e que possuam lesões cutâneas, entre as espécies equina, asinina e muar, para verificação da eficiência do PRP na melhor cicatrização.

EXAME FÍSICO

Os animais serão avaliados em local apropriado, utilizando brete de contenção. Serão analisados os valores de frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) com auxílio de estetoscópio, grau de desidratação por meio da avaliação da exsiccose, tempo de preenchimento capilar (TPC) por pressão na mucosa oral (gengiva) e temperatura retal (TR) utilizando termômetro clínico digital.

COLETA DE SANGUE

Os animais serão submetidos à venopunção jugular para obtenção de 30 ml de sangue total, por animal, que serão subdivididos em seis frascos, contendo citrato de sódio a 3,2%, para a centrifugação e obtenção do plasma rico em plaquetas. Os frascos serão identificados e encaminhados ao laboratório.

ANÁLISE LABORATORIAL

As amostras de sangue obtidas em tubos com citrato de sódio serão levadas à centrífuga para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

Dentre os diversos tipos de anticoagulantes o citrato de sódio foi o escolhido por preservar a integridade da membrana das plaquetas, sendo o mais adequado no preparo do PRP (Marx, R.E., 2000, Trindade-Suedam et al. 2007).

As amostras serão obtidas em tubos com citrato de sódio e serão submetidas à centrifugação, por dois momentos, e com forças de centrifugação relativa (FCR) diferentes. Com uma força de 120g no primeiro momento, e 240g no segundo momento, ambos com duração de 5 minutos, levando em consideração que esse foi o protocolo ideal para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) mais concentrado e com a menor concentração de leucócitos possível, a fim de evitar seus efeitos catabólicos in vivo, em se comparado a outros protocolos, segundo Carmona et. al 2007.

Ao fim da primeira centrifugação será descartado o botão leucocitário e as hemácias sedimentadas e, após cinco minutos de descanso ao abrigo da luz, o plasma remanescente será novamente centrifugado conforme a FCR e tempo estabelecidos no protocolo supracitado. Após a segunda centrifugação será descartado 50% do plasma da porção superior, ou seja, plasma pobre em plaquetas (PPP). Será realizada a quantificação em câmara hematómica de Neubauer utilizando o líquido de Brecher (Oxalato de amônio a 1%) como diluente para a contagem de plaquetas e líquido de Türk para a contagem de leucócitos (Thrall, M.A., 2007).

Após o preparo será realizada a aplicação do PRP, a cada três dias, sobre a lesão e estabelecido um protocolo padrão para tratamento dessas lesões, que se aplicará a todos os indivíduos. O acompanhamento e evolução da cicatrização serão devidamente registrados para posterior análise quanto à eficiência do tratamento com PRP.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, será utilizado o teste comparação de médias. Permitindo comparar resultados de tratamento dos animais entre si. Se ocorrer distribuição não-paramétrica dos dados, os mesmos serão analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis. A significância adotada será $p < 0,05$.

Referências

ANITUA, E.; ALKHRAISAT, M. H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. J of Control Rel, v. 157, p. 29-38, 2012.

BOSCH G., MOLEMAN M., BARNEVELD A., VAN WEEREN P.R. & VAN SCHIE H.T.M. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. Scandinavian journal of medicine & science in sports, v. 21, n. 4, p. 554-561, 2011.

CARMONA J.U., ARGÜELLES D., CLIMENT F. & PRADES M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. J. Equine Vet. Sci., 27(4):167-170, 2007.

CARMONA J.U., LÓPEZ C. & PRADES M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos.

Arch. Med. Vet. 41:175-179, 2009.
 DAHLGREN L.A., NIXON A.J. & BROWER-TOLAND B.D. Effect of betaaminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. Am. J. Vet. Res. 62(10):1557-1562, 2001.
 DE ROSSI R., COELHO A.C.A.O., MELLO G.S., FRAZÍLIO F.O., LEAL C.R.B., FACCO G.G. & BRUM K.B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. Acta Cirur. Bras. 24:276-281, 2009.
 MAIA L., SOUZA M.V., JUNIOR J.I.R., OLIVEIRA A.C., ALVES G.E.S., BENJAMIN L.A. & MOREIRA J.C.L. Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: Histologic Evaluation. J. Equine Vet. Sci. 29(8):618-626, 2009.
 MARX, R.E. Quantification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. J. Oral Maxillofac. Surg. 58:300-301, 2000.
 NIKOLIDAKIS D. & JANSES J.A. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. Tissue Eng. B, Rev. 14(3):249-258, 2008.
 TEXTOR J. A., TABLIN F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. Vet Surg. v.42, p. 499-510, 2013.
 THRALL M.A. Diagnóstico dos distúrbios hemorrágicos, p.170-187. In: Ibid. (Ed.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca, São Paulo, 2007.
 TRINDADE-SUEDAM I.K., LEITE F.R.M., MORAIS J.A.N.D., LEITE E.R.M., MARCANTONIO E. & LEITE A.A. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. J. Oral Implant. 33:334-339, 2007.

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
012.082.234-29	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO	DOCENTE	Não informada	Coordenador
064.206.033-90	VICTOR HUGO TEIXEIRA BATISTA	DISCENTE	Não informada	Membro

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021					202												
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Ab	
ATUALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA																							
ATENDIMENTO DE ANIMAIS COM LESÕES CUTÂNEAS NO HOVET																							
COLETA DE SANGUE E PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS PARA TRATAMENTO DAS LESÕES																							
ANÁLISE DOS DADOS																							
ELABORAÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS																							

AVALIAÇÕES DO PROJETO

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
15/05/2020 11:01	CADASTRO EM ANDAMENTO	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (<i>michelly</i>)
15/05/2020 11:15	CADASTRADO	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (<i>michelly</i>)
15/05/2020 11:15	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (<i>michelly</i>)
16/05/2020 17:25	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20031-2020

Título: PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE BOA CONSTRICTOR

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: parâmetros sanguíneos; hematologia; bioquímica; serpentes; semiárido

E-mail: michelly@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/07/2020 a 01/07/2023

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Patologia Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

Exames complementares são ferramentas que fazem parte da rotina de atendimento de diversos animais. A realização de exames para avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos é essencial na avaliação do estado fisiológico e determinação do diagnóstico de diversas patologias durante a rotina clínica de Jiboias (*Boa constrictor*). A presente pesquisa, justifica-se tendo em vista o aumento da demanda de atendimento desses animais no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, decorrente da inserção dessa espécie na vida doméstica como pets, bem como o grande trânsito de animais resgatados em clínicas veterinárias. Para interpretar corretamente os exames laboratoriais, deve-se ter conhecimento dos intervalos de referência previamente estabelecidos em indivíduos hígidos da espécie em questão. Assim, o objetivo principal deste projeto será determinar intervalos de referência hematológicos e bioquímicos em Jiboias (*Boa constrictor*) do semiárido nordestino.

Introdução/Justificativa

(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

Répteis são animais que não explicitam, de forma nítida, os sinais clínicos das enfermidades que os acometem, sendo uma condição protetiva ao táxon que muitas vezes dificulta o diagnóstico de patologias.

As análises hematológicas e bioquímicas são exames laboratoriais normalmente requisitados e acessíveis à maioria dos médicos veterinários. Com elas, é possível investigar várias causas possíveis de alterações fisiológicas e, com isso, elucidar um diagnóstico mais fidedigno. Se realizados adequadamente, os exames, e a correta interpretação dos resultados, podem fornecer informações sobre o estado geral do animal, bem como, nortear estratégias terapêuticas (Thrall, M.A., 2007). Portanto, os exames complementares são ferramentas para investigação do estado físico geral dos animais que permitem também a análise da evolução clínica quando estes são submetidos à alguma terapêutica.

A Jiboia (*Boa constrictor*) é um boídeo de grande porte que pode atingir até 4,2 m de comprimento (Henderson, et. al 1995; Pizzatto et. al, 2009) e possui dieta generalista, alimentando-se de lagartos, aves e mamíferos (Cunha & Nascimento, 1978; Quick et al., 2005; Pizzatto et al., 2009; Mesquita et al., 2013). Não possui restrições de habitat, ocupando domínios morfoclimáticos diversos, como florestas tropicais, campos abertos, regiões pantanosas e semiáridas, distribuindo-se ao longo de 66 graus de latitude, com registro máximo em altitude de 1.500m (Henderson et al. 1995; Boback, 2005; Henderson e Powell, 2007).

Se levarmos em consideração o número reduzido de pesquisas envolvendo aspectos fisiológicos de *Boa constrictor* (e.g. Rodrigues et al., 2015) e que a maioria dos estudos são baseados em pequenas amostras (e.g. Clark e Marx, 1960), é possível perceber que estudos direcionados para obter informações laboratoriais sanguíneas são escassos na literatura e se restringem a Jiboias mantidas em cativeiro (e.g. Schilligeeer, et. al 2011; Lima et al., 2012).

De acordo com (Campbell; 2006), esses parâmetros sofrem variações em função do estado nutricional, oscilação térmica e diversos outros fatores ambientais sendo necessário estabelecer esses perfis laboratoriais, utilizando animais de diferentes habitats, para que futuramente os diagnósticos sejam realizados com maior precisão.

Diante do exposto, o estabelecimento dessas referências acrescentarão vivências e conhecimentos relevantes à formação acadêmica de alunos de graduação, pós-graduação e residência em medicina veterinária, além de auxiliar no melhor atendimento e diagnóstico elaborados dos animais atendidos na região nordeste (domínio Caatinga), bem como pode, potencialmente, auxiliar e contribuir com outras pesquisas realizadas com a espécie.

Objetivos

Geral:

Determinar intervalos de referência hematológicos e bioquímicos em Jiboias (*Boa constrictor*) do Semiárido Nordestino.

Específicos:

Verificar a influência do sexo, idade ou habitat nos parâmetros hematológicos dos animais analisados.

Investigar a presença de hemoparasitas a partir da análise morfológica em esfregaços sanguíneos.

Metodologia

PROCEDÊNCIA E ANIMAIS

Para essa pesquisa serão utilizadas, trinta (n=30) serpentes da espécie *Boa constrictor*. Esses animais serão provenientes de vida livre, capturados durante busca em seu habitat natural (licença SISBIO #57169-1), resgatados da zona urbana ou atendidos no setor de animais silvestres do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

CONTENÇÃO, COLETA E ANÁLISE LABORATORIAL

As serpentes serão contidas manualmente e com auxílio de ganchos apropriados ao manejo da espécie, por pessoas treinadas, de forma a evitar acidentes, garantindo a segurança dos manipuladores e bem-estar do animal.

Será realizada uma única coleta sanguínea em cada serpente, pela punção das veias coccígeas caudais e palatinas. Serão coletadas amostras de sangue total, seguindo todas as recomendações de proporção corporal e limite para coleta de amostras dessa natureza, podendo esta ter um volume variável em função do tamanho do animal. O sangue coletado será colocado em tubos contendo heparina para a realização de exames hematológicos e bioquímicos. Um esfregaço, em lâmina para microscopia, será realizado no momento da coleta sem que a amostra tenha contato com o anticoagulante, imediatamente fixado e corado com corante rápido, a fim de preservar características morfológicas celulares.

Os parâmetros hematológicos de rotina serão determinados manualmente e a análise bioquímica do plasma para quantificação de proteína total, glicose, ácido úrico, aspartato aminotransferase, creatinquinase, cálcio e fósforo realizada por espectrofotometria semiautomática.

Durante a análise microscópica do esfregaço sanguíneo será realizada a pesquisa e registro de quaisquer alterações morfológicas, bem como, investigação sobre a ocorrência de hemoparasitas.

EXAME FÍSICO

Para minimizar variações laboratoriais, será realizado o exame físico, obtendo informações como peso, tamanho, sexo e escore corporal para garantir o estado de higidez de todos os animais desta pesquisa.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar a influência ontogenética sobre os parâmetros hematológicos, realizaremos Análises de Covariância Multivariadas (MANCOVA), tendo os parâmetros hematológicos como variáveis respostas, o tamanho corpóreo como variável preditora e o sexo como co-variável. As diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Referências

BOBACK, M. S. Natural History and Conservation of Island Boas (*Boa constrictor*) in Belize. *Copeia*: December 2005, Vol. 2005, No. 4, pp. 880-885, 2005.
CAMPBELL, T. W. Clinical pathology of Reptiles. In: MADER, D. R. (Ed.). *Reptile Medicine and Surgery*. Florida: Ed. Saunders Elsevier. p. 453-470, 2006.

CLARKE G.K., MARX, T.I. Heart rate of unanesthetized snakes by electrocardiography. *Copeia* 1960(3): 236-238, 1960.

CUNHA, O. R.; NASCIMENTO, F. P. Ofídios da Amazônia. X - As cobras da região leste do Pará. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*. 218p. Publicações Avulsas, 31, 1978.

HENDERSON, R.W.; MICUCCI, T.W.P.; PUORTO, G.; BOURGEOIS, R.W. Ecological correlates and patterns in the distribution of neotropical boines (serpentes: Boidae): a preliminary assessment. *Herpetological Natural History*, Victorville, 3(1): 15-27, 1995.

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20027-2020

Título: Atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro em camundongos

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: PRÓ-REITORIA DE PLANEJAMENTO (11.01.01)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: DPOC; fitoterápicos; aparelho respiratório

E-mail: moacir@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 15/06/2020 a 14/12/2023

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Clínica e Cirurgia Animal

Especialidade: Clínica Veterinária

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática milenar derivada das experiências do cotidiano que tiveram alguma aplicabilidade no tratamento das mais diversas moléstias em homens ou animais e foram assim transmitidas por meio das gerações, perpetuando-se na cultura popular (ARAUJO; LEMOS, 2015).

Algumas dessas plantas despertam interesse progressivo por parte da comunidade científica devido às atividades biológicas presentes em seus compostos orgânicos.

Neles são encontradas substâncias com potencial terapêutico, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, lignanas, entre outros, objetos de incessantes estudos, com o intuito de comprovar suas ações farmacológicas, sugerindo aplicações em situações que comprometem o estado de saúde (ARAUJO et al., 2008).

É o caso da *Cissampelos sympodialis* Eichl., uma espécie da flora brasileira, pertencente a família Menispermaceae, que é encontrada desde o Ceará até o norte de Minas Gerais, ocorrendo principalmente em áreas de clima semi-árido. Essa espécie é conhecida popularmente como "milona", "jarrinha", "orelha-de-onça" e "abuteira", cujas folhas e raízes são empregadas na medicina popular no tratamento de doenças do aparelho respiratório, reumatismo e artrites (PORTO, 2008; CAVALCANTI et al., 2013; DE SALES et al., 2018).

Estudos imunofarmacológicos com folhas de *C. sympodialis* demonstraram ação imunomoduladora, anti-inflamatória e broncodilatadora, com destaque para a warifiteína, um dos principais alcaloides presentes no extrato da *C. sympodialis*, que atua inibindo a produção de leucotrienos, fosfodiesterase e estimulando a interleucina-10, demonstrando seu grande potencial para o tratamento da asma, uma doença inflamatória crônica caracterizada por obstrução ao fluxo aéreo, geralmente reversível com o uso de broncodilatadores (VIEIRA et al., 2018), característica essa que a diferencia clinicamente da Doença Pulmonar Obstrutiva crônica (DPOC).

Causada principalmente pelo tabagismo a fisiopatologia da DPOC se caracteriza pela redução do fluxo de ar através das vias aéreas, não totalmente reversível, com alargamento anormal e significativo dos espaços alveolares, remodelamento do parênquima pulmonar e uma resposta inflamatória crônica com períodos de exacerbação. Essas alterações manifestam-se clinicamente por meio de dispneia, tosse crônica, produção de muco e sibilância (GOLD, 2017; MOURATO, 2018)

A DPOC é um grave problema de saúde pública, e uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, o que torna relevante a investigação da atividade biológica do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro, como potencial agente farmacológico que no futuro, pode apresentar uma aplicabilidade profilática e/ou terapêutica no tratamento de doenças do sistema respiratório associadas ao tabagismo como o enfisema pulmonar.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática milenar derivada das experiências do cotidiano que tiveram alguma aplicabilidade no tratamento das mais diversas moléstias em homens ou animais e foram assim transmitidas por meio das gerações, perpetuando-se na cultura popular (ARAUJO; LEMOS, 2015).

Algumas dessas plantas despertam interesse progressivo por parte da comunidade científica devido às atividades biológicas presentes em seus compostos orgânicos.

Neles são encontradas substâncias com potencial terapêutico, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, lignanas, entre outros, objetos de incessantes estudos, com o intuito de comprovar suas ações farmacológicas, sugerindo aplicações em situações que comprometem o estado de saúde (ARAUJO et al., 2008).

É o caso da *Cissampelos sympodialis* Eichl., uma espécie da flora brasileira, pertencente a família Menispermaceae, que é encontrada desde o Ceará até o norte de Minas Gerais, ocorrendo principalmente em áreas de clima semi-árido. Essa espécie é conhecida popularmente como "milona", "jarrinha", "orelha-de-onça" e "abuteira", cujas folhas e raízes são empregadas na medicina popular no tratamento de doenças do aparelho respiratório, reumatismo e artrites (PORTO, 2008; CAVALCANTI et al., 2013; DE SALES et al., 2018).

Estudos imunofarmacológicos com folhas de *C. sympodialis* demonstraram ação imunomoduladora, anti-inflamatória e broncodilatadora, com destaque para a warifiteína, um dos principais alcaloides presentes no extrato da *C. sympodialis*, que atua inibindo a produção de leucotrienos, fosfodiesterase e estimulando a interleucina-10, demonstrando seu grande potencial para o tratamento da asma, uma doença inflamatória crônica caracterizada por obstrução ao fluxo aéreo, geralmente reversível com o uso de broncodilatadores (VIEIRA et al., 2018), característica essa que a diferencia clinicamente da Doença Pulmonar Obstrutiva crônica (DPOC).

Causada principalmente pelo tabagismo a fisiopatologia da DPOC se caracteriza pela redução do fluxo de ar através das vias aéreas, não totalmente reversível, com alargamento anormal e significativo dos espaços alveolares, remodelamento do parênquima pulmonar e uma resposta inflamatória crônica com períodos de exacerbação. Essas alterações manifestam-se clinicamente por meio de dispneia, tosse crônica, produção de muco e sibilância (GOLD, 2017; MOURATO, 2018)

A DPOC é um grave problema de saúde pública, e uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, o que torna relevante a investigação da atividade biológica do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro, como potencial agente farmacológico que no futuro, pode apresentar uma aplicabilidade profilática e/ou terapêutica no tratamento de doenças do sistema respiratório associadas ao tabagismo como o enfisema pulmonar.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

Investigar a eficácia do extrato da *Cissampelos sympodialis* no remodelamento pulmonar em pulmões de camundongos expostos à fumaça do cigarro;

Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar aguda e crônica induzida pela exposição à fumaça do cigarro;

Caracterizar a atividade do extrato da *Cissampelos sympodialis* como modulador do desequilíbrio redox em pulmões de camundongos expostos a fumaça do cigarro;

Identificar as possíveis vias através das quais o extrato da *Cissampelos sympodialis* apresenta seus efeitos biológicos na inflamação pulmonar aguda e crônica induzidas pela fumaça do cigarro.

3. HIPÓTESES

3.1. O extrato da *Cissampelos sympodialis* possui atividade anti-inflamatória sobre pulmões de camundongos inflamados pela exposição à fumaça do cigarro.

3.2. O extrato da *Cissampelos sympodialis* possui atividade antioxidante sobre os pulmões de camundongos inflamados pela exposição à fumaça do cigarro.

3.3. O extrato da *Cissampelos sympodialis* é capaz de modular a sinalização para o remodelamento pulmonar a inflamação causada pela fumaça do cigarro

Metodologia

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Para execução deste projeto, folhas de *C. sympodialis* serão coletadas no horto do Centro de Biotecnologia Universidade Federal da Paraíba. A identificação botânica será feita por comparação com a exsiccata da espécie depositado no Herbário Prof Dr. Lauro Pires Xavier, em Agra 1456. As folhas serão secas a 40 ° C, em estufa e,

posteriormente, pulverizadas em um moinho de facas e armazenadas protegidas da luz e da umidade.

4.2. Preparo do extrato

Cinquenta gramas de folhas em pó serão extraídas com 100 ml de etanol: água (80:20, v / v) por maceração por 24 h. O extrato será filtrado e o filtrado será evaporado até à secura sob pressão reduzida a 40° C com um evaporador rotativo.

4.3. Animais

Serão utilizados 84 camundongos machos (C57BL/6) com oito semanas de idade, pesando entre 18-22 g. Os animais terão livre acesso à água e comida em um ambiente controlado entre 18 e 22°C e um ciclo claro/escuro (12/12 h). A pesquisa será conduzida conforme as normas de bem-estar animal vigentes de acordo com o CONCEA e com as normas de experimentação animal Lei 11.794, sendo previamente aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEUA).

4.4. Desenho experimental

Os procedimentos relativos à obtenção dos extratos vegetais serão realizados na Universidade Federal da Paraíba, enquanto aqueles relativos à avaliação do papel da Cissampelos sympodialis na inflamação pulmonar aguda (IPA) e na inflamação pulmonar crônica (enfisema pulmonar) induzidas por fumaça de cigarro, serão desenvolvidos no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA) do Departamento de Ciências Animais.

4.4.1. Estudo I - Modelo agudo

Para avaliar o efeito da Cissampelos sympodialis sobre a IPA, os animais serão expostos a uma mistura de ar-fumaça de doze cigarros/dia durante cinco dias, e tratados com Cissampelos sympodialis via inalatória nas doses de 1, 10 ou 100mg/mL (VIEIRA, 2013).

Para tanto, os animais serão agrupados da seguinte forma (n = 7 por grupo):

- Controle: exposto apenas ao ar ambiente e tratado com solução salina durante 5 dias;
- IFC: exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com solução salina durante 5 dias;
- IFC+1mg: exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com Cissampelos sympodialis (1 mg/mL) durante 5 dias;
- IFC+10mg: exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com Cissampelos sympodialis (10 mg/mL) durante 5 dias;
- IFC+100mg: exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com Cissampelos sympodialis (100 mg/mL) durante 5 dias;

4.4.2. Estudo II - Modelo crônico - Enfisema pulmonar

Com o objetivo de avaliar o efeito da Cissampelos sympodialis no enfisema pulmonar, inicialmente os animais serão expostos a uma mistura de ar-fumaça de doze cigarros/dia durante 60 dias e somente após o estabelecimento do enfisema pulmonar os animais serão tratados com Cissampelos sympodialis via inalatória nas doses de 10 ou 100mg/mL durante 60 dias adicionais.

Para este fim, os animais serão divididos cinco grupos (n = 7 por grupo):

- Controle: exposto apenas ao ar ambiente e tratado com solução salina durante 60 dias;
 - IFCR: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com solução salina;
 - IFCR+C. Sympodialis: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com Cissampelos sympodialis (dose a ser estabelecida pelo estudo agudo - IPA) durante 60 dias;
 - IFCR+Dexa: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com dexametasona (0,1 mg/mL) via inalatória durante 60 dias;
 - IFCR+NAC (600 mg/mL): exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com N-acetilcisteína (600 mg/mL) via oral durante 60 dias;
- Para avaliar a permanência do enfisema mesmo após 120 dias, dois grupos em paralelo serão avaliados quanto aos aspectos morfológicos e estereológicos.
- IFCR 60d: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e sacrificado no dia 61, sem passar por nenhuma forma de tratamento;
 - IFCR 120d: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e sacrificado no dia 121, sem passar por nenhuma forma de tratamento;

4.5. Exposição à fumaça do cigarro

A exposição à fumaça de cigarro seguirá o modelo descrito por Valença e Porto (2008). Para tanto, os animais serão colocados em uma câmara de inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura), que será alocada dentro de uma capela de exaustão. Os grupos serão expostos à mistura de ar-fumaça de cigarros comerciais (10 mg alcatrão, 0,8 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono) (MENEGALI et al., 2009; VALENÇA E PORTO, 2008) por dia de acordo com os protocolos descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

Para isso, um cigarro será encaixado na ponta de uma seringa plástica de 60 mL e, após aceso o êmbolo da seringa será puxado e a fumaça será tragada para o interior da seringa estabelecendo o jato de fumaça. Na sequência a fumaça contida na seringa será injetada na câmara de inalação através de um orifício. Os animais serão mantidos nessa condição de ar de fumo durante seis minutos/cigarro. Após esse tempo, a câmara será aberta pela remoção da sua parte superior e a fumaça será expelida pela ação de um exaustor. Assim permanecerão por um período de um minuto.

Esta exposição à fumaça do cigarro será repetida três vezes/dia, sendo quatro cigarros no período da manhã, quatro cigarros ao meio-dia e quatro cigarros ao fim da tarde, totalizando doze cigarros/dia para cada grupo, com no máximo 72 minutos de exposição à fumaça por dia.

4.7. Procedimentos experimentais

Vinte e quatro horas após o tempo estabelecido para cada modelo (5 dias para o Estudo I e 120 dias para o Estudo II) os animais serão eutanasiados para coleta do material biológico.

a) Lavado broncoalveolar

No Estudo I, imediatamente após a eutanásia os animais terão a traqueia canulada em sua porção ventral e os pulmões serão lavados com 1,5 mL de solução salina (3 x 0,5 mL) para coleta do lavado broncoalveolar (BAL). Ao final desse procedimento para todos os grupos os microtubos de centrifugação contendo o BAL serão centrifugados a 600 g durante 10 minutos e o sobrenadante será coletado e estocado em freezer (-20 °C) para posterior análise, enquanto a fração celular sedimentada será utilizada para dosagem de ROS.

b) Processamento tecidual

Após a coleta do BAL ou não (quando se trata do Estudo II) o tórax do animal será aberto por uma incisão ventral no sentido crânio-caudal e o ventrículo cardíaco direito será perfundido com solução salina visando à remoção de sangue contido nos vasos sanguíneos pulmonares. Na sequência, o pulmão esquerdo será removido e imediatamente transferido para solução fixadora de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4 °C, por até 72 horas para análise histológica. O pulmão direito será removido e armazenado em tubos devidamente identificados e mantidos em gelo picado e em seguida será homogeneizado (homogeneizador Nova técnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil). Para tal, parte desse fragmento será colocado em um potter contendo 1mL de tampão fosfato de potássio (KPE) com pH ajustado para 7,5. O homogeneizado será então centrifugado a 600 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante será coletado e o volume final ajustado para 1,5 mL com tampão KPE. Tais amostras serão armazenadas em freezer - 80° C para realização dos ensaios bioquímicos posteriormente. O outro fragmento do pulmão direito seguirá os mesmos padrões de homogeneização, entretanto, homogeneizado com tampão de lise (PBS com coquetel de inibidor de protease livre de EDTA (Sigma-Aldrich S8830) e Triton X100) para utilização nos ensaios de ELISA ou Western blotting.

c) Dosagem de proteína

A dosagem de proteína será realizada em amostras de homogeneizados pulmonares e no lavado broncoalveolar através do Método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras serão adicionadas à placa de 96 poços em duplicata e homogeneizada em solução de Bradford para reagir com o corante azul de brilhante de coomassie presente nessa solução e que se ligam às proteínas em meio ácido, gerando coloração azulada. Para dosagem serão utilizados 10 µL de BAL de cada amostra e 1 µL de homogeneizado. Em paralelo, uma curva padrão será produzida, utilizando diferentes concentrações de albumina tendo como ponto mais concentrado 1 mg/mL. Essa reação gera coloração azulada e será lida em leitor de Elisa a 595 nm. Os valores serão expressos em mg/mL.

d) Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Será utilizado um método que se baseia na reação do sal azul de nitro-tetrazólio (NBT) com as espécies reativas de oxigênio. Após centrifugação do BAL e coletado o sobrenadante, as células do centrifugado serão ressuspendidas em 100 µL de KPE e em seguida será adicionado 100 µL de NBT (0,1%) antes de incubá-las a 37 °C em estufa por 1h. Em seguida o pellet será lavado por 3 vezes em PBS e ressuspendido em solução de KOH 2M contendo DMSO (dimetilsulfóxido). Essa mistura será plaqueada em duplicata na placa de 96 poços e lida em leitor de Elisa a 630 nm. O resultado será expresso em µg de formazan/volume de células.

e) Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Homogeneizados pulmonares serão utilizados nesse ensaio baseando-se na metodologia descrita por Bannister e Calabrese (1987). A atividade enzimática da SOD será estimada por inibição da auto-oxidação da adrenalina. Para tanto, 1,2 ou 4 µL da amostra serão homogeneizadas em tampão glicina (50 mM, pH 10,2) e em seguida 2 µL de catalase (2,4 mg/mL) serão adicionados seguido de 4 µL de epinefrina (2 µM; com HCl), perfazendo um volume final para 200 µL. A mistura será homogeneizada em placa de 96 poços em monocata e lida a 480 nm durante 180 segundos com intervalos de 10 segundos. A atividade enzimática da SOD será expressa em U/mg de proteína.

f) Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase será mensurada em homogeneizados pulmonares segundo o método descrito por Aebi (1984). Para realização do ensaio, 3 µL de amostra do homogeneizado pulmonar será adicionado a placa de 96 poços de baixa absorbância em monocata. Em seguida serão adicionados 97 µL de um Mix (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,3 com peróxido de hidrogênio 30%) e homogeneizados. A mistura será imediatamente lida a 240 nm durante 60 segundos com intervalo de 30 segundos. A atividade enzimática da CAT será expressa em U/mg de proteína.

g) Atividade mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO também será mensurada em homogeneizado pulmonar. Para tanto, 100 µL da amostra será centrifugada com 900 µL de hexadeciltrimetilamonio bromídico (HTAB) 0,5% a 11.000 g por 15 minutos. Em seguida, 75 µL do sobrenadante será incubado com 5 µL de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) 20 mM durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, essa mistura será incubada com 50 µL de peróxido de hidrogênio (H2O2) 30% por 10 minutos também a 37 °C, seguido de adição de 125 µL de acetato de sódio (NaOAc) 0,5 M, pH 5,0. Então, o produto da reação será lido em leitor de Elisa a 630 nm. Os níveis de MPO serão expressos em U/mg de proteína.

h) Atividade da glutatona reduzida (GSH)

Níveis de glutatona reduzida (GSH) serão dosados pela sua reação com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenoico) (DTNB), na qual a taxa de produção de TNB é proporcional à concentração inicial de GSH na amostra.

Para essa análise alíquotas de homogeneizado pulmonar imediatamente após serem homogeneizadas em KPE serão tratadas com ácido sulfassalicílico na proporção de 1:1 e centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 10 µL do sobrenadante serão homogeneizados com 75 µL de tampão fosfato de potássio, seguido da adição de 6µL de DTNB, 6 µL de glutatona redutase e 6 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH), em placa de 96 poços. Essa mistura terá imediata leitura da absorbância que será mensurada a 412 nm durante 120 segundos com intervalos de 30 segundos.

i) Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Esse ensaio avalia o dano oxidativo através da geração de malondialdeído (MDA) usando o método descrito por Draper e colaboradores (1990). Homogeneizados pulmonares serão desproteinizados pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético 10% por amostra e centrifugado a 2.200 g durante 10 minutos. Em seguida, 200 µL do sobrenadante serão homogeneizados com 200 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%.

A mistura será aquecida durante 10 minutos a 100°C e em seguida resfriada em temperatura ambiente por 15 minutos. Após resfriadas, as amostras serão plaqueadas em placas de 96 poços em duplicata. Uma curva padrão será confeccionada utilizando TMP (0,625 a 100 µM) como padrão. O resultado da reação gera uma solução de cor rósea e lida a 532 nm em leitor de Elisa. O resultado será expresso em nMol/mg de proteína.

j) Dosagem de citocinas

A dosagem de TNF-α, IL-1β, IL-6, KC e TGF-β1 será realizada pelo método de ELISA utilizando o BAL ou o homogeneizado pulmonar. O ensaio seguirá instruções do fabricante (Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA). As placas serão pré-tratadas com adição do anticorpo de captura (100 µl) diluído em PBS e deixadas em temperatura ambiente "overnight". No dia seguinte, após três lavagens com tampão de lavagem (PBS+tween 20 0,05%) será realizado o bloqueio pela adição de 100 µl de PBS + BSA (albumina sérica bovina) 1% por 1h. Em seguida, mais três lavagens serão realizadas e então 100 µl de cada amostra de BAL ou homogeneizado pulmonar serão adicionadas aos poços em duplicata e assim permanecerão por 2 horas. Em seguida, mais três lavagens serão realizadas e então adicionado o anticorpo de detecção (100 µl) por mais 2h. Após esse tempo, três lavagens serão realizadas e será adicionado a avidina peroxidase (Sigma Aldrich, 1 mg/mL) a qual ficará incubada por 30 minutos, seguido de três lavagens. Após essa etapa o-fenilenodiaminadihidroclorato (OPD) será diluído em tampão citrato (1:9) e adicionado 100 µl por poço. Após a adição do OPD se aguarda até que a reação ocorra e uma cor amarelada seja observada nos poços. Após aproximadamente 30 minutos a reação será parada pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico (1N). Uma curva padrão com a proteína investigada será realizada com sete pontos de concentrações diferentes. Após a reação enzimática ser interrompida a placa será lida a 690 nm em leitor de microplacas. Os valores serão expressos em pg/mL ou em pg/mg de proteína.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105,p, 121-26, 1984.

ARAÚJO, J. L.; LEMOS, J. R. Estudo etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade de Curral Velho, Luís Correia, Piauí, Brasil. *Revista Biotemas*, v. 28, n. 2, p. 125-136, 2015. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2015v28n2p125>.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.032>.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, v.32, p. 279-312, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.

CAVALCANTI, A. C.; MELO, I. C. A. R.; MEDEIROS, A. F. D.; NEVES, M. V. M.; PEREIRA, A. N.; OLIVEIRA, E. J. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n. 3, p. 527-541, 2013.

DE SALES, I. R. P.; FORMIGA, R. D. O.; MACHADO, F. D. F.; NASCIMENTO, R. F.; PESSOA, M. M. B.; BARROS, M. E. F. X.; ... e Júnior, R. F. D. A. Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 222, p. 190-200, 2018.

DIÓGENES-BASTOS, V. P.; GOMES, A. S.; LIMA, F. J.B., BRITO, T. S.; SOARES, P. M. G.; PINHO, J. P. M.; SILVA, C. S.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H. L. P.; MAGALHÃES, P. J. C. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenge guinea pigs. *Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology*, v. 108, p. 34-9, 2011.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*, v.186, p. 421-431, 1990.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: 2017 report [Internet]. c2017 [citado 2018 jun 11]. Disponível em: <https://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosismanagement-prevention-copd/>

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining pluspolarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, v. 11, p. 447-55, 1979.

LILLIE, R. D.; FULLMER, H. M. *Histopathologic Technic and Practical*. Histochemistry. McGraw-Hill, 1976

MENEGALI, B. T.; NESI, R. T.; SOUZA, P. S.; SILVA, L. A.; SILVEIRA, P.C.; VALENÇA, S. S.; PINHO, R. A. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulmonary Pharmacology e Therapeutics*. v. 22, p. 567-73, 2009.

MOURATO, C.; BUDZAK, K.; ARAÚJO, P.; BARROS, R. Importância das diferenças na resposta ao broncodilatador entre a asma e a DPOC. *Salutis Scientia*, v.10, n.1, p. 23-31, 2018.

PORTO, N. M.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Pharmacobotanical study of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl., (Menispermaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 1, p. 102-107, 2008.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C., ABD EL-SALAM, M.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharmaceutical Biology*, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V.; LUCENA, M. F. A.; COSTA, J. G. M. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the caatinga area in the community of sitionazaré, milagres, ceará, Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.

VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*.v.34, p. 787-95, 2008.

VIEIRA, G. C.; DE LIMA, J. F.; DE FIGUEIREDO, R. C.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R., PIUVEZAM, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+ T Cells. *Phytotherapy Research*, v. 27, n. 6, p. 916-925, 2013.

VIEIRA, G. C.; GADELHA, F. A.; PEREIRA, R. F.; FERREIRA, L. K.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BOZZA, P. T.; PIUVEZAM, M. R. Warifiteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 28, n. 1, p. 50-56, 2018.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, v. 12, p. 131-37, 1963.

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
325.949.504-59	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	DOCENTE	30	Coordenador
913.071.983-68	ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA	DOCENTE	4	Membro
008.161.953-74	EMANUEL KENNEDY FEITOSA LIMA	DOCENTE	20	Vice-Coordenador
761.118.304-49	HUGO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ROCHA	EXTERNO	4	Membro
702.982.543-87	ALEXANDRE RODRIGUES SILVA	DOCENTE	4	Membro
035.979.594-31	CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA	DOCENTE	4	Membro
049.063.134-77	RAFAEL FERNANDES DE QUEIROZ NETO	DISCENTE	20	Membro

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20028-2020

Título: Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos (Pecari tajacu Linnaeus, 1758)

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: PRÓ-REITORIA DE PLANEJAMENTO (11.01.01)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: Embriões, Glicosaminoglicanos, Imunohistoquímica, Placenta, Catetos, Tuba uterina e Útero.

E-mail: moacir@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 15/06/2020 a 14/03/2024

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Clínica e Cirurgia Animal

Especialidade: Clínica Veterinária

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O Semiárido brasileiro ocupa uma parcela relevante da Região Nordeste do Brasil, onde as adversidades ambientais provocam sérias limitações no processo produtivo das populações, desse modo ações que ressaltem estrategicamente sua importância e o desenvolvimento de pesquisas que forneçam informações acerca de animais de produção, visando o desenvolvimento científico, tecnológico e sustentabilidade desse ambiente deve ser sempre objeto de ações públicas. Os catetos são animais silvestres cujo status junto a IUCN foi modificado recentemente graças sua criação em cativeiro no modelo semi extensivo, pois com essa ação foi possível aumentar o número de indivíduos em basicamente todas as regiões do País. Atento a estas questões e a importância que a espécie pode vir a ter para a produção animal, identificou-se que junto com nossas pesquisas outros pesquisadores têm desenvolvido pesquisas acerca de aspectos morfofuncionais e reprodutivos com a espécie, motivo que nos levou a optar por trabalhar com o sistema reprodutor feminino desses animais, considerando aspectos relativos a alterações na matriz extracelular, placentação e desenvolvimento embrionário, não descartando ao longo da realização do experimento, a oportunidade de obter dados macroscópicos importantes sobre cada estrutura reprodutiva, além de oportunamente descrever o desenvolvimento embrionário até os 60 dias de gestação. Para tanto, a presente proposta será executada considerando-se três etapas distintas, embora não dissociadas (Extração de glicosaminoglicanos, placentação e desenvolvimento embrionário). Os animais dos quais se pretende avaliar os glicosaminoglicanos em função das fases do ciclo estral serão submetidos à citologia vaginal diária e com base na fase do ciclo estral serão adotados procedimentos de coletas. Já para os animais em que buscar-se-á avaliar os glicosaminoglicanos em função das idades gestacionais, esses serão submetidos a protocolo de sincronização do cio e as coletas serão realizadas observando-se as fases de gestação. Nos dois procedimentos serão coletados fragmentos de vagina, cérvix, tuba uterina, útero, enquanto fragmentos de placenta e os embriões serão coletados apenas nas fêmeas prenhas. Quanto aos glicosaminoglicanos serão coletados fragmentos de vagina, cérvix, tuba uterina, útero e placenta destinados ao processamento para imunohistoquímica dos glicosaminoglicanos dos órgãos reprodutivos nas fases do ciclo estral e idades gestacionais. Além disto, serão processadas amostras destas mesmas estruturas para extração, identificação e caracterização dos polissacarídeos, conforme técnicas descritas no item referente à Metodologia. Já quanto à placentação serão coletados fragmentos da placenta e demais anexos fetais para análises sob microscopia de luz convencional e imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, posteriormente as análises macroscópicas de morfometria. Em relação ao desenvolvimento embrionário, após descrição morfológica e morfometria os mesmos serão processados com base em técnicas de microscopia luz convencional de modo que se possa descrever a organogênese em função das idades definida na metodologia. Com a execução da presente proposta espera-se fornecer subsídios importantes para utilização na clínica veterinária, para a biologia da conservação da espécie, formar recursos humanos em nível de graduação e de pós-graduação na área de medicina veterinária e, sobre tudo contribuir com informações acerca dos catetos (Pecari tajacu), úteis ao seu manejo zootécnico e de preservação, já que tem sido imbuídos esforços de órgãos governamentais e não governamentais visando à preservação da espécie e consequentemente melhorar o status de sobrevivência da população da mesma nos diferentes biomas brasileiros.

Introdução/Justificativa

(Incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

1. INTRODUÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO PRINCIPAL PROBLEMA A SER ABORDADO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CATETOS (Pecari tajacu)

A fauna silvestre brasileira é definida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente como espécies autóctone, migratória ou qualquer outra aquática ou não, que tenha todo ou parte de seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro ou em águas jurisdicionalmente pertencentes ao Brasil (BRASIL, 1967, Art. 1º). Dentre os integrantes dessa fauna encontra-se o Pecari Tajacu, espécie objeto da proposta de pesquisa largamente utilizado em pesquisas com reprodução e morfologia, a exemplo de outras espécies.

Os catetos são mamíferos Cetartiodactyla, ordem que reuni a antiga ordem dos cetáceos (Cetacea) e artiodátilos (Artiodactyla). Pertencem a família Tayassuidae se considerado o que descreve Grubb, (2005), quanto aos clados e são nativos das Américas, distribuindo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, conforme Altrichter et al., (2018).

Sobre o que se observa da espécie é possível destacar que a pele é coberta por pelos ásperos com tonalidade variando entre preto e branco que dão aos animais um aspecto de cor que varia entre preto e cinza. Os indivíduos possuem cabeça relativamente grande, com focinho curto e o pescoço é pouco evidente. A cauda é curta e os membros torácicos e pélvicos possuem quatro e três dígitos, respectivamente. Contudo, não são características preponderantes na identificação dos mesmos, uma faixa esbranquiçada que se estende do pescoço as bochechas e ainda a presença de uma glândula dorsal que secreta uma secreção pálida utilizada na demarcação dos indivíduos que compõem os grupos sociais.

Segundo Nowak e Paradiso (1983), os catetos são animais com peso variando entre 14 a 30kg, com membros delgados e a cabeça relativamente grande em relação ao

restante do corpo. Apresentam orelhas e olhos pequenos, nariz em forma de tromba, cauda curta e dentes caninos maxilares bem desenvolvidos e dirigidos para baixo e, que de acordo com (SOWLS, 1997) a presença de dimorfismo está associada a apenas a visualização do escroto nos machos, quando observados a curta distância. Nossa experiência com estes animais permite inferir ainda que as fêmeas possuem gestação que corresponde a um período entre 138 e 146 dias e com média de um a dois filhotes, mas que não é rara a parição de três filhotes, sendo que neste último caso um deles é rejeitado pela mãe (Grifos nossos). Do ponto de vista biológico os catetos são considerados indivíduos importantes ecologicamente, pois são onívoros e dentre os seus itens de dieta encontra-se o hábito de ingerir sementes, sendo em razão disto considerados dispersores de sementes, o que pode representar uma ameaça ao equilíbrio dos ecossistemas (WRIGHT; DUBER, 2001). Este aspecto tem levado a que alguns pesquisadores defendem a criação de animais silvestres em cativeiro como ferramenta para preservação do ambiente e das espécies (MIRANDA et al., 2010), evitando, desta forma, a caça predatória, o tráfico de animais silvestres e o desmatamento causado por outras atividades mais tradicionais, como a bovinocultura, além de servir como alternativa para a diversificação da produção e renda para produtores rurais (SANTOS et al., 2009). Também é importante considerar que, estes animais têm sido citados como a única fonte proteica de origem animal para muitas populações, ribeirinhas, indígenas e colonos da região amazônica segundo o que descreve Parry; Barlow; Peres (2009), o que reforça o entendimento de pesquisadores quanto a ser estimulada a criação de animais silvestres em cativeiro.

Assim, se considerado o porte, as características reprodutivas, os hábitos alimentares e comportamentais e a qualidade da carne, pesquisas envolvendo manejo reprodutivo, manejo alimentar e aspectos morfofuncionais visando o desenvolvimento de modelos sustentáveis de criação em cativeiro e modelos para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas poderiam potencializar a criação de catetos de forma sustentável, que motiva o desenvolvimento de nossa proposta.

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos (GAGs), são polímeros de cadeia longa, não flexíveis e não ramificadas, que do ponto de vista funcional são importantes, especialmente, por serem componentes da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos, entre outros. Os mesmos participam de grande número de funções celulares, a exemplo da formação de géis, formação de filtros de moléculas, estabelecimento de gradientes moleculares e estimulação de processos de migração e desopressão celular através da matriz extracelular. Estas macromoléculas estão presentes em diversos tecidos, podendo ser encontrados livres ou ligados a determinadas proteínas presente nos tecidos sob a forma de proteoglicanos. Existem diversos tipos de GAGs, tais como condroitin sulfato, heparan sulfato, que juntamente com o ácido hialurônico compõem a superfície das celulares, membranas basais e epitélios, a placenta, além do plasma sanguíneo e urina. Estas pertencem ao grupo dos heteropolissacarídeos, estão distribuídas amplamente formando uma estrutura básica de unidades dissacarídicas repetitivas com hexosamina, ligadas a molécula de açúcar não-nitrogenada, ácido hialurônico e em determinados casos apresenta-se ligado a outros compostos, normalmente ligados covalentemente a proteínas formando os proteoglicanos, com exceção das moléculas de ácido hialurônico, no qual, encontram-se livres nos tecidos. Os GAGs estão presentes em todas as células de animais, mas apresentando diferenças estruturais dependendo do tecido e ou organismo de origem (KJELLEN e LINDAHL, 1991; BERTO et al., 2001). Sua presença na matriz extracelular resulta principalmente do metabolismo celular e tem como finalidade organizar estruturalmente essa matriz, a quem confere elasticidade, tônus e adesão.

Bellaiche et al., (1998); Lin et al., (2000) e Kitagawa et al., (2007) descrevem que os glicosaminoglicanos são polissacarídeos lineares integrantes da matriz extracelular de todas as células de metazoários com relação importante no processo de desenvolvimento embrionário dos invertebrados e vertebrados que se forem modificados podem promover defeitos graves no embrião ou mesmo leva-lo a morte.

Sun et al., (2016) considera que a matriz extracelular tem um papel central na mediação da comunicação entre células animais e, que esta comunicação se dar por meio de um conjunto de mecanismos e fatores sobre os quais interagem os glicosaminoglicanos, particularmente o sulfato de heparan, o dermatan sulfato e o condroitin sulfato.

A matriz extracelular tecidual é um complexo material constituído por proteínas fibrosas e substância fundamental representada pelos glicosaminoglicanos secretados pelas células. Essa matriz extracelular modula comportamentos celulares e dentre eles propiciam os processos de adesão entre células. (BEACHLEY et al., 2018).

Cubas et al., (2010) estudando a concentração de glicosaminoglicanos no útero de ratos ovário ectomizados e tratados com progesterona e estradiol, descreve ao quantificar o ácido hialurônico, sulfato de condroitin e o sulfato de dermatan que as concentrações dessas substâncias variam entre os grupos em função do tipo de hormônio com os quais os animais foram tratados, indicando que as concentrações de glicosaminoglicanos tendem a diminuir caso as estruturas hormonais deixem de desempenhar sua função adequadamente.

As alterações na concentração desses Gags mostram-se tão significativos que a matriz extracelular passa a ser modificado ao ponto de permitir que se observe alterações na estrutura tecidual.

Prydz (2015) descreve que os glicosaminoglicanos podem ser proteínas glicosiladas de importância biológica a nível de superfície celulares, na matriz extracelular e na circulação, que se formam em vias secretoras dos animais. No caso dos proteoglicanos, durante o transporte, um grupo protéico liga-se a uma ao mais cadeias do glicosaminoglicano formando os proteoglicanos, que passam a denominados sulfato de heparan, sulfato de condroitina, dermatan sulfato ou ácido hialurônico em função do local e tipo de grupo protéico ligante.

Torres et al., (2018) descreve que os glicosaminoglicanos podem regular a proliferação celular, a invasão e migração celular e ainda a angiogênese em micro ambientes propício a metástase tumoral. Além deste citam que os glicosaminoglicanos são componentes da matriz extracelular que compreendem uma complexa classe de compostos sulfatados representados pelo condroitin, dermatan e heparan, entre outros. Sabe-se que hormônios estrogênicos e progesterona atuam sobre estas moléculas glicanas promovendo alterações na matriz extracelular seja nível de ovário, útero, cérvix ou vagina durante as diferentes etapas reprodutivas, pois as variações nas concentrações glicosaminoglicanos afetem diretamente a organização da matriz extracelular e consequentemente a estrutura tecidual.

Sob o efeito dos hormônios os glicosaminoglicanos atuam sobre diversas funções biológicas como adesão, migração e proliferação celular, secreção de proteínas e expressão gênica, atuando como organizadores celulares e na maturação de tecidos especializados (DIETRICH, 1984). Estes também contribuem para a estrutura e as propriedades de permeabilidade do tecido conjuntivo, agem como guia para enzimas e fatores de crescimento tanto na matriz quanto na superfície das células, estando direta ou indiretamente envolvidos com a formação de tumores, metástases, reações imunológicas, desenvolvimento folicular, infertilidade e angiogênese e, ainda ao adequado desenvolvimento fetal (ESKO, 1991; CECHOWSKA-PASKO et al., 1996).

Por sua vez, o crescimento vascular que acompanha o desenvolvimento da placenta provoca um aumento no fluxo sanguíneo neste órgão, resulta dessas substâncias e, representam fator determinante para o desenvolvimento fetal (REYNOLDS; REDMER, 1995; REYNOLDS; REDMER, 2001). Há de se ressaltar que níveis elevados de GAGs ao final da gestação, acarretam uma vascularização irregular e por conseguinte um desenvolvimento fetal anômalo. Além desta situação, o aumento da resistência vascular uterina ou um fluxo sanguíneo uterino diminuído podem ser usados como apontadores de gestações de risco, estando associados com o retardo no crescimento fetal (TRÜDINGER et al., 1985; NORTH et al., 1994; HARRINGTON et al., 1997).

Acredita-se que os GAGs desempenhem papéis essenciais na determinação de algumas propriedades físico-químicas do tecido placentário, especialmente por atuarem no transporte de substâncias entre as circulações materna e fetal. Entretanto, o

envolvimento dos GAGs neste processo ainda não foram completamente elucidados, sendo necessário estudos em outras espécies que permitam elucidar a ação dos hormônios esteróides (estrogênio e progesterona) sobre os componentes da matriz extracelular ao longo do ciclo estral e assim melhor compreender algumas patologias do trato reprodutivo e anormalidades no desenvolvimento fetal.

No tecido uterino, é possível observar que a presença dos glicosaminoglicanos longo do ciclo estral nos animais, onde durante o estro, pode-se aumento na concentração destas moléculas, pois o aumento em sua concentração auxilia na capacitação espermática. E a sua concentração também apresenta concentração diferente ao longo de gestação, isto pode estar relacionado à suas funções fisiológicas no tecido. Estas moléculas promovem o reconhecimento celular, migração, adesão, proliferação e diferenciação das células, estando diretamente ligadas com o aparecimento de tumores, reações imunológicas, assim como no desenvolvimento folicular e na infertilidade (DIETRICH, 1984; NASCIUTTI et al., 2006).

No estro, observa-se aumento dos GAGs sulfatados, em especial, do sulfato de condroitin e do sulfato de dermatan isso auxiliando na capacitação espermática, além disso esse aumento durante esta fase promove o desenvolvimento do tecido uterino, além de auxiliar no processo de implantação embrionária. Enquanto na fase progesterônica verifica-se um ligeiro aumento do sulfato de heparan. (GOMES et al., 2007; CUBAS et al., 2010). No entanto, durante a gestação, observa-se uma diminuição nos níveis de ácido hialurônico, mas observando o seu aumento significativo momentos que antecede o parto (GOLICHOWSKI; KING e MASCARO, 1980; EL MARADNY et al., 1997).

Segundo (LEE et al., 1973; GOMES et al., 2007; FELDNER JÚNIOR et al., 2008), os principais fatores associados ao surgimento de tumores estavam relacionados somente a alterações nas próprias células. Contudo com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, passou-se a analisar a relação entre as células e o seu meio, a matriz extracelular e em função disto, vários autores voltaram sua atenção para alguns componentes dessa matriz, em especial os glicosaminoglicanos (GAGs). A matriz extracelular é composta por um conjunto de agregados, constituídos por uma rede molecular contendo colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e GAGs, responsáveis por manter as células associadas, possibilitando a organização dos tecidos e a sobrevivência das células (KRESSE; SCHÖNHER, 2001; HEINEGARD, 2009). Muitas evidências indicam que os proteoglicanos e GAGs, bem como as proteínas de adesão apresentam um notável efeito sobre o comportamento celular, influenciando em sua proliferação e diferenciação.

Kjellen e Lindahl (1991) e Merle et al., (1999) descrevem que estes compostos são componentes da superfície celular e da matriz extracelular, interagindo com colágenos, laminina e a fibronectina, além de determinados fatores de crescimento. A interação dos componentes da matriz extracelular com os proteoglicanos podem afetar o

crescimento celular, adesão e a diferenciação das células, no qual as suas funções são dependentes da cadeia lateral dos glicosaminoglicanos. Esta capacidade de ligação das proteínas com os GAGs reflete no funcionamento do organismo, tais como a ligação de enzimas com a lipoproteína lipase, proteínas extracelulares, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular

Os glicosaminoglicanos (GAGs), que estão presentes em diversos tecidos, podendo ser encontrados livres ou ligados a determinadas proteínas presente nos tecidos sob a forma de proteoglicanos. Existem diversos tipos de GAGs, tais como, ácido hialurônico, heparina, sulfato de condroitin, dentre outras, essas moléculas estão presente em cartilagem, superfícies celulares, membranas basais e epitélios, placenta, além do plasma sanguíneo e urina. Estas pertencem ao grupo dos heteropolissacarídeos, estão distribuídas amplamente formando uma estrutura básica de unidades dissacarídicas repetitivas com hexosamina, ligadas a molécula de açúcar não nitrogenada, ácido hialurônico e em determinados casos apresenta-se ligado a galactose.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar em catetos o perfil de GAGs sulfatados na vagina, cérvix, útero, tuba uterina e ovários nas diferentes fases do ciclo estral e da gestação, bem como identificar e quantificá-los na placenta aos 15, 30, 45 e 60 dias da prenhez e ainda o desenvolvimento embrionário, nestes mesmos dias de gestação, a fim de poder inferir sobre sua importância dessas substâncias nos eventos fisiológicos destes órgãos e verificar a possibilidade do uso dessas macromoléculas como indicadores da gestação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever macroscopicamente a placenta de catetos na fase inicial da gestação;
- Estabelecer relações peso e comprimento entre feto/placenta na fase inicial da gestação;
- Descrever microscopicamente placenta de catetos confrontando com dados nossos já publicados, uma vez que as idades de gestação eram estimadas, com base em diferentes técnicas de microscopia;
- Descrever a placenta e anexos fetais de catetos aos 15, 30, 45 e 60 dias da gestação;
- Descrever o desenvolvimento embrionário de catetos aos 15, 30, 45 e 60 dias da gestação;
- Definir o tempo de implantação embrionária;
- Estabelecer o perfil de progesterona e estrógenos ao longo do ciclo estral e gestação;
- Purificar, quantificar, identificar e analisar a distribuição de glicosaminoglicanos no sistema reprodutor e anexos fetais de catetos durante o ciclo estral e gestação;

Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os animais a serem utilizados para realização do experimento envolvendo o perfil dos glicosaminoglicanos durante o ciclo estral e gestação de catetos e ainda placentação e desenvolvimento embrionário, serão adquiridos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Os animais serão mantidos em recintos de 2,5x10m. Serão utilizados 20 catetos fêmeas, adultas com idade variando de 10 a 18 meses, sendo utilizadas quatro fêmeas por cada fase do ciclo estral e 16 fêmeas gestantes, com os seguintes dias de gestação: 15, 30, 45 e 60, sendo quatro fêmeas para cada idade gestacional. Adicionalmente serão avaliadas mais seis fêmeas com finalidade de descrever o processo de implantação, que totaliza 26 animais. Ressalta-se que o projeto tem a duração de quatro anos para ser executado. As fêmeas serão colocadas em baias numa relação (1Fêmea:1macho), a fim de que sejam fecundadas. Para isto, serão instaladas duas câmeras por baias para gravação das ações diárias dos animais com o fim de identificarmos os dias de cópula, sendo que serão trabalhadas quatro fêmeas por vez.

Os animais receberão água a vontade (*ad libitum*) e serão alimentados com ração concentrada para suínos, volumoso formado de capim Pangola (*Digitaria decumbens*) ou capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) triturados em forrageira e ocasionalmente frutas da época disponíveis na Universidade.

Sobre a disponibilização dos animais é importante destacar que o CEMAS/UFERSA possui número de animais considerável que pode ser utilizado no experimento sem comprometer o plantel de animais, aspecto já entendido pelo ICMBio e Comissão de Ética no Uso de Animais, quando da autorização e aprovação de nossos experimentos.

4.2 COLETA E DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL

O protocolo de sincronização do estro será através da utilização de esponjas intravaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Progespon, Sytex, Argentina) por 7 dias, sendo que 24 h antes da remoção das esponjas, serão

aplicados prostaglandina F2alfa (Sincrocio, Ourofino, SP), na dose de 250 mcg/Animal (1ml/animal/dose única), por via intramuscular e eCG (Folligon, MSD), na dose de 500 mcg /Animal (1 ml/animal/dose única), por via intramuscular. A detecção do estro será observada de 12/12 horas durante 2 dias. As fêmeas serão agrupadas junto com o macho a cada 12 horas, sendo três coberturas acompanhadas visualmente. Ocorrendo a cobertura o dia — "um" da gestação será considerado o dia seguinte ao da cópula. As gestações serão confirmadas mediante exame de ultrassonografia transretal (240 Parus, Pie Medical®) através da visualização dos primeiros parâmetros gestacionais, como a vesícula embrionária.

4.3 DOSAGEM HORMONAL

Para determinação das concentrações séricas de progesterona e estrógenos, serão colhidas amostras de sangue por venopunção da veia cefálica. Serão colhidos 5ml de sangue de cada animal com agulhas hipodérmicas 0,8mm x25mm em tubos de ensaio de vidro, sem anticoagulante. As amostras serão em seguida submetidas à centrifugação por 15 minutos. Com a obtenção do soro, o mesmo será congelado com duplicata a -20°C.

As concentrações hormonais serão determinadas pelo método de radioimunoensaio em fase sólida onde serão utilizados kits comerciais (COATACOUNT®, DiagnosticProducts Corporation, Los Angeles, CA, USA), utilizando-se metodologia descrita por Peixoto (2016).

4.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO

Os animais serão submetidos ao protocolo anestésico. Para tanto, serão submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 8 horas. Posteriormente será realizada a medicação pré-anestésica (MPA) mediante administração de xilazina a 1% (dose - 0,1 mg.kg-1), por via IM, após 5 minutos, será realizado a indução anestésica com administração de cetamina a 10% (dose - 2,0 mg.kg-1), por via IV, e, depois de 10 minutos, procederá a manutenção anestésica inalatória com utilização de isoflurano a volume de 3% até que seja observado o momento anestésico-cirúrgico correspondente ao estágio III e plano II. Em seguida, terá início o protocolo cirúrgico, com o animal em decúbito dorsal, tricotomia da região abdominal e antisepsia ampla com utilização de iodo povidine, logo após, será realizado uma incisão longitudinal mediana préretroumbilical na pele, tecido subcutâneo e peritônio (três planos) até a identificação do útero gravídico, onde será realizado a ovariosterectomia total contendo os embriões/fetos e seus anexos. Feito isto, será realizado o fechamento dos três planos, com utilização de fio de nylon. Após cada procedimento, os cuidados pós-operatórios constarão de limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e aplicação de organnact prata spray a cada 24 horas até a completa cicatrização, além da administração de penicilina G procaína a 5.000.000 UI (dose - 20.000 UI.kg-1) a cada 24 horas durante 10 dias, por via IM e flunixinina meglumina a 50 mg.ml-1 (dose - 2,2 mg.kg-1) a cada 24 horas durante 3 dias, por via IM. As cirurgias serão realizadas no Hospital Veterinário (HOVET) da UFRSA.

4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Para a análise macroscópica serão utilizadas 16 fêmeas sendo que as coletas serão distribuídas da seguinte maneira: 4 fêmeas aos 15 dias de gestação; 4 fêmeas aos 30 dias de gestação; 4 fêmeas aos 45 dias de gestação e 4 fêmeas aos 60 dias de gestação. O material coletado será analisado no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Sendo assim, após a realização da ovariosterectomia, o útero será incisado e após exposição do conjunto de anexos embrionários e embrião, será realizada a caracterização macroscópica das membranas fetais, placenta, cordão umbilical e o embrião, útero, ovários, entre outros.

Na sequência, serão determinados os comprimentos do embrião e do cordão umbilical e o diâmetro dos placentomas, assim como o peso dos embriões e dos anexos fetais. Com isto serão obtidas as seguintes relações: - Peso fetal (g)/ peso dos anexos fetais (g); - Peso do embrião (g)/comprimento do cordão umbilical (cm); - Peso do embrião (g)/comprimento do embrião (cm).

Com o auxílio de fita métrica metálica graduada será obtido o comprimento do feto e do cordão umbilical. Utilizando-se uma balança digital, será determinado o peso do embrião/feto e da placenta. Serão obtidas também as medidas de comprimento do feto (Oliveira, 2003).

Com os dados de mensuração e pesagem, serão obtidas as seguintes relações:

- a) Peso fetal (g)/peso da placenta (g) determinada como sendo o quociente entre o peso fetal em gramas e o peso da placenta em grama.
- b) Peso fetal (g)/comprimento do cordão umbilical (cm) como sendo o quociente entre o peso do feto em gramas e o comprimento do cordão umbilical em centímetros.
- c) Peso fetal (g)/comprimento do feto (cm) dividindo-se o peso do feto em gramas pelo comprimento do feto em centímetros.

Além disso, os embriões serão fixados em solução de formaldeído tamponado a 10% e serão realizadas as seguintes mensurações dos embriões: CR (crown-rump), comprimento total, cefálico, cefalocaudal; cauda; diâmetro biparietal, diâmetro do olho; comprimento do olho; orelha; dos membros torácicos e pélvicos; da tibia; do rádio-ulna; das unhas do membro torácico e pélvico; largura das unhas do membro torácico e pélvico; comprimento dos dentes incisivos superiores e inferiores, perímetro torácico e perímetro abdominal, expressas em mm. Todas as medidas serão expressas por meio de média e desvio padrão.

Os dados das mensurações da placenta, cordão umbilical e do embrião serão submetidos a testes estatísticos não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Mann-Whitney) e regressão linear e análise correlação, visando a identificar o comportamento destas variáveis. Para isto, será considerada a existência de diferenças significativas entre as variáveis testadas quando o grau de significância for menor que 5% ($p < 0,05$).

Depois de realizadas a caracterização estrutural externa e as mensurações do embrião, o mesmo será dissecado e a macroscopia de sua organogênese analisada e descrita nas diferentes idades gestacionais. Para aqueles menores poderá ser realizada apenas a microscopia.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para este fim, serão coletados fragmentos de cerca de 1cm das placentas, cordão umbilical, membranas fetais a partir de 16 fêmeas distribuídas igualmente em quatro idades gestacionais 15, 30, 45 e 60 dias de gestação. Estes fragmentos serão fixados solução de paraformaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4. Do mesmo modo serão coletados fragmentos dos diferentes órgãos e estruturas dos embriões para análise microscópica da organogênese e de sua organização tecidual nas mesmas idades gestacionais, visto que o período de organogênese está compreendido dentro do intervalo gestacional estudado (SINOWATZ, 2010).

Após a fixação, o material será lavado em água e então submetido à desidratação em bateria de banhos de imersão de uma hora de álcool em concentração crescente a partir do álcool 70% até a chegada ao álcool absoluto no qual serão realizadas três trocas. Feita a desidratação o material será diafanizado por banhos de imersão em dois xilóis durante uma hora para na sequência realizar o processo de parafinização, onde os fragmentos serão colocados em duas parafinas a 60°C, permanecendo "over night", no primeiro, e por uma hora, no segundo. Em seguida será realizado o emblocamento do material. Obtidos os blocos, estes passarão por microtomia (LEICA RM 2065), fazendo-se cortes de 5 a 7µm de espessura, que serão levados à esfufa a 55°C. Finalmente, as

lâminas serão submetidas à coloração pela técnica de hematoxilinaeosina (HE), tricrômio de Gomori, Picrossírius, Ácido periódico de schiff (PAS) e Sudan black. Após montadas e analisadas, aquelas mais representativas serão então, selecionadas para fotomicrografia por meio de câmera (Leica ICC50 HD) acoplada a microscópio. No entanto, as amostras coradas pela técnica de picrossírius serão analisadas por meio de microscópio de luz polarizada necessário para a execução deste projeto de pesquisa. Estas técnicas seguirão preferencialmente a metodologia descrita por Tolosa et al., (2003)

Para identificação dos GAGs in locu, vistos a luz da microscopia, as lâminas

serão submetidas aos métodos de coloração por Alcian Blue (pH 1,0) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para os estudos de microvascularização será realizada injeção de resina Mercocry CL – 2R (Vilene, Tokyo, Japan) azul ou vermelho. Depois de completada a polimerização da resina injetada, o material será imerso em solução de hidróxido de sódio, variando entre 10% e 40%, deixados em estufa sob temperatura de 60°C, até completa corrosão, sendo, porém, lavadas periodicamente para substituição do hidróxido.

Completada a corrosão, os moldes vasculares serão lavados com água destilada e em seguida colocados em estufa a 37°C para secagem. Posteriormente serão incluídos em solução de gelatina incolor a 20%, e levados à geladeira para garantir maior resistência ao molde. Posteriormente, serão novamente imersos em solução de hidróxido de sódio para retirada da gelatina, levados a estufa para secagem, em seguida montagem em bases metálicas e metalização com ouro (EMITECH K550). Por fim, o material será analisado em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP). Neste procedimento será utilizada a metodologia adaptada por Oliveira (2003).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Serão obtidos fragmentos com cerca de 0,5mm²

de regiões de interesse e imersos

em solução de glutaraldeído a 2,5%, tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 por 72h. Na sequência o material será lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 por três vezes, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Concluída a pós-fixação, os fragmentos serão imersos em acetato de uranila a 3%, "over night" para que então sejam submetidos à desidratação em álcool a 50%, 70%, 90% por dez minutos cada e em álcool absoluto.

Após desidratados os fragmentos serão lavados em óxido de propileno por dez minutos e infiltrados em resina Spurr. Para este fim, os mesmos serão imersos em mistura de óxido de propileno e resina 1:1 durante uma hora; resina pura durante 12 horas; resina pura durante 2 horas e finalmente em resina pura para confecção dos blocos em estufa a 60°C por três dias, até completa polimerização.

Obtidos os blocos, serão feitos cortes semifinos com 0,4 µm em ultramicrótomo (LEICA ULTRACUT R), corando-se com azul de toluidina 1% e analisando-os em microscópio de luz. Identificadas as regiões de interesse, serão feitos cortes com 0,07 µm, coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2% em citrato de chumbo a 0,5%. Por fim, o material será analisado e eletrofotomicrografado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100-CXII).

Neste procedimento também será utilizada a metodologia adaptada por Oliveira (2003).

4.10 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS GAGs

a) Extração do glicosaminoglicanos

Para análise dos glicosaminoglicanos, fragmentos dos órgãos genitais (5-10g), e do tecido placentário serão coletados, picotados e colocados em frascos de 15mL, contendo acetona, sendo realizado uma troca a cada 24 horas durante três dias consecutivos, para remoção dos lipídios (Delipidação).

Após finalizado o processo de delipidação, as amostras serão pesadas em

balança de precisão (BEL M214 Ai) de modo a separar frações para cada órgão. Para a tuba uterina, será pesado 50mg e para os demais órgãos reprodutivos 1g, sendo estas frações colocadas separadamente em microtubos de 2 mL (Eppendorf) e identificados. Posteriormente, será adicionado a cada frasco prozima (4 mg/mL) em tampão TRISHCl, 0,05 M pH 8,0 com NaCl 0,15 M, na proporção de 1 mg de pó para 20 µL de tampão, incubado em temperatura de 60°C durante 24 a 48 horas. Em seguida, será adicionado ácido tricloroacético 90%, numa proporção de 10% do volume inicial d

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTRICHTER, M.; TABER, A.; NOSS, A.; MAFFEI, L.; CAMPOS, J. *Catagonus wagneri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Cambridge, 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T4015A72587993.en>. Disponível em: Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/4015/72587993>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- BEACHLEY, V.; MA, G.; PAPADIMITRIOU, C.; MATT, G.; CORVELLI, M. ELISSEFF1, J. Extracellular matrix particle-glycosaminoglycan composite hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Biomedical Materials*. v.106A, n. 1.149, p. 147 - 159, 2018.
- BELLAICHE Y, THE I, PERRIMON N. Toutvelu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* n. 394, p. 85 - 88, 1998.
- BERTO, A. G. A. Galactosaminoglycans from normal miometrium and leiomyoma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, p.633-637, 2001.
- BOLINA, C.D.S.; REGINATO, G. D. S.; WATANABE, II-SEI.; OLIVEIRA, M. F.; ALMEIDA, S. R. Y.; CIENA, A. P. Morphologic Characteristics of the Submandibular Salivary Gland of the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). *Journal of Morphological Sciences*, v. 35, p. 116-121, 2018.
- BORGES, A. A.; LIRA, G. P.O.; NASCIMENTO, L. E.; QUEIROZ NETA, L. B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Influence of Cryopreservation Solution on the In Vitro Culture of Skin Tissues Derived from Collared Peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Biopreservation and Biobanking*, v. 16, p. 77-1, 2017.
- BORGES, A. A.; SANTOS, M.V.; QUEIROZ NETA, L. B.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; Pereira, A.F. In vitro maturation of collared peccary (*Pecari tajacu*) oocytes after different incubation times. *Pesquisa Veterinária Brasileira (ONLINE)*, v. 38, p. 1863-1868, 2018.
- BRASIL. Lei nº 5.197/1967, de 03 de janeiro de 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. *Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF*, p. 177, 03 janeiro. 2002.
- CECHOWSKA-PASKO, M.; PALKA, J. BANKOWSKI, E. Decreased in glycosaminoglycans content in the skin of diabetic rats: the role of IGI-I, IGF-binding proteins and proteolytic activity. *Mol. Cell. Bio. Chem.*, v.154, p.1-8, 1996.
- CHEN, C. P.; S. C. CHANG; YANG, W. C. V. High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestational diabetes mellitus and in cultured trophoblasts. *Placenta*, v.28, n.2-3, p.97-106, 2007.
- Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758
-
- CUBAS, J. J. M. SIMÕES, R.S. OLIVEIRA-FILHO, R.M. SIMÕES, M.J. BARACAT, E.C. SOARES-JUNIOR, J.M et al. Glycosaminoglycan Distribution in the Rat Uterine Cervix During the Estrous Cycle. *Clinics*, v.65, n.7, p.703-708, 2010.
- DA SILVA, S. S. B.; LE PENDU, Y.; OHASHI, O. M.; OBA, E.; ALBUQUERQUE, N. I.; GARCIA, A. R.; MAYOR, P.; DE ARAUJO, G., D. A. Sexual behavior of *Pecari tajacu* (*Cetartiodactyla: Tayassuidae*) during periovulatory and early gestation periods. *Behavioural Processes (Print)*, v. 131, p. 68-73, 2016.
- DE ANDRADE, R. S.; MONTEIRO, F. O. B.; EL BIZRI, H. R.; PANTOJA, L.; BODMER, R.; VALSECCHI, J.; MAYOR, P. Embryonic and fetal development of the white-lipped peccary (*Tayassu pecari*). *Theriogenology*, v. 119, p. 163-174, 2018.
- DE QUEIROZ NETA, L. B.; LIRA, G. P. O.; BORGES, A. A.; SANTOS, M. V. O.; SILVA, M. B.; DE OLIVEIRA, L. R. M.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. F. Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. ANIMAL (ONLINE)*, v. 54, p. 486-495, 2018.
- DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates

from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparin sulfate. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.343, p.34-44, 1974.

DIETRICH, C. P.; A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.17, p.5-15, 1984.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EL MARADNY, E. KANAYAMA, N, KOBAYASHI, H, HOSSAIN, B, KHATUN, S, LIPING, S, KOBAYASHI, T, TERAQ, T. The role of hyaluronic acid as a mediator and regulator of cervical ripening. *Human Reproduction*, v.12, p.1080-1088, 1997.

ESKO, J. D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.3, p.805-806, 1991.

FELDNER JÚNIOR, P. C.; KOBAYASHI, E. Y.; SARTORI, M. G. F.; NADER, H. B.; BARACAT, E. C.; GIRÃO, M. J. B. C. Avaliação dos glicosaminoglicanos do tecido periuretral de pacientes com e sem prolapso. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.54, n.2, p.173-177, 2008.

FOSANG, A. J. HANDLEY, C.J. SANTER, V. LOWTHER, D.A. THORBURN, G.D. Pregnancy-Related Changes in the Connective Tissue of the Ovine Cervix. *Biology of Reproduction*, v.30, p.1223-1235, 1984.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.*, v.242, p.27-33, 1997.

Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos Pecari tajacu Linnaeus, 1758

GOLICHOWSKI, A. M.; KING, S. R.; MASCARO, K. Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans. *Biochemical Journal*, v.192, p.1-8, 1980.

GOMES, R. C. T.; SIMÕES, R. S.; SOARES JÚNIOR, J. M.; NADER, H. B.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C. Perfil de glicosaminoglicanos sulfatados no útero de camundongas durante o ciclo estral. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.53, n.3, p.261-266, 2007.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds.) *Mammal Species of the World, Third Edition*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.: 637-722, 2005.

HALME, J., WOESSNER, J. F. Effect of progesterone on collagen breakdown and tissue collagenolytic activity in the involuting rat uterus. *Journal of Endocrinology*, v.66, n.3, p. 357-362, 1975.

HARRINGTON, K.; CARPENTER, R. G; GOLDFRAD, C.; CAMPBELL, S. Transvaginal ultrasound of the uteroplacental circulation in the early prediction of preeclampsia and intrauterine growth retardation. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.104, n.6, p.674-681, 1997.

HEINEGARD, D. Proteoglycans and more from molecules to biology. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.90, p.575-586, 2009.

JOKIMAA, V., INKI P., KUJARI H., HIRVONEN, O., EKHOLM, E., ANTTILA L. Expression of syndecan-1 in human placenta and decidua. *Placenta*, v.19, n.2-3, p.157-163, 1998.

KAWAKAMI, E., ARAI, T., OISHI, I., HORI, T., TSUTSUI T. Induction of Dog Sperm Capacitation by Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Amounts of Oviductal and Uterine Fluids in Bitches. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.62, n.1, p. 65-68, 2000.

KIRN-SAFRAN, C.B.; D'SOUZA, S. S.; CARSON, D. D. Proteoglicanos de sulfato de heparan e suas proteínas de ligação na implantação e placentação embrionária. *Semin Cell Dev Biol.* v. 19, n. 2, p. 187 - 93, 2008.

KITAGAWA H, IZUMIKAWA T, MIZUGUCHI S, DEJIMA K, NOMURA KH, EGUSA N, TANIGUCHI F, TAMURA J, GENGYO-ANDO K, MITANI S, NOMURA K, SUGAHARA K. Expression of rib-1, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes, is indispensable for heparan sulfate synthesis and embryonic morphogenesis. *Journal Biology Chemistry*. n. 282, p. 8533 - 8544, 2007.

KJELLEN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. *Annual Review of Biochemistry*, v.60, p. 443-475, 1991.

KRESSE, H; SCHÖNHER, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell Physiol.*, v.189, p.266-274, 2001.

Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos Pecari tajacu Linnaeus, 1758

LEE, T.Y.; JAMIESON, A. M.; SCHAFER, I. A. Change in the composition and structure of glycosaminoglycans in the human placenta during development. *Pediat. Res.*, v.7, p.965-977, 1973.

LEE, C. N.; AX, R. L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *Journal of Dairy Science.*, v.67, n.9. p. 2006-2009, 1984.

LIN X, WEI G, SHI Z, DRYER L, ESKO JD, WELLS DE, MATZUK MM. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Development Biology*. N. 224, p. 299 - 311, 2000.

MAHMOUD, A.I.; PARRISH, J.J. Oviductal fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Molecular Reproduction and Development*, v.43, p. 554-560, 1996.

MAIA, K.M.; Souza, A.L.P.; SILVA, A. M.; SOUZA-JR, J.B.F.; COSTA, L.L.M.; BRANDÃO, F.Z.; Oliveira, M.F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A.R. Environmental effects on collared peccaries (Pecari tajacu) serum testosterone, testicular morphology, and semen quality in the Caatinga biome. *Theriogenology*, v. 126, p. 286-294, 2019.

MAYOR, P.; DA SILVA, G. P.; ANDRADE, R. S. DE; MONTEIRO, F. O. B.; EL BIZRI, H. R. Embryonic and fetal development of the collared peccary (Pecari tajacu). *Animal Reproduction Science*, v. 208, p. 106123, 2019.

MCNUTT, T. ROGOWSKI, L., VASOLATOS-YOUNKEN, R. KILIAN. G. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 33, p. 313-323, 1992.

MERLE, B., DURUSSEL, L., DELMAS, P.D, CLÉZARDIN, P. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.75, p.538-546, 1999.

MIRANDA; R. J. S; DIAS, R. S.; GOMES, A. P.; ROSSI, G. F. A viabilidade econômica da criação de caititus (Tayassutajacu): um estudo de caso. In: 48º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2010, Campo Grande. Resumos... Campo Grande: SOBER, 2010.

MIRANDA-MOURA, M.T.M.; OLIVEIRA, G.B.; PEIXOTO, G.C.X.; PESSOA, J.M.; PAPA, P. C.; MAIA, M.S.; MOURA, C.E.B.; OLIVEIRA, M.F. Morphology and vascularization of the corpus luteum of peccaries (Pecari tajacu, Linnaeus, 1758) throughout the estrous cycle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ONLINE)*, v. 68, p. 87-96, 2016.

NASCIUTTI, L.E. et al. Distribution of condroitin sulfate in human endometrium. *Micron*, v.37, n.6, p.544-550, 2006.

Glicosaminoglicanos nos eventos reprodutivos de catetos Pecari tajacu Linnaeus, 1758

NORTH, R. A.; FERRIER, C.; LONG, D.; TOWNEND, K.; KINCAID-SMITH, P. Uterine artery doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. *Obstetrics and Gynecology*, New York, 83(3): 378-386, 1994.

NOWAK, R.M, PARADISO, J.L. Walker's Mammals of the World. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, I: i-xlvi+ 1-568+ xlvi-xli and 2: i-x+ 569-1362+ xi-xxv, illustrated, 1983.

OLIVEIRA, M. F. Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied 1820. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 193. 2013.

Atividade	2020					2021															
	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jai	
ELABORAÇÃO DE RESUMOS ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO EM VENTOS E ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS ESPECIALIZADOS																					
DEFESA DE TESE DOUTORADO VINCULADO AO SUBPROJETO II																					
ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DE DIA DE CÓPULA CONFORME ESPECIFICA EM METODOLOGIA																					
COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM DE HORMÔNIOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO																					
COLETA DE EMBRIÕES PRÉIMPLANTACIONAIS E DE TECIDOS REPRODUTORES PARA ESTUDO DE PERFIL DE GAGS NESTA ETAPA																					
PROCESSAMENTO DE EMBRIÕES																					
ELABORAÇÃO DE RESUMOS ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO EM VENTOS E ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS ESPECIALIZADOS																					
ELABORAÇÃO DE RELATÓRIO E ENCAMINHAMENTO AO CNPQ																					

AVALIAÇÕES DO PROJETO

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
14/05/2020 21:28	CADASTRO EM ANDAMENTO	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA (<i>moacir</i>)
14/05/2020 22:53	CADASTRADO	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA (<i>moacir</i>)
14/05/2020 22:53	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA (<i>moacir</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20025-2020

Código Antigo: 59625-900

Título: Morfometria do leitão ao nascimento e sua relação com o desmame

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: índice de massa corporal, índice de massa ponderal, relação superfície e massa, lactação, suinocultura

E-mail: rennan.moreira@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/08/2020 a 31/07/2021

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Zootecnia

Sub-Área: Nutrição e Alimentação Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O avanço genético em porcas hiperprolíficas tem-se como resultado aumento significativo do número de leitões nascidos por partos, resultando em menor peso médio ao nascimento e, consequentemente, maior variabilidade de peso desses leitões. Vários autores relacionam a mortalidade a diversos fatores, incluindo o baixo peso médio ao nascer, como um dos principais. Entretanto, a ocorrência de óbitos pode também ser uma causa dos diferentes desempenhos apresentados pelos leitões, pois a qualidade da leitegada está associada não somente ao peso do leitão, como também à sua uniformidade. O objetivo do estudo será avaliar o desempenho de leitões lactentes em função de suas características morfométricas. O experimento será conduzido com 30 matrizes suínas de linhagens comerciais hiperprolíficas de dois a seis partos, em estágio de lactação. Um dia após o parto e ao desmame, os leitões serão identificados, analisados quanto à morfometria e pesados. Serão mensurados os índices de massa corporal e índice ponderal e relação superfície e massa de todos os leitões a partir do comprimento e do peso ao nascer. Para ajuste de modelo que descreva o peso de leitão ao desmame será proposta a utilização de modelos de regressão linear múltipla.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

Os avanços genéticos em porcas hiperprolíficas, tem-se como resultado aumento significativo do número de leitões nascidos por partos, resultando em menor peso médio ao nascimento e, consequentemente, maior variabilidade de peso desses leitões, impactando diretamente na taxa de mortalidade na fase de maternidade (Pinheiro e Dallanora, 2014).

A mortalidade de leitões no período de amamentação é fator preponderante que limita o desempenho das granjas podendo atingir altos índices, variando de 11,5% a 18,6%, onde a alta taxa de mortalidade se concentra nos primeiros sete dias de vida dos leitões, sendo este um dos fatores que pré-dispõe à redução econômica na produção (Aires et al., 2014).

Vários autores relacionam a mortalidade a diversos fatores, incluindo o baixo peso médio ao nascer, como um dos principais. Entretanto, a ocorrência de óbitos pode também ser uma causa dos diferentes desempenhos apresentados pelos leitões, pois a qualidade da leitegada está associada não somente ao peso do leitão, como também à sua uniformidade. Nesse caso, diferenças morfológicas entre animais na mesma faixa de pesos, podem apresentar desempenhos distintos de acordo com sua morfometria. Logo, além da importância do peso do leitão ao nascimento, características morfológicas quanto a conformação corporal, índice de massa corporal, índice ponderal (Baxter et al., 2008, 2009) e a relação superfície/massa são indicadores avaliativos para desempenho positivo dos leitões nas fases sucessivas, podendo ser usados para identificar precocemente quais animais estarão abaixo da média e, potencialmente, não econômicos (Huting, et al., 2018).

A morfometria dos leitões está diretamente ligada à sua capacidade de termorregulação resultando, em grande impacto, na viabilidade. De acordo com Herpin et al. (2002), leitões mais leves possuem maior superfície corporal em relação ao seu peso, sendo, portanto, mais propensos a hipotermia. Porém, existem leitões com peso semelhante, mas com tamanho de superfície corporal diferente, segundo Hales et al. (2013). Para Ferreira (2001), os leitões de menor peso corporal são afetados com maior frequência, devido a maior superfície de exposição em relação à sua massa corporal. Para tanto, a morfometria dos suínos, durante a fase de aleitamento, tem relação direta com sua capacidade em regular a temperatura corporal, refletindo em habilidade de sobrevivência até o desmame.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o desempenho de leitões lactentes em função de suas características morfométricas.

Objetivos específicos

Avaliar o desempenho de leitões lactentes em função do índice de massa corporal.

Avaliar o desempenho de leitões lactentes em função do índice de massa ponderal.

Avaliar o desempenho de leitões lactentes em função da relação superfície e massa.

Metodologia

Animais e instalações

O experimento será conduzido com 30 matrizes suínas de linhagens comerciais hiperprolíficas (TN70 e DB90) de dois a seis partos, em estágio de lactação, em granja comercial localizada no município de Croatá de São Gonçalo do Amarante, CE.

A transferência das matrizes do galpão de gestação para diferentes galpões de maternidade será realizada aos 105 dias de gestação. As instalações da gestação são providas de gaiolas individuais com piso compacto e as instalações da maternidade são constituídas por piso parcialmente ripado e escamoteador para aquecimento dos leitões.

Parâmetros avaliados

Após o parto, as leitegadas serão equalizadas pelo número de 14 leitões, um dia após o parto. O corte e cura do umbigo serão realizados logo após o nascimento, o corte de dentes e cauda será realizado ao terceiro dia após o parto. A castração dos leitões será realizada ao sétimo dia de vida.

Um dia após o parto e ao desmame, os leitões serão identificados, analisados quanto à morfometria e pesados. As pesagens serão realizadas em cada leitão da leitegada, com uso de balança digital de três casas decimais.

No primeiro dia após o parto e aos 20 dias de idade, os leitões serão desmamados e, mensuradas as medidas morfométricas: longitudinal, torácica e inguinal por meio de fita métrica. Os índices de massa corporal (IMC) e índice ponderal (PI) de todos os leitões serão calculados a partir do comprimento e do peso ao nascer, usando nas seguintes equações, sugeridas por Amdt et al. (2013):

Índice de massa corpora= peso do leitão (kg) / [comprimento do leitão (m)²]

Índice ponderal = peso do leitão(kg) / [comprimento do leitão (m)³]

Para verificação do comprimento longitudinal, a medição será realizada a partir da porção medial do crânio na altura da base da orelha até a primeira vértebra coccígea; o comprimento torácico será medido do perímetro por trás dos membros anteriores e o comprimento inguinal será o perímetro envolto dos membros posteriores. Além disso, com os pesos, na pós-equalização e no desmame, será calculado o ganho de peso diário (GPD) dos leitões, com base na seguinte equação:

$GPD = (\text{peso ao desmame (kg)} - \text{peso ao nascimento(kg)}) / (\text{intervalo de dias da pesagem (dias)})$

A relação entre a superfície e a massa será calculada utilizando-se as equações propostas por Meeh (Brody, Comfort, e Mathews, 1928):

$S = K \times W^{(2/3)}$

Em que:

S: área em dm²;

K: 0,07;

W: peso corporal em kg.

Relação superfície/massa = superfície corporal do leitão cm² / peso do leitão (kg)

Análises estatísticas

Para ajuste de modelo que descreva o peso de leitão ao desmame será proposta a utilização de modelos de regressão linear múltipla, considerando como variáveis explicativas as medidas de comprimentos e peso do leitão ao nascer. Para analisar a variabilidade total dos dados serão propostas técnicas de estatísticas multivariadas, tais como a obtenção de correlogramas e análises de componentes principais (PCA). Todas as análises estatísticas serão realizadas no software R.

Referências

AMDI, C., KROGH, U., FLUMMER, C., OKSBJERG, N., HANSEN, C. F., e THEIL, P. K. (2013). Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum. *Journal of Animal Science*, 91(12), 5605–5613. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6824>.

AIRES, J. F.; METZ, M.; BIRCK, L. J.; HERMANN, A. I.; OLIVEIRA, L. de: Causas de mortalidade de leitões até o desmame em granja comercial na região noroeste do Rio Grande do Sul. UNIJUI, 2014.

BAXTER, E. M., JARVIS, S., D'EATH, R. B., ROSS, D. W., ROBSON, S. K., FARISH, M., ... Edwards, S. A. (2008). Investigating the behavioural and physiological indicators of neonatal survival in pigs. *Theriogenology*, 69(6), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.007>

BRODY, S., COMFORT, J. E., e MATHEWS, J. S. (1928). Further investigations on surface area with special reference to its significance in energy metabolism. *Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull.*, 115.

FERREIRA, R.A. Avaliação da redução da proteína bruta da ração com suplementação de aminoácidos para suínos dos 15 aos 60 kg mantidos em diferentes ambientes térmicos. 2001. 67 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2001.

HALES, J., MOUSTSEN, V. A., NIELSEN, M. B. F., e HANSEN, C. F. (2013). Individual physical characteristics of neonatal piglets affect preweaning survival of piglets born in a noncrated system. *Journal of Animal Science*, 91(10), 4991–5003. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5740>

HERPIN P., DAMON M. e LE DIVIDICH J. 2002. Development of thermoregulation and neonatal survival in pigs. *Livestock Production Science*. 78: 25–45.

HUTING, A. M. S., SAKKAS, P., WELLOCK, I., ALMOND, K., e KYRIAZAKIS, I. (2018). Once small always small? To what extent morphometric characteristics and post-weaning starter regime affect pig lifetime growth performance. *Porcine Health Management*, 4(1), 21–35. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0098-1>

PINHEIRO, R.; DALLANORA, D.: Produção de suínos: teoria e prática. Coordenação editorial Associação Brasileira de Criadores de Suínos; Coordenação Técnica Integral Soluções em Produção Animal. Brasília, DF, capítulo 15.1, p. 625-627, 2014.

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
046.101.733-44	AMANDA MEDEIROS ARAUJO DE OLIVEIRA	EXTERNO	Não informada	Professor/Pesquisador Voluntário
029.725.953-94	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA	DOCENTE	Não informada	Coordenador
078.065.477-38	MARCELLE SANTANA DE ARAUJO	DOCENTE	Não informada	Vice-Coordenador
603.298.623-32	PEDRO HENRIQUE DA SILVA FIDELIS	DISCENTE	Não informada	Membro
701.957.714-86	LIGIA VANESSA LEANDRO GOMES	DISCENTE	Não informada	Membro
018.093.124-50	GLEYSON ARAUJO DOS SANTOS	DISCENTE	Não informada	Membro
612.746.063-81	LUCAS MELO E SILVA	DISCENTE	Não informada	Membro

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021					
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

RELATÓRIO FINAL

AVALIAÇÕES DO PROJETO

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
14/05/2020 13:46	CADASTRO EM ANDAMENTO	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA (<i>rennanmoreira</i>)
14/05/2020 16:38	CADASTRADO	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA (<i>rennanmoreira</i>)
14/05/2020 16:39	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA (<i>rennanmoreira</i>)
19/05/2020 15:45	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PID20026-2020

Código Antigo: 59625-900

Título: Suplementação aminoacídica na ração de fêmeas suínas em lactação sobre o desempenho da leitegada

Tipo: INTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: NÃO

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: lisina, metionina, treonina, leitão, suinocultura

E-mail: rennan.moreira@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/08/2020 a 31/07/2021

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Zootecnia

Sub-Área: Nutrição e Alimentação Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O avanço genético, na suinocultura, possibilitou a criação de animais de alta produtividade. As linhas maternas concentram-se em alta prolificidade e com isso tornam-se mais exigentes do ponto de vista nutricional. A realização de pesquisas que visam estabelecer exigências nutricionais atualizadas, tendo como base, o conhecimento das funções dos aminoácidos e seus efeitos na lactação, objetivando suprir nutricionalmente a fêmea para que não haja comprometimento de sua condição corporal bem como no desenvolvimento dos leitões. Objetivo no trabalho será avaliar a suplementação lisina, treonina e metionina na ração de lactação de fêmeas suínas sobre o desempenho da leitegada. O experimento será conduzido com 30 matrizes suínas lactantes de linhagens comerciais de dois a seis partos. O delineamento experimental utilizado será o inteiramente casualizado, sendo a matriz e sua leitegada, a unidade experimental. Os tratamentos são os seguintes: T1) Ração de lactação controle (sem blend aminoacídico) e; T2) Ração de lactação com suplementação do blend que consiste em 39, 165 e 130 g/kg, respectivamente de metionina, lisina e treonina. As matrizes serão pesadas após o parto e ao desmame para verificar a mobilização corporal. A produção de leite das matrizes será estimada. A mensuração do consumo será diária. No 2º, 7º, 12º, 16º e 21º dias de lactação serão coletados parâmetros fisiológicos de cada matriz, às 7h, 13h e 16h. Os parâmetros coletados serão: frequência respiratória, temperatura de paleta, temperatura de pernil, temperatura de nuca, temperatura de orelha e temperatura retal. Aos 20 dias de lactação será mensurado índice de massa corporal, índice de massa ponderal e relação superfície e massa das fêmeas. Um dia após o parto e ao desmame, os leitões de cada leitegada serão pesados e verificados suas medidas morfométricas: comprimento longitudinal, torácico e abdominal. Serão calculados o ganho de peso diário dos leitões, o índice de massa corporal, índice de massa ponderal e a superfície e a massa. Os dados serão submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% de probabilidade para verificar a normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal serão comparados pelo teste F da análise de variância. Os dados que não apresentarem distribuição normal, quando possível, serão normalizados pelo procedimento PROC RANK do pacote estatístico do SAS (9.3) e os dados não normalizados serão comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. A variação dos pesos dos leitões, após a equalização e ao desmame, será comparada pela estratificação percentual do peso.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

O avanço genético, na suinocultura, possibilitou a criação de animais de alta produtividade, tendo em vista a crescente demanda por carne suína por parte do mercado consumidor (ABPA, 2019). Foram desenvolvidas linhas sintéticas, que resultam do cruzamento de reprodutores de diferentes raças. Esse cruzamento forma novo genótipo e possui como um dos objetivos a criação de animais com capacidade genética superior para uma ou mais características de importância econômica, tais como, alta produção de leite, baixo consumo voluntário, menores reservas de gordura e rápida deposição de tecido magro (FERREIRA et al., 2014).

As linhas maternas concentram-se em alta prolificidade e com isso tornam-se mais exigentes, uma vez que, por exemplo, precisam produzir mais leite para suprir a demanda do elevado número de leitões. Portanto, é evidente que para minimizar os problemas causados pela hiperprolificidade, como variabilidade de peso dos leitões e nascimento de animais com baixo peso corporal, faz-se necessária a implantação do padrão de consumo adequado a fim de atender as necessidades nutricionais da fêmea.

Dessa forma, a realização de pesquisas que visam estabelecer exigências nutricionais atualizadas e precisas, tendo como base, o conhecimento das funções dos aminoácidos e seus efeitos na lactação, objetivando suprir nutricionalmente a fêmea para que não haja comprometimento do consumo, assim como mobilização das reservas corporais para produção de leite e, por consequência, garantir boas condições para o próximo ciclo reprodutivo (NUNES et al., 2006).

A lisina destaca-se, não somente pelo seu papel na qualidade nutricional do leite, proteína e gordura, mas também pela sua relação com a mobilização de reservas corporais da fêmea, além de ser considerado o primeiro aminoácido limitante (NUNES et al., 2006). A treonina, além de ser importante para síntese de proteínas, atua também na digestão, uma vez que é precursor de enzimas digestivas, e, por este motivo, e da mesma forma que a lisina, está associada à mobilização de reservas corporais, podendo influenciar na perda de peso da fêmea (GREINER et al., 2019). A metionina, além de desempenhar importante papel na síntese de proteínas, da mesma forma que a treonina, também influencia o sistema antioxidante devido ao seu metabólito glutatona, que é gerado pelo metabolismo do enxofre (LI, Hao, et al, 2014).

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a suplementação lisina, treonina e metionina na ração de lactação de fêmeas suínas sobre o desempenho da leitegada.

Objetivos específicos

Acompanhar o desempenho dos leitões nascidos de fêmeas que receberam suplementação de aminoácidos lisina, treonina e metionina;

Avaliar o efeito da suplementação do blend sobre a condição corporal de fêmeas em fase de lactação;

Determinar parâmetros fisiológicos das fêmeas alimentadas com ração contendo suplementação de blend de aminoácidos: lisina, treonina e metionina.

Metodologia

Os procedimentos a serem realizados durante o experimento serão submetidos e executados seguindo as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Animais e instalações

O experimento será conduzido com 30 matrizes suínas de linhagens comerciais hiperprolíficas (TN70 e DB90) de dois a seis partos, em estágio de lactação, em granja comercial localizada no município de Croatá de São Gonçalo do Amarante, estado do Ceará.

A transferência das matrizes do galpão de gestação para os galpões de maternidade ocorrerá aos 105 dias de gestação. As instalações da gestação são providas de gaiolas individuais com piso compacto e as instalações da maternidade são constituídas de piso parcialmente ripado e escamoteador para aquecimento dos leitões.

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado será o inteiramente casualizado, sendo a matriz e sua leitegada, a unidade experimental. As matrizes serão distribuídas, por tratamento, mantendo-se a mesma quantidade de animais, com base genética, pesos e ordens de parto.

Os tratamentos são os seguintes: T1) Ração de lactação controle (sem blend aminoacídico) e; T2) Ração de lactação com suplementação do blend que consiste em 39, 165 e 130 g/kg, respectivamente de metionina, lisina e treonina. A suplementação do blend de aminoácidos ocorrerá na forma on top. A suplementação do blend de aminoácidos será calculada com base na quantidade de ração consumida pela matriz, no dia seguinte, na proporção de 0,1 kg para 10,0 kg.

A ração de lactação utilizada será semelhante à adotada pela granja. Ao serem alocadas no galpão de maternidade, as matrizes receberão 2,0 kg de ração de lactação até o parto. No primeiro dia após o parto, será ofertado 1,0 kg; no segundo dia, 2,0 kg; no terceiro dia, 3,0 kg; no quarto dia, 4,0 kg; no quinto dia, 5,0 kg; no sexto dia, 6,0 kg; no sétimo dia, 7,0 kg; e no oitavo dia até o desmame, 8,0 kg. Durante o período lactacional, as fêmeas receberão água à vontade e o arraçoamento será dividido em cinco tratos por dia, às 3h, 6h, 10h, 16h e 22h.

Parâmetros avaliados nas matrizes

As matrizes serão pesadas após o parto e ao desmame para verificar a mobilização corporal (em quilos e em porcentagem). A produção de leite das matrizes será estimada com o uso da equação sugerida por Noblet e Etienne (1989): produção de leite (kg/dia) = $\{(0,718 \times \text{ganho de peso diário do leitão (g)} - 4,9) \times \text{número de}$

leitões} / 0,19.

Com base na quantidade de ração ofertada, as sobras serão pesadas diariamente, para fazer a mensuração do consumo.

No 2º, 7º, 12º, 16º e 21º dias de lactação serão coletados parâmetros fisiológicos de cada matriz. A coleta será realizada às 7h, 13h e 16h. Os parâmetros coletados serão: frequência respiratória (FR), temperatura de paleta (TPA), temperatura de pernil (TPE), temperatura de nuca (TN), temperatura de orelha (TO) e temperatura retal (TR). A FR será obtida por meio da observação dos movimentos do flanco da matriz, verificando a contração dos músculos intercostais durante 15 segundos, e o resultado será multiplicado por quatro. A TPA, TPE, TN e TO serão obtidos com auxílio de termômetro infravermelho, com 20 cm de distância e ângulo perpendicular sobre a região considerada. A TR será obtida por meio de termômetro digital, na porção superior do reto.

Ao 20º dia do período lactacional, serão coletadas as medidas morfométricas, como comprimento corporal, perímetro torácico e perímetro abdominal das matrizes por meio de fita métrica. Juliatto (2016) definiu comprimento corporal como sendo distância entre a base do occipital até a vértebra coccígea; perímetro torácico como o perímetro do tórax, medido na região de declividade da cernelha e; perímetro abdominal como sendo perímetro do abdômen, medido na região da tuberosidade ilíaca. Com base nas informações coletadas, será possível obtenção do índice de massa corporal e índice de massa ponderal, pelo uso das equações sugeridas por Amdi et al. (2013):

Índice de massa corporal = peso do animal (kg) / [comprimento do animal (m)²]

Índice ponderal = peso do animal (kg) / [comprimento do animal (m)³]

A relação entre a superfície e a massa será calculada utilizando as mesmas equações propostas por Meeh (Brody, Comfort e Mathews, 1928):

S= K x W^{2/3}

Em que:

S: área em dm²;

k: 0,07,

W: peso corporal em kg

Relação superfície/massa = superfície corporal cm² / peso do animal (kg)

Parâmetros avaliados nos leitões

As leitegadas serão equalizadas pelo número de 14 leitões, um dia após o parto. O corte e cura do umbigo serão feitos logo após o nascimento, o corte de dentes e cauda serão realizados aos três dias de idade. A castração dos leitões será realizada aos sete dias de vida.

Um dia após o parto e ao desmame, os leitões de cada leitegada serão identificados, pesados e verificados suas medidas morfométricas: comprimento longitudinal, torácico e abdominal por meio de fita métrica. As pesagens serão realizadas com balança digital de três casas decimais. Com base nas informações coletadas, um dia após o parto e ao desmame, serão calculados o ganho de peso diário dos leitões, o índice de massa corporal e o índice de massa ponderal (Amdi et al., 2013), além da relação entre a superfície e a massa (Brody, Comfort e Mathews, 1928).

Análises estatísticas

Para as análises estatísticas será utilizado o pacote estatístico do SAS (9.3). Os dados serão submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% de probabilidade para verificar a normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal serão comparados pelo teste F da análise de variância. Os dados que não apresentarem distribuição normal, quando possível, serão normalizados pelo procedimento PROC RANK do pacote estatístico do SAS (9.3) e os dados não normalizados serão comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliação da uniformidade da leitegada

A variação dos pesos dos leitões, após a equalização, será comparada pela estratificação percentual, em peso, em sete classes de peso: menor do que 800g, 801 a 1000g, 1001 a 1200g, 1201 a 1400g, 1401 a 1600g, 1601 a 1800g e maior que 1800g e, também, pela análise gráfica da distribuição normal do peso do leitão. As classes citadas anteriormente são baseadas nos achados de Bérard, Pardo, Bethaz, Kreuzer e Bee (2010) os quais afirmaram que leitões com peso inferior a 800 g apresentam retardo no crescimento intra-uterino. E, Pettigrew et al. (1986), Roehe e Kalm (2000) e Quiniou et al. (2002), ao observarem que a probabilidade de sobrevivência pós-desmame é inferior a 75% para leitões que pesam menos do que 1000g e superior a 95% para leitões com peso superior a 1800g.

Segundo Sturges (1926), a ideia básica dos trabalhos de ajuste da distribuição normal pelos histogramas amostrais, é de que a variável normal pode ser apropriadamente dividida, de tal forma que as frequências das classes abranjam uma série binomial de potência dois. Ainda de acordo com este autor, o número ótimo de classes é, em geral:

Número de classes=1+ número de observações

Os pesos individuais dos leitões ao desmame, em cada leitegada, serão distribuídos em classes diamétricas por meio da fórmula de Sturges, a qual permite estabelecer o número de classes para o conjunto de dados utilizados, e obter o intervalo de classe, dividindo a amplitude total pelo número de classes definidas.

Referências

AMDI, C. et al. Intrauterine growth restricted piglets defined by their head shape ingest insufficient amounts of colostrum. Journal of Animal Science, v. 91, n. 12, p. 5605-5613, 2013.

Anual, A. R. (2019). Associação Brasileira de Proteína Animal. 2019.

BÉRARD, J., PARDO, C. E., BETHAZ, S., KREUZER, M., & BEE, G. (2010). Intrauterine crowding decreases average birth weight and affects muscle fiber hyperplasia in piglets. Journal of Animal Science, 88(10), 3242-3250. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2867>.

BRODY, S., COMFORT, J. E., & MATHEWS, J. S. (1928). Further investigations on surface area with special reference to its significance in energy metabolism. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull., 115.

FERREIRA, Adilson Hélio, et al. Produção de suínos: teoria e prática. Brasília: ABCS, 2014.

GREINER, Laura, et al. Evaluation of the optimal standardized ileal digestible threonine: lysine ratio in lactating sow diets. Journal of animal science, 2019, 97.7: 2972-2978.

JULIATTO, ROSYARA PEDRINA MARIA MONTANHA. Caracterização fenotípica de suínos remanescentes da raça Moura. 2016. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

LI, Hao, et al. Changes in plasma amino acid profiles, growth performance and intestinal antioxidant capacity of piglets following increased consumption of methionine as its hydroxy analogue. British journal of nutrition, 2014, 112.6: 855-867.

NOBLET, J.; ETIENNE, M. Estimation of sow milk nutrient output. Journal of Animal Science, v. 67, n. 12, p. 3352-3359, 1989.

NUNES, Christiane Garcia Vilela et al. Níveis de lisina em rações para fêmeas suínas em lactação. R. Bras. Zootec., Viçosa, v. 35, n. 4, supl. p. 1744-1751, ago. 2006.

PETTIGREW, J. E., CORNELIUS, S. G., MOSER, R. L., HEEG, T. R., HANKE, H. E., MILLER, K. P., & HAGEN, C. D. (1986). Effects of oral doses of corn oil and other factors on preweaning survival and growth of piglets. Journal of Animal Science, 62(3), 601-612. <https://doi.org/10.2527/jas1986.623601x>.

QUINIOU, N., DAGORN, J., GAUDRÉ, D. 2002. Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. Livestock Production Science 78, 63-70.

ROEHE, R., & KALM, E. (2000). Estimation of genetic and environmental risk factors associated with pre-weaning mortality in piglets using generalized linear mixed models. Animal Science, 70(2), 227-240. <https://doi.org/10.1017/S1357729800054692>

STURGES, H. (1926) The choice of a class-interval. J. Amer. Statist. Assoc., 21, 65-66.

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
029.725.953-94	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA	DOCENTE	<i>Não informada</i>	Coordenador
078.065.477-38	MARCELLE SANTANA DE ARAUJO	DOCENTE	<i>Não informada</i>	Vice-Coordenador
603.298.623-32	PEDRO HENRIQUE DA SILVA FIDELIS	DISCENTE	<i>Não informada</i>	Membro
612.746.063-81	LUCAS MELO E SILVA	DISCENTE	<i>Não informada</i>	Membro
701.957.714-86	LIGIA VANESSA LEANDRO GOMES	DISCENTE	<i>Não informada</i>	Membro
018.093.124-50	GLEYSON ARAUJO DOS SANTOS	DISCENTE	<i>Não informada</i>	Membro
046.101.733-44	AMANDA MEDEIROS ARAUJO DE OLIVEIRA	EXTERNO	<i>Não informada</i>	Professor/Pesquisador Voluntário

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021						
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA												
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL												
CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO												
ANÁLISES LABORATORIAIS												
ANÁLISES ESTATÍSTICAS												
RELATÓRIO FINAL												
AVALIAÇÕES DO PROJETO												

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
12/05/2020 17:22	CADASTRO EM ANDAMENTO	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA (<i>rennanmoreira</i>)
14/05/2020 16:45	CADASTRADO	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA (<i>rennanmoreira</i>)
14/05/2020 16:45	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	RENNAN HERCULANO RUFINO MOREIRA (<i>rennanmoreira</i>)
19/05/2020 15:45	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Código: PED20003-2020

Título: Monitoramento farmacoterapêutico da dipirona (metamizol) e tramadol em asininos (*Equus asinus*)

Tipo: EXTERNO (Projeto Novo)

Financiamento: SIM

Categoria: Pesquisa científica

Situação: AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE

Unidade: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Centro: DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS (11.01.00.11.04)

Palavra-Chave: Farmacocinética; jumentos; analgesia.

E-mail: valeria@ufersa.edu.br

Período do Projeto: 01/06/2020 a 31/12/2021

Arquivo do Projeto: [Visualizar arquivo](#)

ÁREA DE CONHECIMENTO, GRUPO E LINHA DE PESQUISA

Grande Área de Conhecimento: Ciências Agrárias

Área: Medicina Veterinária

Sub-Área: Clínica e Cirurgia Animal

Especialidade: Anestesiologia Animal

Grupo de Pesquisa:

Linha de Pesquisa:

CORPO DO PROJETO

Resumo

O monitoramento farmacoterapêutico são necessários, consistindo não apenas em medir a concentração de um fármaco em uma matriz biológica, mas também interpretando adequadamente os valores plasmáticos através de parâmetros farmacocinéticos. As condições do estudo serão submetidas à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA) e após aprovação, serão utilizados 08 jumentos (*Equus asinus*), adultos, raça nordestina. Doze horas antes do início do experimento os animais serão submetidos a jejum alimentar e hídrico de oito e quatro horas respectivamente. Para permitir tanto a administração intravenosa dos fármacos quanto a coleta de sangue, um cateter de calibre 16G será fixado a veia jugular e a ele sendo acoplado uma torneira de 3 vias. Realizada a coleta de sangue controle (Branco), os asininos receberão repetidas doses do seguinte tratamento: 4mg.kg⁻¹ de tramadol (Tramadon®, Cristália, SP - Brasil) e 25 mg.kg⁻¹ de metamizol (D500®, Zoetis, SP- Brasil), co-administrados a cada 8 horas por via intravenosa lenta (2 min) e sendo a administração realizada pelo mesmo aplicador. Após a aplicação dos fármacos, amostras de 10mL de sangue serão coletadas em horários pré-definidos, antes e após a administração repetida da dose. Após a administração do fármaco, serão colhidas 1mL de sangue venoso o qual será acondicionado em tubos contendo EDTA e posteriormente centrifugado a 2000 G, durante 10 minutos para obtenção do plasma, que será mantido a -80 °C para posterior análise da concentração plasmática e variáveis farmacocinéticas do tramadol, metamizol e seus metabólitos por meio de cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (UHPLC). A análise farmacocinética da dipirona e seus metabólitos será realizada de acordo com um método não compartimental, usando o software WinNonlin (PharsightCo., CA, versão 2.0). A concentração plasmática máxima (C_{máx}) e o tempo para que ela fosse estabelecida (T_{máx}) foram obtidas diretamente da observação dos dados. A AUC_t será calculada pelo método trapezoidal. O AUC_{inf} será calculado como AUC_t + C_t / Ke, onde C_t corresponde a última concentração quantificável, Ke a constante de velocidade de eliminação terminal de e será determinada por mínimos quadrados. A análise de regressão durante a fase log-linear terminal do curva de concentração-tempo. O T_{1/2} será o valor obtido substituindo a fórmula 0.693/Ke. A análise estatística de variância (ANOVA) de AUC_t, AUC_{inf} e C_{máx} serão calculados após transformação dos dados para os seus valores logarítmicas (ln). Usando a variância do erro (S₂), obtidos a partir da análise de variância, os intervalos de confiança de 90% (CI) serão calculados.

Introdução/Justificativa

(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da instituição em geral)

Os medicamentos opióides continuam sendo a escolha para o tratamento da dor de intensidade moderada a grave. No entanto, a utilidade desses fármacos no tratamento da dor crônica é limitada devido ao desenvolvimento de tolerância ao efeito analgésico que ocorre após repetidas administrações, resultando em aumento da dose administrada e, portanto, em maior incidência de efeitos adversos (DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, 2012). Uma estratégia comum para manter efeitos analgésicos adequados e reduzir os efeitos adversos é combinar doses de fármacos opióides, como o tramadol, com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como a dipirona (metamizol). Embora alguns estudos demonstrem que combinações entre opióides e AINEs possam produzir potenciação analgésica, pouco se sabe sobre os efeitos antinociceptivos de administrações repetidas, não havendo estudos de monitoramento farmacoterapêutico desses fármacos administrados simultaneamente em asininos (*Equus asinus*).

Metamizol e tramadol são fármacos analgésicos com mecanismos de ação complexos, amplamente utilizados em combinação no tratamento da dor aguda pós-operatória (POVEDA, 2003). O mecanismo farmacodinâmico para a interação entre metamizol e tramadol pode ser atribuído parcialmente à sua participação no sistema opioidérgico (LÓPEZ-MUÑOZ, 2013). Outros mecanismos, como a via GMP da l-arginina-NO-cíclica e a interação com os receptores do ácido N-metil D-aspartico, podem ser propostos para explicar o sinergismo antinociceptivo observado com a combinação desses medicamentos.

O tramadol é um medicamento analgésico central com baixa afinidade por receptores opióides. É metabolizado no fígado por duas vias principais: O-desmetilação para O-desmetiltramadol (M1) pelo CYP2D6 e N-desmetilação para N-desmetiltramadol (M2) pelo CYP2B6 e CYP3A4. Apenas um dos metabólitos do tramadol, M1, é farmacologicamente ativo. Sua seletividade para receptores μ foi demonstrada, mostrando uma maior afinidade por receptores opióides do que o fármaco original (SCOTT e PERRY, 2000). O metamizol é um medicamento anti-inflamatório não esteroide que atua como um agente analgésico e antipirético eficaz. O metamizol é um derivado da pirazolona que inibe a síntese de prostaglandinas nos níveis central e periférico (ALVES e DUARTE, 2002, ORTIZ, 2003). O metamizol é um pró-medimento que sofre hidrólise para produzir 4-metilaminoantipirina (MAA), que é transformada no fígado pelo citocromo CYP3A4 em 4-aminoantipirina (AA) e por oxidação em 4-formilaminoantipirina (FAA). O AA é acetilado em 4-acetilaminoantipirina (AAA) (LEVY, 1984). Seu principal efeito adverso é o risco de induzir agranulocitose. A incidência desta grave complicação tem uma grande variabilidade, que pode refletir predisposição genética (SCHUG; MANOPAS, 2007).

Estudos de monitoramento farmacoterapêutico são necessários quando há preocupação no surgimento de reações adversas em administrações repetidas de doses de fármacos isolados ou administrados simultaneamente (KANG, 2009). Este procedimento não consiste apenas em medir a concentração de um fármaco em uma matriz biológica, mas também envolve a interpretação adequada dos valores plasmáticos através de parâmetros farmacocinéticos, permitindo-se conclusões apropriadas sobre os medicamentos quanto às concentrações utilizadas e ajuste de dose. Através da administração simultânea em asininos, pode ser possível que o metamizol e o tramadol possam competir pelas mesmas enzimas, causando alterações nas concentrações dos metabólitos destes fármacos e, conseqüentemente, nos efeitos farmacológicos produzidos podendo levar à reações adversas graves. Dessa forma, torna-se necessário um estudo completo, que envolva o monitoramento farmacoterapêutico de tramadol e metamizol nestes animais.

Objetivos

Geral: Realizar monitoramento farmacoterapêutico de dipirona (metamizol) e tramadol em asininos (*Equus asinus*)

Específicos:

- Validar metodologia analítica por UHPLC-MS para a determinação das concentrações plasmáticas de tramadol, metamizol e seus respectivos metabólitos ativos;
- Avaliar o perfil farmacocinético do tramadol administrado de maneira isolada investigando a presença e a concentração dos metabólitos M1, M2 e M5;
- Avaliar o perfil farmacocinético do tramadol co-administrado com dipirona e investigar quanto à interação farmacológica, aumento e/ou diminuição dos metabólitos M1, M2 e M5 (do tramadol) e MAA e AA da dipirona;
- Monitorar as concentrações plasmáticas em administração repetida de doses e propor um regime posológico;

Metodologia

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

As condições do estudo serão submetidas à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA) e após aprovação, serão utilizados 08 jumentos (*Equus asinus*), adultos, raça nordestina. Serão incluídos no estudo somente os animais considerados saudáveis mediante avaliação clínica, incluindo exames complementares de hemograma completo e avaliação bioquímica hepática e renal.

Os animais serão desverminados e aclimatados em baias nas quais permanecerão durante a pesquisa e será fornecida dieta constituída de ração comercial e volumoso para nutrição e água ad libitum.

2.2 Desenho experimental

Serão utilizados 08 jumentos (*Equus asinus*) adultos com peso entre 100 e 150 Kg. Os asininos serão previamente aclimatados e avaliados quanto à higidez por meio de exame clínico e análise hematológica, parasitológica e bioquímica completa. Os mesmos animais serão submetidos a todos os tratamentos possuindo um período de descanso de 15 dias entre tratamentos.

Doze horas antes do início do experimento os animais serão submetidos a jejum alimentar e quatro horas antes haverá jejum hídrico. Para permitir tanto a administração intravenosa dos fármacos quanto a coleta de sangue, um cateter de calibre 16G será fixado a veia jugular e a ele sendo acoplado uma torneira de 3 vias.

Realizada a coleta de sangue controle (Branco), os asininos receberão repetidas doses do seguinte tratamento: 4mg.kg⁻¹ de tramadol (Tramadon®, Cristália, SP - Brasil) e 25 mg.kg⁻¹ de metamizol (D500®, Zoetis, SP- Brasil), co-administrados a cada 8 horas por via intravenosa lenta (2 min) e sendo a administração realizada pelo mesmo aplicador. Após a aplicação dos fármacos, amostras de 10mL de sangue serão coletadas em horários pré-definidos, antes e após a administração repetida da

dose.

Durante este procedimento, haverá monitoramento dos efeitos adversos e reação comportamental dos animais, além da avaliação bioquímica renal e hepática.

2.3. Determinação das concentrações plasmáticas de tramadol, metamizol e metabólitos ativos

Após a administração do fármaco, serão colhidas 1mL de sangue venoso o qual será acondicionado em tubos contendo EDTA e posteriormente centrifugado a 2000 G, durante 10 minutos para obtenção do plasma, que será mantido a -80 °C para posterior análise da concentração plasmática e variáveis farmacocinéticas do tramadol, metamizol e seus metabólitos por meio de cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (UHPLC).

2.3.1. Condições analíticas

As concentrações plasmáticas serão analisadas em um sistema UHPLC-MS/MS (Nexera® 2 UHPLC) acoplado a um detector de espectrometria de massas LCMS-8040 (Shimadzu®, Japan) e coluna Shimadzu® BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 75 mm) (Shimadzu®, Japan). A fase móvel será constituída por acetonitrila e uma solução de ácido fórmico 0,1% (75:25, v/v) a 0,3 mL/min; o volume de amostra injetado será de 5,0 µL. A temperatura da coluna será ajustada para 40 °C e o amostrador automático regulado para 5 °C. Para Tramadol, M1, 4-MAA e 4-AA, o espectrômetro de massa será ajustado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), modo de ionização positivo ESI. A energia de colisão e a tensão do cone será 12 e 19 V, respectivamente. A taxa de fluxo do gás cone e dessolvatação calibrada para 150 e 600 L/min, respectivamente, usando argônio como gás de colisão na vazão de 0,15 mL/min. O espectrômetro de massa será configurado para monitorar a transição da faixa do íon principal e íon filho, com tempo de permanência de 0,3 s. Dados de MRM serão adquiridos e analisados através do software Labsolution® (Shimadzu®, Japan).

2.3.2. Preparação das amostras

As amostras congeladas de plasma dos animais serão colocadas para descongelar naturalmente e posteriormente agitadas em vortex antes de sua utilização. O plasma será preparado por meio de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C-18 Sep-Pak (Waters Milford, MA, USA) e sistema a vácuo (Spe-ed Mate-10, AppliedSeparations, Allentown, PA, USA). Os cartuchos serão pré-condicionados por meio de lavagens com 6 mL de metanol e 6 mL de água destilada. 100µL da amostra serão colocadas diretamente no cartucho e adicionados 100µL da solução do padrão interno. A amostra será deixada em repouso durante 5 min, lavada com 0,4 mL de água e, em seguida secada sob vácuo. Os analitos e o padrão interno serão eluídos com 3 mL de metanol, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, sendo posteriormente evaporado em banho-maria a 45°C sob uma suave corrente de nitrogênio gasoso. O resíduo será reconstituído com 100µL fase móvel e injetado em UHPLC/MS-MS para análise.

2.4. Validação do método

O método será validado, baseado nos critérios descritos na resolução nº166, de 24 de julho de 2017, ANVISA, Brasil.

- Seletividade e linearidade.

A seletividade do método será provada pela ausência de coeluição entre as substâncias endógenas, a dipirona, 4-methylaminoantipyrina, 4-aminoantipirina e o padrão interno. Amostras de plasma branco normal e hemolisado não tratados serão utilizados para verificar a especificidade do método.

Para avaliar a linearidade das curvas de calibração, concentrações plasmáticas da dipirona serão calculados a partir de curvas padrão de plasma em branco enriquecida com concentrações conhecidas de dipirona (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 100 µg/mL), 4-methylaminoantipyrina (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 100 µg/mL) e 4-aminoantipyrina (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 100 µg/mL), analisados em triplicata. As curvas de calibração padrão serão construídas com área sob o pico de dipirona/padrão versus a concentração nominal, por meio de regressão linear.

- Precisão, exatidão e recuperação.

Precisão do ensaio será avaliada através da determinação dos coeficientes de variação (CV) das quatro amostras controle (CQ) (Dipirona, MAA e AA - concentrações de 5, 15, 30 e 100 µg/mL) com a mesma análise (n = 5, precisão intra-dia) e ao longo de uma série de análises (n = 5, a precisão inter-dia). Tanto a precisão intra-dia e inter-dia será calculada com a seguinte fórmula:

$$CV\% = \left\{ \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \right\} \times 100$$

A precisão relativa será determinada através do cálculo da precisão por cento, pela equação:

$$\text{Acurácia \%} = \left\{ \frac{\text{Média da concentração mensurada}}{\text{Concentração nominal}} \right\} \times 100$$

Será determinado o limite de quantificação (LLOQ). Os ensaios de recuperação neste estudo serão realizados comparando as áreas dos picos do padrão interno e da dipirona, MAA e AA em amostras plasmáticas, extraído segundo o método já descrito. Os compostos de interesse em concentrações correspondentes a 100% de recuperação serão adicionados de forma semelhante pós-extraída do plasma em branco.

- Estabilidade

A estabilidade da dipirona, MAA e AA em plasma felino será testada em três ciclos de congelamento-descongelamento com amostras de plasma branco enriquecido com quatro diferentes concentrações. Estas amostras serão armazenadas congeladas a -20 °C e analisada nos dias 0, 1 e 5.

2.5. Análises farmacocinéticas e estatísticas

A análise farmacocinética da dipirona e seus metabólitos será realizada de acordo com um método não compartimental, usando o software WinNonlin (PharsightCo., CA, versão 2.0). A concentração plasmática máxima (C_{máx}) e o tempo para que ela fosse estabelecida (T_{máx}) foram obtidas diretamente da observação dos dados. A AUCt será calculada pelo método trapezoidal. O AUCinf será calculado como AUCt + Ct / Ke, onde Ct corresponde a última concentração quantificável, Ke a constante de velocidade de eliminação terminal de e será determinada por mínimos quadrados. A análise de regressão durante a fase log-linear terminal do curva de concentração-tempo. O T_{1/2} será o valor obtido substituindo a fórmula 0.693/Ke.

A análise estatística de variância (ANOVA) de AUCt, AUCinf e C_{máx} serão calculados após transformação dos dados para os seus valores logarítmicas (ln). Usando a variância do erro (S₂), obtidos a partir da análise de variância, os intervalos de confiança de 90% (CI) serão calculados.

ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO PARA ASININOS (Equus asinos)

Será proposto um protocolo de acompanhamento farmacoterapêutico aos asininos assistidos pelo hospital de medicina veterinária da Universidade Federal do Semi-Arido (UFERSA), com base nos resultados de farmacocinética, reações adversas e monitoramento plasmático após administrações repetidas de doses. Neste protocolo será incluída também uma investigação quanto à tolerância do opióide pelo animal.

Referências

- ALVES, Daniela P.; DUARTE, Igor DG. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. European journal of pharmacology, v. 444, n. 1-2, p. 47-52, 2002.
- DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, Adriana Miriam et al. High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: application to pharmacokinetic studies. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 71, p. 173-178, 2012.
- KANG, Ju-Seop; LEE, Min-Ho. Overview of therapeutic drug monitoring. The Korean journal of internal medicine, v. 24, n. 1, p. 1, 2009.
- LEVY, M.; FLUSSER, D.; ZYLBER-KATZ, E.; GRANIT, L. Plasma kinetics of dipyrone metabolites in rapid and slow acetylators. European Journal of Clinical Pharmacology, v. 27, n. 4, p. 453-458, 1984.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F. J.; SORIA-ARTECHE, O.; LÓPEZ, J. R. M.; HURTADO Y DE LA PEÑA, M.; GARCÍA, M. C. L.; MORENO-ROCHA, L. A.; DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, A. M. Antinociceptive activity of metamizol metabolites in a rat model of arthritic pain. Drug Development Research, v. 74, n. 5, p. 332-338, 2013.
- POVEDA, Raquel et al. Interaction between metamizol and tramadol in a model of acute visceral pain in rats. European Journal of Pain, v. 7, n. 5, p. 439-448, 2003.
- SCOTT, Lesley J.; PERRY, Caroline M. Tramadol. Drugs, v. 60, n. 1, p. 139-176, 2000.
- SCHUG, S. A.; MANOPAS, A. Update on the role of non-opioids for postoperative pain treatment. Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology, v. 21, n. 1, p. 15-30, 2007.

FINANCIAMENTOS

Entidade Financiadora	Natureza do Financiamento	Data Início	Data Fim	Valor
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Bolsa	01/06/2020	31/12/2021	108.054,00

MEMBROS DO PROJETO

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
064.940.074-73	TALYTA LINS NUNES	EXTERNO	Não informada	Membro

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Função
362.613.003-72	VALERIA VERAS DE PAULA	DOCENTE	Não informada	Coordenador
028.661.484-79	WIRTON PEIXOTO COSTA	DOCENTE	Não informada	Membro
432.143.633-87	RAIMUNDO ALVES BARRETO JUNIOR	DOCENTE	Não informada	Membro
017.131.624-07	RYSHELY SONALY DE MOURA BORGES	DISCENTE	Não informada	Membro
075.010.124-58	LUÃ BARBALHO DE MACEDO	DISCENTE	Não informada	Membro
	JOSÉ TRINIDADE PEREZ URIZAR	EXTERNO	Não informada	Membro
012.044.534-46	LILIAN GRACE DA SILVA SOLON	EXTERNO	Não informada	Vice-Coordenador

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	2020					2021												
	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
AQUISIÇÃO DE CONSUMÍVEIS E REAGENTES SELEÇÃO DOS ANIMAIS. ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS NOS ASININOS MONITORAMENTO DOS EFEITOS ADVERSOS AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E AVALIAÇÃO DOS INTERFERENTES; AVALIAÇÃO DA PRECISÃO, EXATIDÃO E ROBUSTEZ; ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS REVISÃO DE LITERATURA E ATUALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA ANÁLISES ESTATÍSTICAS ELABORAÇÃO DOS RESUMOS E ARTIGOS. REDAÇÃO DO RELATÓRIO PARCIAL E FINAL AVALIAÇÕES DO PROJETO																		

HISTÓRICO DO PROJETO

Data	Situação	Usuário
14/05/2020 11:51	CADASTRO EM ANDAMENTO	VALERIA VERAS DE PAULA (<i>valeriavp</i>)
15/05/2020 10:00	CADASTRADO	VALERIA VERAS DE PAULA (<i>valeriavp</i>)
15/05/2020 10:00	AGUARDANDO APROVAÇÃO CEUA	VALERIA VERAS DE PAULA (<i>valeriavp</i>)
19/05/2020 15:46	AGUARDANDO AUTORIZAÇÃO DA UNIDADE	EMANUELLE FONTENELE RABELO (<i>rabelo.ef</i>)