

**José Max Barbosa de Oliveira Junior**  
**Lenize Batista Calvão**  
**(Organizadores)**



**As Ciências  
Biológicas e a  
Construção de  
Novos Paradigmas  
de Conhecimento**

José Max Barbosa de Oliveira Junior  
Lenize Batista Calvão  
(Organizadores)

# As Ciências Biológicas e a Construção de Novos Paradigmas de Conhecimento

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Rafael Sandrini Filho  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
C569	As ciências biológicas e a construção de novos paradigmas de conhecimento [recurso eletrônico] / Organizadores José Max Barbosa de Oliveira Junior, Lenize Batista Calvão. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-540-2 DOI 10.22533/at.ed.402191508  1. Biotecnologia. 2. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. 3. Ecologia. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Calvão, Lenize Batista.  CDD 660.6
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

A obra “**As Ciências Biológicas e a Construção de Novos Paradigmas de Conhecimento**” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com nove capítulos o volume I apresenta uma vasta heterogeneidade de conceitos e aplicações nas áreas de Biotecnologia, Genética, Saúde humana, Educação bem como a importância das condições ambientais que as espécies estão inseridas. No cenário atual de mudanças ambientais correntes e avanços tecnológicos é extremamente importante o uso adequado de técnicas em cada área.

O E-Book foi dividido em nove capítulos que abordam estratégias didáticas usando práticas em campo para alunos da educação básica. As aplicações dessas práticas permitem os discentes observar por si próprios novos domínios do conhecimento incluindo áreas com conceitos complexos como em Ecologia. Esse avanço possibilita a longo prazo que os alunos sejam participativos nas decisões do meio em que vivem. O tema sobre Saúde humana se encontra em pauta trazendo os aspectos nutricionais de adolescentes com e sem Síndrome de Down. Discussões importantes como obesidade e baixa ingestão de fibras realizada pelos jovens devem ser elencados para uma educação alimentar desde os primeiros anos escolares.

As aplicações de técnicas adequadas de Biotecnologia são extremamente importantes para uso de produtos eficazes em diversas áreas. Adicionalmente, análises citogenéticas fornecem informações que são relevantes e direcionar um correto aconselhamento genético familiar. O livro também traz publicações que contribuí com avanços na área da medicina veterinária, através da avaliação macroscópica e microscópicamente de lesões cranioencefálicas de cães e gatos.

Por fim, atividades humanas como construção de reservatórios são cada vez mais frequentes em sistemas naturais, desta forma a avaliação das condições ambientais da variação espacial é muito importante para conservação das espécies. Os estudos apresentados aqui, em português e linguagem acessível, são de extrema relevância nas áreas destinadas a saúde humana, sociais, medicina veterinária e relação das espécies com ambiente englobando uma série de perguntas intrigantes e também compreensível a jovens cientistas.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

Lenize Batista Calvão

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
A BOTÂNICA COM FOCO NO OLHAR DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE UMA ESCOLA ESTADUAL DE COMODORO - MT	
Josefa Silva dos Santos Jucimar Silva dos Reis	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915081</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>11</b>
ANÁLISE DA DIETA E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN: ESTUDO DE CASO-CONTROLE	
Bruna Rongetta Torres Amanda Daniel Natalia Tonon Domingues Luiza Tavares Carneiro Santiago Cristina Helena Lima Delambert Bizzotto Carlos Alexandre Hattori Tiba Lidia Raquel De Carvalho Catia Regina Branco Da Fonseca	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915082</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>22</b>
AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FOLHAS DE <i>Piptadenia stipulacea</i>	
Geovanna Hachyra Facundo Guedes Bruno Mendes Tenorio José Anderson da Silva Gomes Letícia Simone Melo dos Santos Marcos Aurélio Santos da Costa Maria Luísa Figueira de Oliveira Matheus Carvalho Brito Leite Renatha Claudia Barros de Sobreira Tainá Maria Santos da Silva Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório Carolline Guimarães D'Assunção Cintia Giselle Martins Ferreira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915083</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>31</b>
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DE LESÕES CRANIOENCEFÁLICAS EM PEQUENOS ANIMAIS	
Barbara Wagner Duarte Ferraz de Camargo Tália Missen Tremori Selene Daniela Babboni Maria Jaqueline Mamprim Noeme Sousa Rocha	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915084</b>	

<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>45</b>
CRISPR/CAS9 COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO NICHOS ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH ( <i>DANIO RERIO</i> )	
Matheus Morais Miranda	
Lucas Benites Doretto	
Rafael Henrique Nóbrega	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915085</b>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>59</b>
PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>Anacardium occidentale</i> L. AND <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	
Sérvio Quesado Junior	
Márcia Maria Mendes Marques	
Ana Raquel Araújo da Silva	
Maria Izabel Florindo Guedes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915086</b>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>69</b>
LIMNOLOGIA COMPARADA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE HABITATS DO RESERVATÓRIO DE ROSANA, RIO PARANAPANEMA (SP/PR)	
Rafaela Shizuko Yamashita Kimura	
João Felipe Denys Pereira	
Maria Luisa Passos Frigero	
Marco Aurélio Pessotto	
Pedro Vinícius Melo dos Santos	
Marcos Gomes Nogueira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915087</b>	
<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>81</b>
OLIGOMERIZAÇÃO DO COMPLEXO FERRITINA-LIGANTE POR MEIO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA FERRITINA DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
Giovanna Tavares Jeronymo	
Ricardo Barros Mariutti	
Thaís Caroline Serafim	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915088</b>	
<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>93</b>
TRANSLOCAÇÃO BALANCEADA HERDADA T(8;19)(Q12;Q13)MAT CONCOMITANTE À DELEÇÃO DE 15Q11.2 EM UM PACIENTE COM SÍNDROME DE ANGELMAN (SA) - A CITOGENÉTICA CLÁSSICA NÃO EVANESCE	
Elenice Ferreira Bastos	
Carlos Roberto da Fonseca	
Patrícia Santana Correia	
Cristiane Queila Ebraim Barros	
Ingrid Bendas Feres Lima	
Anna Luiza Vaz Serrão	
Lúcia de Fátima Marques de Moraes	
Juan Clinton Llerena Jr	
<b>DOI 10.22533/at.ed.4021915089</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES</b> .....	<b>99</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO</b> .....	<b>99</b>

## A BOTÂNICA COM FOCO NO OLHAR DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE UMA ESCOLA ESTADUAL DE COMODORO - MT

### Josefa Silva dos Santos

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ensino de Ciências Naturais (PPGECN) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus Cuiabá*.  
Comodoro – MT.

### Jucimar Silva dos Reis

Aluno do Programa de Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO) da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), *Campus Tangará da Serra*.  
Comodoro – MT.

**RESUMO:** Este texto traz reflexão sobre o olhar de estudantes do Ensino Médio de uma instituição educacional do município de Comodoro–MT para o Reino *Plantae*. A produção de dados foi realizada, dentre várias etapas de planejamento de ações, em aulas de campo em uma reserva florestal, de caráter público-privado, do município supracitado, envolvendo turmas de 2° e 3° anos do Ensino Médio. As atividades tinham caráter exploratório e dirigido e os estudantes fizeram registros fotográficos de representantes do Reino *Plantae* presentes na área estudada. Os registros fotográficos feitos pelos estudantes fizeram parte da produção de cartazes, que foram expostos nos murais da escola para a comunidade escolar e visitantes. Nos registros feitos pelos estudantes,

observam-se fotografias de representantes de três dos quatro grupos genéricos de plantas, a saber: musgos e hepáticas (briófitas), samambaias e licófitas (pteridófitas), plantas que produzem flores e frutos (angiospermas), como, por exemplo, representantes de Fabaceae, Melastomataceae e Passifloraceae. Além disso, os estudantes registraram ainda interações ecológicas das plantas com outros seres vivos, como, por exemplo, herbivorias, decomposição, polinização, mutualismo, inquilinismo, competição, dentre outros. Nesse sentido, reiteramos que as atividades desta natureza constituem grandes estratégias didáticas no processo de ensino e aprendizagem das Ciências Naturais, sobretudo, nos estudos da Botânica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Botânica. Estratégias de ensino. Olhar discente.

### THE BOTANIC WITH A FOCUS ON THE STUDENT'S LOOK AT THE MIDDLE SCHOOL OF A STATE SCHOOL OF COMODORO - MT

**ABSTRACT:** This text brings reflection on the look of high school students from an educational institution from the municipality of Comodoro - MT to the Kingdom *Plantae*. The data production was carried out, among several steps of planning of actions, in field lessons in



a forest reserve, of public-private character, of the mentioned municipality, involving classes of 2nd and 3rd years of High School. The activities had exploratory and directed character and the students made photographic records of representatives of the Kingdom Plantae present in the studied area. Photographic records made by students were part of the production of posters, which were displayed on school murals for the school community and visitors. In the records made by the students, photographs of representatives of three of the four generic groups of plants are observed: mosses and hepatics (bryophytes), ferns and lyophytes (pteridophytes), plants that produce flowers and fruits (angiosperms) for example, representatives of Fabaceae, Melastomataceae and Passifloraceae. In addition, students also recorded ecological interactions of plants with other living beings, such as herbivory, decomposition, pollination, mutualism, tenancy, competition, among others. In this sense, we reiterate that the activities of this nature constitute great didactic strategies in the teaching and learning process of the Natural Sciences, especially in Botany studies.

**KEYWORDS:** Botany. Teaching strategies. Look student.

## 1 | INTRODUÇÃO

Na escola e em sala de aula, especificamente, onde a relação professor-aluno, por muitas das vezes, é desgastada, a participação dos estudantes como condição de construção de conhecimento e conquista da autonomia enquanto sujeito é refletida como intrínseco de sua natureza (BORDENAVE, 1994).

Solé e Coll (2001) ressaltam que se aceitarmos que o ensino é exclusivo ou fundamentalmente uma atividade rotineira, estática, não precisaríamos de teorias, receitas e instruções, ensinar vai além. Ainda segundo os mesmos autores, as teorias que necessitamos, enquanto educadores, como elemento estruturador, tem dimensão social no ensino à qual aludimos, no duplo sentido de que a educação escolar é um projeto social que se corporifica e se desenvolve em uma instituição também social.

A forma como o conhecimento tem sido trabalhado já não chama a atenção dos estudantes. Nesse sentido, se quisermos que eles participem politicamente da sociedade, permitindo transformações da sua realidade, a mera reprodução de conteúdos completamente burocratizados não será suficiente para as transformações desejadas (GANDIN; GANDIN, 1999).

As reflexões feitas por Hardoim *et al.* (2010) apontam que a escola está mais preocupada em discutir a metodologia que deve ser utilizada para a transmissão de conteúdos do que discutir sobre a validade e pertinência dos conceitos clássicos que estão presentes nos currículos, dessa forma o professor acaba optando pela reprodução do livro didático adotado, mesmo que na prática ele insira outros assuntos que evidenciam escolhas, opções e preferências sociais, culturais e ideológicas.

Partindo desses pressupostos, entendemos que há necessidade de práticas

pedagógicas que vão além do cotidiano escolar, marcado historicamente pela transmissão-recepção, práticas essas em que os conteúdos científicos são socializados como verdades imutáveis, intangíveis a questionamentos. Nesse contexto, propomos uma atividade delineando esse viés envolvendo o ensino de Botânica, que segundo Esganzela *et al.* (2014), precisa motivar e propiciar encaminhamentos didático-pedagógicos que busquem privilegiar práticas de ensino que ofereçam condições de aprendizagem significativa, superando as tradicionais do ensino de Biologia nas escolas.

Diante desse panorama, o presente estudo teve como objetivo analisar o olhar de estudantes do Ensino Médio de uma escola do noroeste mato-grossense em relação ao Reino *Plantae*, usando como estratégia didática a aula de campo.

## 2 | PERCURSO METODOLÓGICO

### 2.1 Natureza da Investigação

A presente pesquisa tem um caráter qualitativo (BOGDAN; BIKLEN, 1991; SEVERINO, 2007), sobre a égide de um recorte de pesquisa-ação. Segundo Thiollent (1996), esta modalidade de pesquisa se caracteriza quando há uma ação por parte de pessoas ou grupos observação, além disso, é preciso que a ação seja não trivial, que significa merecer uma investigação a ser elaborada e conduzida.

Ainda na pesquisa-ação, os pesquisadores desempenham um papel ativo no equacionamento, na organização, na investigação em torno da concepção, do desenrolar e da avaliação da ação planejada. O autor supracitado considera que a pesquisa-ação implica algumas estratégias metodológicas, tais quais, uma ampla e explícita interação entre pesquisadores (professores) e pessoas implicadas na situação investigada (alunos), possibilitando ainda o aumento de conhecimento e/ou nível de consciência tanto dos pesquisadores quanto das pessoas ou grupos investigados (THIOLLENT, 1996).

### 2.2 Contexto Da Pesquisa E Participantes Da Investigação

A pesquisa foi realizada no final da estação chuvosa, no município de Comodoro, situado no noroeste de Mato Grosso, a cerca de 650 km da capital do Estado, que apresenta uma área de 21.743,362 km<sup>2</sup>, com uma população de 19.702 habitantes (SANTOS; GUARIM NETO, 2017). A proposta de investigação foi o desenvolvimento de aulas de campo com turmas do Ensino Médio em uma reserva legal, constituída de áreas particulares e municipais, localizada na seguinte coordenada geográfica: latitude sul -13° 39'43,47" e longitude oeste de -59° 46' 07,27" (Figura 1).



Figura 1 – Fragmento florestal onde foram realizadas as atividades de campo.

Fonte: Adaptado do Google Earth (2018).

A pesquisa delineada envolveu estudantes da Escola Estadual Dona Rosa Frigger Piovezan. A instituição atende, atualmente, o ciclo final do Ensino Fundamental (III ciclo, primeira, segunda e terceira fase) e o Ensino Médio, desenvolvendo atividades educativas nos períodos matutino, vespertino e noturno. Conta com 840 estudantes regularmente matriculados para o ano letivo de 2018, destes 418 estão com matrícula ativa no Ensino Médio (dados obtidos pelos servidores na secretaria da instituição escolar).

O Ensino Médio desta unidade escolar está distribuído em 16 turmas, sendo 7 turmas de 1º anos, 5 turmas de 2º anos e 4 turmas de 3º anos. No entanto, delimitou como amostra para o presente trabalho apenas as turmas de 2º e 3º anos, visto que nos planejamentos anuais destas séries já contemplavam o estudo do Reino *Plantae*.

### 2.3 Etapas da Investigação

Como ressaltam Viveiro e Diniz (2010), a atividade de campo não consiste somente na saída de campo propriamente dita, mas sim todo o processo de planejamento, execução, exploração de resultados e avaliação das atividades desenvolvidas, abaixo seguem as etapas delineadas pela presente pesquisa:

1) Foi realizada uma visita, pelo professores-pesquisadores, a reserva florestal a fim de reconhecer e demarcar alguns aspectos que iriam ser explorados na aula de campo. Este reconhecimento do local está de acordo com as orientações de Krasilchik (2009), para quem a visita ao local escolhido para o trabalho de campo é relevante para evitar algumas surpresas inesperadas. Nesta etapa, pediu-se autorização informal dos locatários da reserva em questão.

2) Na etapa de planejamento das ações da pesquisa, foi solicitado uma autorização dos responsáveis pelos estudantes para a realização das atividades de aula de campo, bem como a utilização dos registros fotográficos dos mesmos. Ainda nos primórdios das atividades de planejamento, a Coordenação Pedagógica

da escola foi informada das atividades e solicitada a contribuir com ações de ensino. Em sala, previamente, os alunos foram divididos em pequenos grupos. Na sequência, os professores-pesquisadores trabalharam um roteiro de estudo que objetivava uma atividade sobre modelagem matemática e uma rápida identificação dos quatro grupos convencionais do Reino *Plantae*, a saber; briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. A modelagem matemática trabalhada é, inclusive, uma das propostas de intervenção pedagógica da Pró-Escola Formação na Escola – PEFE.

3) *In lócus*, os grupos exploraram, sob a mediação dos professores-pesquisadores, a área de estudo. Inicialmente, a atividade caracterizou-se como estudo exploratório, momento em que os alunos participantes dirigiram registros fotográficos aos seres vivos presentes no espaço, com ênfase no Reino *Plantae*.

4) Em seguida, cada grupo de alunos escolheu, na área de estudo, uma local para delimitação de quadrantes 2x2 (DURIGAN, 2004) para a realização da modelagem matemática (cálculo simples de densidade de plantas) e identificação dos grupos de plantas ocorrentes no quadrante.

## 2.4 Produção e Análise de Dados Da Investigação

Levando em consideração que a modalidade da pesquisa delineada aqui é um recorte de uma pesquisa-ação, os seus dados foram analisados segundo as observações e inferências dos professores-pesquisadores que planejaram e conduziram as atividades em campo. Para captar a percepção dos estudantes em relação aos representantes do Reino *Plantae*, as fotos registradas por eles foram analisadas e perfazem parte dos dados do trabalho, para além das observações realizadas pelos pesquisadores, caracterizadas como observações participantes.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo das atividades em campo, os grupos dirigiram seus olhares aos representantes do Reino *Plantae*, realizando vários registros fotográficos (Figura 2; Figura 3).



Figura 2 – Registros de representantes do Reino *Plantae* sob a ótica de estudantes do Ensino Médio da Escola Estadual Dona Rosa Frigger Piovezan.

**A:** Herbivoria do tipo galha registrada em folha de angiosperma; **B:** Herbivoria do tipo mina em folha de angiosperma; **C:** Samambaia do gênero *Pityrogramma* registrada nas margens da Estação de Coleta de Águas; **D:** Flor de uma planta da família Fabaceae; **E:** Domácia aberta de Melastomataceae abrigando formigas em relação de mutualismo; **F:** Licófito registrada na borda do fragmento; **G:** Comunidade formada por musgos e líquens; **H:** Herbivoria em folha de angiosperma; **I:** Fruto aberto evidenciando os óvulos fecundados (sementes); **J:** Gema apical de angiosperma; **K:** Frutos do gênero *Pera*; **L:** Musgos vivendo em tronco de arbusto; **M:** Fruto aberto evidenciando sementes aladas; **N:** Frutos imaturos do tipo legume.

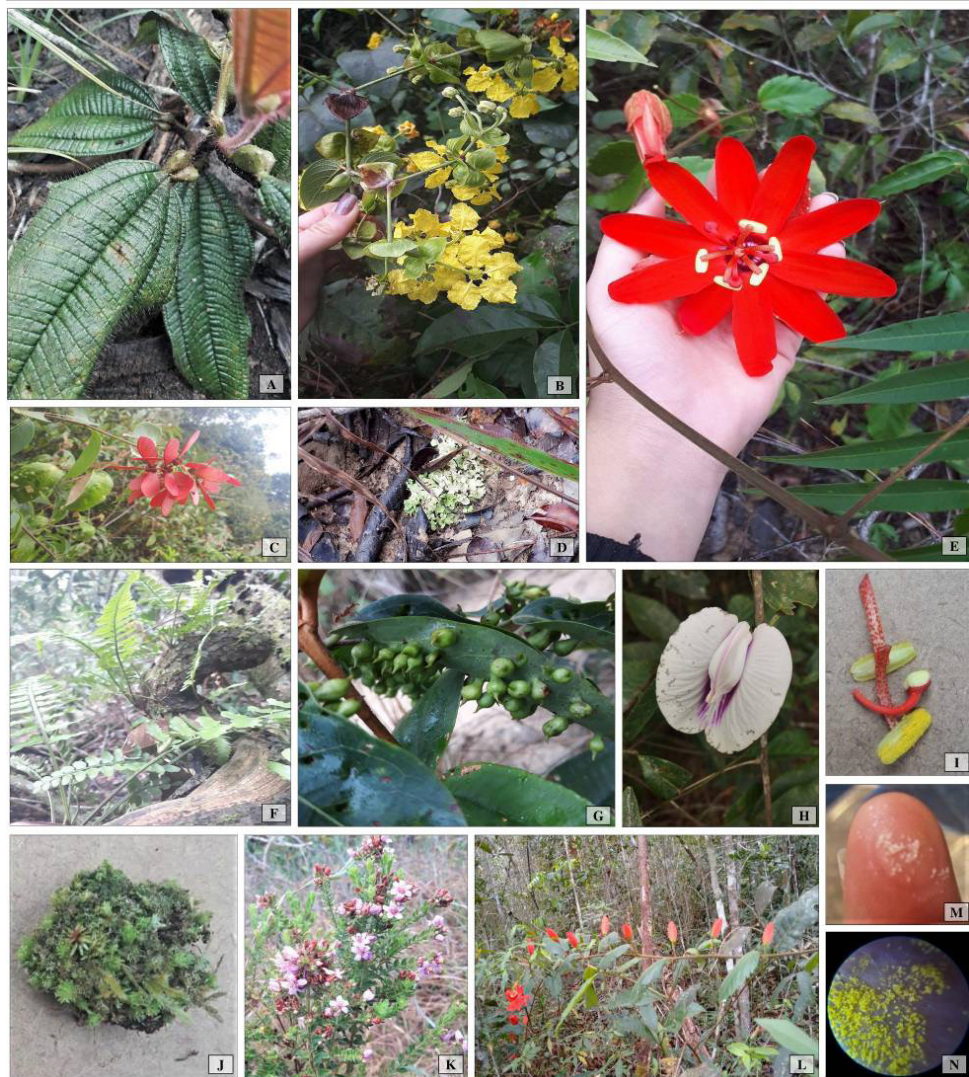


Figura 3 – Registros de representantes do Reino *Plantae* sob a ótica de estudantes do Ensino Médio da Escola Estadual Dona Rosa Frigger Piovezan.

**A:** Domácea de Melastomataceae; **B:** Flores de angiospermas; **C:** Modificações foliares em angiospermas; **D:** Hepáticas registradas sobre o solo; **E:** Flor de angiosperma do gênero *Passiflora* evidenciando as estruturas reprodutivas masculinas e feminina; **F:** Samambaia epífita da família Aspleniaceae; **G:** Herbivoria do tipo galha registrada em folha de angiosperma; **H:** Flor do gênero *Clitoria* registrada na borda da trilha; **I:** Corte histológico evidenciando a estrutura masculina (filete e antera) e feminina (estilete e estigma); **J:** Pequeno fragmento populacional de briófitas; **K:** Flores de angiospermas; **L:** Liana de *Passiflora* no interior da mata; **M:** Óvulo ampliado de uma angiosperma (visto em “microscópio de dedo” levado a campo por um aluno participante da pesquisa); **N:** Grão de pólen de uma angiosperma (visto em “microscópio de dedo” levado a campo por um aluno participante da pesquisa).

Nas figuras acima, pode-se perceber que cada aluno, por si só, conseguiu captar elementos particulares do meio. Nesse sentido, compartilhamos das reflexões de Viveiro e Diniz (2009), para quem as aulas de campo permitem o contato direto dos estudantes com o meio ambiente, possibilitando que estes interagem com

situações reais. Dessa forma, ao aguçar a curiosidade e os sentidos, permitem que os estudantes confrontem teoria e prática. De acordo com Krasilchik (2009), as aulas de campo são elementos obrigatórios no processo de ensino-aprendizagem de Biologia, visto que possibilita que os estudantes reconheçam o ambiente em seus aspectos físicos e ambientais.

Além de aspectos do Reino *Plantae*, os alunos também dirigiram sua percepção a outros seres vivos ocorrentes na área, tais como hexápodes, fungos, algas, associações mutualísticas, dentre outros (Figura 4).



Figura 4 – Registros de outros aspectos biológicos sob a ótica de estudantes do Ensino Médio da Escola Estadual Dona Rosa Frigger Piovezan.

**A:** Cogumelo em formato de cálice registrado no interior da mata; **B:** Fungo negriscente registrado em tronco de árvore em decomposição; **C:** Formigueiro escondido na serrapilheira; **D:** Indivíduo do Filo Arthropoda, da Classe Insecta; **E:** Restos mortais de uma borboleta; **F:** Fungo redondo em tronco em decomposição;

**G:** Fungo liquenizado; **H:** Fungo saprófago; **I:** Líquens incrustados; **J:** Tronco evidenciando a biota de líquens; **K:** Fungo saprófago atuando sobre a serrapilheira; **L:** Córrego Cascalheira com destaque para as algas pardas no espelho d' água.

As fotografias registradas pelos estudantes foram expostas à comunidade escolar e visitantes, através da produção e exposição via cartazes, inserindo-se na proposta de um dos projetos desenvolvidos pela escola, intitulado “Jornal Mural”, que visa, em linhas gerais, promover nos alunos uma postura mais crítica diante da realidade, o trabalho em equipe e leitura. Na produção dos cartazes pelos grupos, os professores-pesquisadores orientaram os estudantes a utilizarem conhecimentos sobre classificação biológica, nomenclatura científica e suas regras, conteúdos estes que faziam parte do planejamento executado no bimestre anterior.

Segundo Viveiro e Diniz (2009), as aulas de campo constituem importantes ferramentas para o ensino de Ciências, pois permitem a exploração de uma enorme diversidade de conteúdos e a motivação dos educandos, além de propiciar o contato e interação direta com o ambiente e uma melhor compreensão de fenômenos que ocorrem na dinâmica do meio. Elas ainda envolvem os alunos com situações reais, confrontando teoria e prática, estimula a curiosidade e aguça os sentidos.

Nessa perspectiva, ainda segundo os mesmos autores, as aulas de campo permitem que o estudante se sinta protagonista de seu processo de ensino, que é um elemento ativo, não mais um mero receptor de informações (VIVEIRO; DINIZ, 2010).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com bases nos resultados observados, percebemos que os estudantes, em sua maioria, se mostraram envolvidos com as atividades propostas no processo de ensino-aprendizagem, que é condição fundamental na construção do conhecimento. É importante reiterarmos a abertura para o processo de autonomia dos estudantes no desenvolvimento das atividades realizadas, que embora tivessem alguns aspectos dirigidos e/ou orientados pelos professores-pesquisadores, os estudantes, na maioria das situações, foram autônomos em perceber, registrar e apontar os mais diversos aspectos biológicos do meio em estudo. Neste sentido, o trabalho desenvolveu atitudes conceitual, procedimental e atitudinal dos educandos.

Dos aspectos importantes das atividades realizadas foi à participação dos estudantes do período noturno, tendo em vista, que a maioria caracteriza-se como estudante-trabalhador, e a inclusão de estudantes com deficiência (Pessoas com Deficiência – PcD).

Outro aspecto relevante que merece ser enfatizado foi à melhoria na relação professor-aluno e, no que tange ao aprendizado, percebemos que os estudantes mostraram maior interesse e participação na disciplina de Biologia, pós-atividades



desenvolvidas.

Devido os bons resultados observados, destacamos que tais atividades devam ser implantadas e implementadas nas práticas pedagógicas desenvolvidas pelas instituições de ensino com mais frequência, seja qual for a disciplina ou área do conhecimento.

## REFERÊNCIAS

- BOGDAN, Robert C.; BIKLEN, Sari Knopp. **Investigação qualitativa em educação**: uma introdução à teoria e aos métodos. Porto: Porto Editora, 1991.
- BORDENAVE, Juan E. Díaz. **O que é participação**. São Paulo: Brasiliense, 1994.
- DURIGAN, Giselda. Métodos para análise de vegetação arbórea. In: CULLEN Jr, Larry; RUDRAN, Rudy; VALLADARES-PADUA, Cláudio (org.). **Métodos de estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná / Fundação O Boticário de Proteção a Natureza, 2004.
- ESGANZELA, João Américo; DUARTE, Leodenil Alves; OLIVEIRA, Wenderson Alves; PEDROTTI-MANSILLA, Débora Eriléia; HARDOIM, Edna Lopes; RINALDI, Carlos. A exsicata como uma estratégia para o ensino de Botânica. In: HARDOIM, Edna Lopes; RINALDI, Carlos; PEDROTTI-MANSILLA, Débora Eriléia (org.). **Possibilidades didáticas para as aulas de Ciências Naturais**. Cuiabá: Editora Print, 2014.
- GANDIN, Danilo; GANDIN, Luís Armando. **Temas para um projeto político pedagógico**. 3. ed. Petrópolis: Vozes, 1999.
- HARDOIM, Edna Lopes; FERREIRA, Lúrnio Antônia Dias; CASTRO, Edward Bertholine; MIYAZAKI, Rosina Djunko; FERREIRA, Maria Salete Ferraz Dias. As Ciências Naturais no ambiente doméstico: uma possibilidade de contextualização. In: HARDOIM, Edna Lopes; FERREIRA, Lúrnio Antônia Dias; CASTRO, Edward Bertholine; MIYAZAKI, Rosina Djunko; FERREIRA, Maria Salete Ferraz Dias (org.). **Biologia no cotidiano doméstico**: abordagens voltadas à educação básica. Cuiabá: Carlini & Caniato, 2010.
- KRASILCHIK, Myriam. Biologia: ensino prático. In: CALDEIRA, Ana Maria de Andrade; ARAUJO, Elaine S. Nicolini Nabuco (Orgs). **Introdução à didática da biologia**. São Paulo: Escrituras Editora, 2009. p. 249-258.
- SANTOS, Josefa Silva dos; GUARIM NETO, Germano. Plantas de quintais da área urbana de Comodoro, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora**, Vegetação e Etnobotânica, Cuiabá, v. 1, n. 9, p. 31-57, 2017.
- SEVERINO, Antonio Joaquim. **Metodologia do trabalho científico**. 23. ed. São Paulo: Cortez, 2007.
- SOLÉ, Isabel; COLL, César. Os professores e a concepção construtivista. In: COLL, César; MARTÍN, Elena; MAURI, Teresa; MIRAS, Mariana; ONRUBIA, Javier; SOLÉ, Isabel; ZABALA, Antoni (org.). **O construtivismo na sala de aula**. 6. ed. São Paulo: Ática, 2001.
- THIOLLENT, Michel. **Metodologia da pesquisa-ação**. 7. ed. São Paulo: Cortez, 1996.
- VIVEIRO, Alessandra Aparecida; DINIZ, Renato Eugênio da Silva. As atividades de campo no ensino de Ciências: reflexões a partir das perspectivas de um grupo de professores. In: NARDI, Roberto (org.). **Ensino de Ciências e Matemática I**: temas sobre formação de professores. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2010. p. 27-42.
- VIVEIRO, Alessandra Aparecida; DINIZ, Renato Eugênio da Silva. Atividades de campo no ensino de Ciências e na Educação Ambiental: refletindo sobre as potencialidades desta estratégia na prática escolar. **Ciência em Tela**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.

## ANÁLISE DA DIETA E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN: ESTUDO DE CASO-CONTROLE

### **Bruna Rongetta Torres**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Curso de Nutrição, graduanda. Botucatu-São Paulo

### **Amanda Daniel**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Pediatria, nutricionista, aprimorando. Botucatu-São Paulo

### **Natalia Tonon Domingues**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Pediatria, mestranda. Botucatu – São Paulo

### **Luiza Tavares Carneiro Santiago**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Pediatria, nutricionista, doutoranda. Botucatu – São Paulo

### **Cristina Helena Lima Delambert Bizzotto**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Pediatria, médica pediatra. Botucatu – São Paulo

### **Carlos Alexandre Hattori Tiba**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Pediatria, médico pediatra, mestre. Botucatu – São Paulo

### **Lidia Raquel De Carvalho**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Bioestatística, estatística, docente. Botucatu- São Paulo

### **Catia Regina Branco Da Fonseca**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Pediatria, pediatra, docente. Botucatu – São Paulo

**RESUMO:** Uma dieta balanceada é essencial para o crescimento e manutenção da saúde e pode trazer benefícios ainda mais importantes para crianças e adolescentes com Síndrome de Down (SD). Nós objetivamos comparar o estado nutricional e os componentes da dieta de dois grupos de crianças e adolescentes com e sem a SD. **Método:** Estudo caso-controle no Hospital das Clínicas de Botucatu, 2017-2018, com avaliação nutricional, entrevista e recordatório alimentar de 24 horas de três dias consecutivos. Grupo Caso: com SD; e Grupo Controle: sem SD. Os dados antropométricos e posterior classificação. O software NutWin e a Dietary Reference Intake foram utilizados para avaliar e classificar a adequação dos nutrientes da dieta de acordo com sexo e idade. A análise estatística foi realizada. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

**Resultados:** Os grupos consistiram de 39 e 37 incluídos; a idade média foi 68 e 50 meses (44,3 e 46,4 dp), respectivamente. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas quanto à ingestão de vitamina C e vitamina A, ingestão de proteína, lipídio, ferro e zinco, deficientes no grupo controle. O consumo de fibra foi baixo em ambos grupos. Obesidade e sobrepeso foram 23% e 30% nos grupos caso e controle, respectivamente, sem diferenças significantes entre os grupos. Apetite reduzido, aversão alimentar e alergia tiveram maior frequência no grupo controle. **Conclusão:** a adequação nutricional foi melhor no grupo com a SD. Sobrepeso e obesidade em ambos os grupos são preocupantes, assim como a baixa ingestão de fibras.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dieta, Alimento e nutrição; Síndrome de Down; Crianças; Adolescentes.

**ABSTRACT:** A well-balanced diet is essential for growth and health maintenance and it can bring even more important benefits for children and adolescents with Down Syndrome (DS). We objective to compare nutritional status and dietary components between two groups of children and adolescents either with or without DS. **Method:** Case-Control study was conducted in Botucatu Clinics Hospital, 2017 and 2018. The study was approved by the Research Ethics Committee. Subjects either with or without DS in two Groups. Case group: 39 subjects, children and adolescents. Control Group: 37 subjects, paired sample matched for age and sex. Clinical and nutritional assessment and 24-hour food recall with three-consecutive day dietary records, using NutWin software and Dietary Reference Intake to evaluate diet components and nutrient intake. Statistical analysis were performed. **Results:** Mean age of 68 and 50 months, respectively in the groups. In diet, vitamin C and vitamin A, is larger and more adequate to intake in the SD group. They were also significantly differences in the intake of proteins, lipids, iron and zinc (deficit in the control group). Fiber intake was low in both groups and worse in the control group. The diagnoses of obesity and overweight was 23% and 30% in both groups. Reduced appetite, food aversion and allergy were reported more often in the control group. **Conclusion:** Nutritional adequacy of nutrient intake was better in the DS group. Overweight and obesity in very early age are a matter of concern and it is a reality in childhood and adolescence these days.

**KEYWORDS:** Diet, Food and Nutrition; Down Syndrome; Children; Adolescents.

## 1 | INTRODUÇÃO

O Brasil, nos últimos 60 anos, sofreu transições importantes no país, sendo uma delas a nutricional, decorrente de um conjunto de mudanças nos padrões de consumo dietético junto a outros tipos de mudanças econômicas, sociais, demográficas e relacionadas à saúde (FRANÇA *et al.*, 2012). Durante as décadas de 70 e 80 a taxa de desnutrição no Brasil decaiu significativamente; em contrapartida, houve um aumento expressivo do sobrepeso/obesidade que se tornou um quadro epidêmico no país e contribuiu com o aumento das doenças crônicas não transmissíveis.

A obesidade é uma das doenças crônicas não transmissíveis, considerada como um dos principais fatores de risco responsáveis pela maioria das mortes e doenças no mundo (COUTINHO *et al.*, 2008). É caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo localizado em todo corpo (LIMA *et al.*, 2004), podendo ter uma causa multifatorial. Um dos fatores associados aos índices elevados de obesidade na população é a participação crescente na alimentação de gorduras em geral, alimentos industrializados ricos em açúcar e sódio e, a redução no consumo de cereais, leguminosas, frutas, verduras e legumes (COUTINHO *et al.*, 2008).

A industrialização dos alimentos tem sido apontada como uma das principais causas do aumento de densidade energética da dieta, sendo responsável pela epidemia de obesidade tanto quanto a elevação da quantidade de alimentos consumida, ou pela combinação dos dois, associada a outros fatores na alteração dos hábitos de vida das crianças, como por exemplo um maior sedentarismo (MENDONÇA & DOS ANJOS, 2004).

As crianças bem como os adultos ao consumirem mais alimentos industrializados e menos frutas, legumes e verdura in natura, apresentam também uma inadequação de ingestão de micronutrientes, fator também contribuinte para a obesidade, pois há evidências que muitos dos micronutrientes dietéticos têm importante função nos processos metabólicos e endócrinos, e que seriam controladores do excesso de peso. Assim, crianças e adolescentes devem ter uma dieta balanceada e hábitos alimentares saudáveis, para que os níveis de macro e micronutrientes estejam equilibrados e levem à uma melhor qualidade de vida e a um adequado estado nutricional (LEÃO & SANTOS, 2012).

As crianças com síndrome de Down (SD) apresentam necessidades nutricionais específicas decorrentes das alterações em seu organismo que são inerentes à condição genética, como alterações digestivas, de mastigação e deglutição, podendo levar de forma mais habitual deficiências nutricionais se não houver uma adequada orientação e vigilância sobre sua alimentação (AQUINO, 2013a). Essas alterações nutricionais podem, ao longo da vida, resultar em maior tendência à obesidade e à constipação intestinal crônica quando comparados a crianças sem a síndrome.

Desta forma consideramos importante a avaliação criteriosa da alimentação e das necessidades nutricionais específicas de crianças e adolescentes com a SD, considerando seu estado nutricional e a composição dietética de macro e micronutrientes, a fim de conseguir orientar, de forma eficiente, uma alimentação mais equilibrada buscando garantir a ingestão diária adequada para cada idade e sexo.

Assim o presente estudo teve como objetivo avaliar o estado nutricional e a composição da dieta de crianças e adolescentes com e sem a Síndrome de Down em seguimento ambulatorial no Hospital das Clínicas de Botucatu.

## 2 | MÉTODO

Após a aprovação pelo Comitê de Ética da FMB-UNESP (Nº CAAE 62014216.0.0000.5411/2017) foi iniciado o estudo do tipo Caso-Controle, com coleta de dados primários, avaliação nutricional e avaliação clínica realizadas nos ambulatórios de puericultura e pediatria genética do Hospital das Clínicas de Botucatu (HCFMB). Os dados para o presente estudo foram obtidos no período de janeiro de 2017 a abril de 2018. O grupo “caso” consistiu de crianças e adolescentes com a SD e, o grupo “controle” de amostra pareada por sexo e díade sem o diagnóstico da SD. Em ambos os grupos houve o consentimento dos responsáveis em participar do estudo com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foi realizada entrevista com os pais/responsáveis dos incluídos com coleta de dados primários por meio de protocolo de pesquisa previamente estruturado. Para a avaliação da dieta foi aplicado o recordatório de 24h de três dias consecutivos anteriores a consulta (BUZZARD, 1998), com ao menos um dia de final de semana e a avaliação da quantidade de nutrientes a partir do referido foi calculada com o uso do Programa de Apoio a Nutrição – NutWin [software] (ANÇÃO *et al.* 2002) e, classificada em adequação, déficit ou excesso de acordo com o nutriente e faixa etária segundo o Dietary Reference Intakes (DRIs), preconizadas pelo National Research Council (2000,2001 e 2002).

A avaliação clínica foi realizada por meio da antropometria (aferição do peso e estatura) no dia da aplicação do protocolo de pesquisa e recordatório de 24 horas. O diagnóstico nutricional foi realizado segundo os padrões estabelecidos pela OMS de 2006 e os valores de % IMC e z-escore IMC, determinados por meio do *software* WHO AnthroPlus ou WHO Antrho (WHO, 2009) para ambos os grupos, afim de que fosse possível a comparação entre eles.

O Banco de Dados foi digitado em planilha elaborada no Programa Excel 2007 e foram realizadas análises estatísticas com nível de significância utilizado de 5% (FISHER, 1993). Para comparação entre os grupos foram utilizados os testes Qui-quadrado e, o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídos 37 crianças e adolescentes nos grupos caso e controle. No grupo caso a idade da população foi variável entre 2 meses e 14 anos de idade, sendo que 18,9 % eram menores de 1 ano; 54,0% entre 1 e 5 anos e 21,6% entre 5 e 10 anos de idade, neste grupo 5,4% eram adolescentes; já no grupo controle as idades variaram de 3 meses a 14 anos de idade, sendo que 5,4% eram menores de 1 ano, 43,2% entre 1 e 5 anos e 35,1% entre 5 e 10 anos de idade, adolescentes foram 16%. Não houve diferença estatística significativa quando comparadas as idades entre os grupos.

O gráfico 1 mostra distribuição por sexo dos grupos, sem diferença estatística entre eles ( $p=0,40$ ).

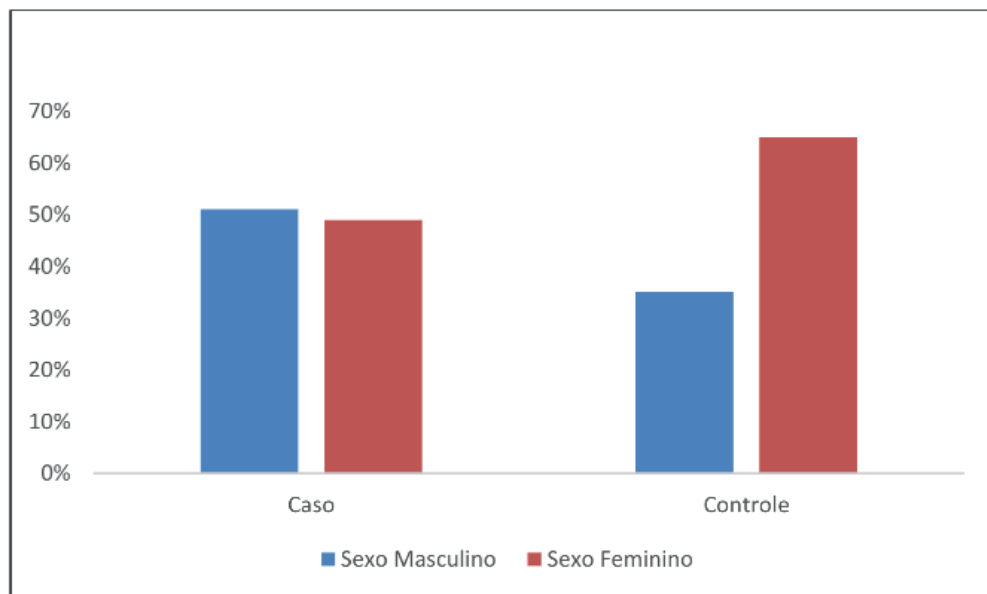


Gráfico 1. Distribuição de sexo segundo grupos do estudo ( $p=0,4$ ).

A tabela 1 apresenta as condições de nascimento, aleitamento materno e hábitos alimentares, comparando os dois grupos do estudo.

A média de tempo de aleitamento foi de 6,5 meses no grupo caso e 7,2 meses no grupo controle e, a introdução dos novos alimentos no grupo caso teve média de 6,2 meses, e variação entre 3 e 12 meses, sem diferença estatística com o grupo controle (média de 6,56 meses).

Os dados de baixo peso ao nascer e prematuridade encontrados em nosso estudo, principalmente no grupo com SD superam os percentuais nacionais.

A prematuridade e o baixo peso ao nascer estão associados com os elevados níveis de mortalidade infantil mundialmente, representando uma taxa de 70% dos óbitos relatados. O baixo peso ao nascer pode influenciar tanto o crescimento quanto o desenvolvimento da criança, além de incremento no risco de desenvolvimento de doenças na fase adulta (PEDRAZA *et al.*, 2014). No Brasil a taxa de prematuridade ao redor de 11,5%, é um valor que se aproxima do dobro se comparado à países desenvolvidos como a Inglaterra (BRASIL, 2018), dados que geram preocupação com a saúde dos prematuros e que demonstra maior atenção ao cuidado pré-natal através de ações no setor público no país.

O aleitamento materno deve ser estimulado e apoiado a acontecer de forma exclusiva até os seis meses de idade e complementar até os dois anos de idade, pois além de fatores emocionais à mãe e à criança, como a criação de um maior vínculo, também é benéfico para a saúde física da díade, diminui a incidência de doenças infecciosas, autoimunes e os riscos para diversas doenças durante a infância e a fase adulta (GARTNER *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010).

Variáveis	Grupo				p
	Caso		Controle		
	N	%	N	%	
Baixo Peso	16	43,2	7	18,9	<b>0,02</b>
Prematuridade	12	32,4	6	16,2	0,10
Gestação Única	37	100	35	94,5	0,15
Parto Cesárea	20	54,0	29	78,3	<b>0,03</b>
Má formação ao nascimento	13	35,1	8	21,6	0,20
Cardiopatia atual	20	54,0	1	2,7	<b>&lt;0,0001</b>
Doença atual	23	62,1	9	24,3	<b>0,001</b>
Internação neonatal	19	51,3	16	43,2	0,48
Internação primeiro ano	21	56,7	14	37,8	0,10
TSH alterado no teste de triagem neonatal	4	10,8	2	5,4	0,39
Aleitamento exclusivo	21	56,7	21	56,7	1,00
Introdução alim. complementar adequado	20	56,4	28	75,6	<b>0,04</b>
Rejeição alimentar	24	64,8	30	81,0	0,12
Aversão alimentar	1	2,7	12	32,4	<b>0,001</b>
Hábito intestinal não adequado	12	32,4	10	27,0	0,61

Tabela 1 – Distribuição nos dois grupos do estudo quanto às condições de nascimento, internações, aleitamento materno e alimentação, Botucatu/SP, 2017-18.

Houve no Brasil, um aumento da duração do aleitamento materno, de acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) em 1974 o aleitamento exclusivo ocorria em média por dois meses e meio sendo que em média apenas 2% das crianças com seis meses de idade recebiam de forma exclusiva o leite materno, enquanto que em 2006 este índice subiu para 39% (WHO, 2001). Cerca de 40% das crianças brasileiras recebem aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade e, de forma complementada 50% recebem o leite materno até os doze meses (BRASIL, 2009).

Nos dois grupos do estudo o aleitamento materno exclusivo teve índices semelhantes, e, apesar de esses resultados ainda estarem aquém das recomendações internacionais (WHO, 2001), eles se mostraram superiores aos encontrados na pesquisa realizada na campanha de vacinação de 2006 no Brasil, e sinalizam a qualidade da produção do cuidado à criança assistida, particularmente quanto às ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno (BRASIL, 2008).

Após o aleitamento exclusivo por seis meses deve ser introduzida de forma lenta e gradual a alimentação complementar, introduzindo alimentos variados, seguindo as quantidades e consistência recomendadas a cada faixa etária (BRASIL, 2013).

É durante a fase de introdução a novos alimentos da dieta que os hábitos alimentares são construídos, sendo assim, é de extrema importância que os pais e os profissionais de saúde ajudem as crianças a desenvolverem hábitos saudáveis, que durante esse processo devem apresentar alimentos variados, para que no futuro, as crianças e os adolescentes consumam diferentes alimentos e de forma equilibrada, não apenas baseado em suas preferências alimentares, como no caso dos pré-escolares, que costumam consumir alimentos ricos em carboidratos, gorduras, açúcar e sal e tem um baixo consumo de alimento rico em fibras, como frutas, legumes e verduras, o que pode favorecer a obesidade e/ou problemas relacionados ao bom funcionamento do trato gastrointestinal (RAMOS & STEIN, 2000).

Em nosso estudo os resultados mostram uma boa introdução dos alimentos, em idade adequada, melhor no grupo controle ( $p=0,04$ ) e baixa aversão e rejeição no grupo de crianças com a SD, indicando talvez uma maior preocupação dos pais e dos profissionais de saúde com a alimentação destas crianças, o mesmo não ocorrendo do grupo controle, com alta frequência de aversão e rejeição alimentar (este estatisticamente significativo,  $p=0,001$ ), sendo as aversões, em sua grande maioria à alimentos de origem vegetal.

Esta maior preocupação com a alimentação das crianças e adolescentes com a SD pode ser decorrente do fato destes terem nascido prematuros e com cardiopatia, além do fato do relato dos pais/responsáveis destes terem alguma doença atual.

Apesar de não ser significativa a diferença entre os dois grupos quanto à presença de hábito intestinal não adequado, este fato é decorrente de uma ingestão dietética pobre em fibras, muito ruim nos dois grupos, porém ainda pior no grupo controle, como mostrado na tabela 2 a seguir.

De acordo com a análise feita sobre a dieta das crianças e adolescentes, no grupo controle verificou-se o consumo em excesso de calorias (51,3%) (média de 1353 kcal/dia), carboidratos (67,5%) (média de 175 g/dia) e lipídios (48,6%) (média de 46 g/dia) e um déficit de proteínas (59,4%) (média de 57,46 g/d) e de fibras (89,1%) (média de 10,97 g/dia). Enquanto que no grupo com a SD verificou-se o consumo em excesso de calorias (61,5%) (média de 1232,4 Kcal/d), carboidratos (48,7%) (média de 160,2 g/d), lipídios (46,1%) (média de 40,5 g/d) e proteínas (64,1%) (média de 55,4 g/d) e, o déficit de fibras (66,6%) (média de 15 g/d), sendo entre os grupos a diferença significativa para a ingestão de fibras (tabela 2).



Variável	Grupo caso			Grupo controle			P
	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mediana	1º quartil	3º quartil	
Caloria	1259,8	937,1	1442,4	1297,3	999,7	1529,1	0,500
Proteína	61,4	38,9	69,5	53,6	35,8	64,5	0,490
Carboidrato	156,4	109,6	206,8	172,6	141,3	209,5	0,480
Lipídios	39	32,6	45,5	42,6	29,1	55,9	0,410
Fibras	13,1	9	20	9,8	5,6	15,1	<b>0,020</b>

Tabela 2. Mediana, 1º e 3º quartil, referentes às variáveis de macronutrientes segundo grupos, 2017-18, Botucatu/SP.

Há alguns estudos como de Aquino (2013b) comprovando que crianças e adolescentes com a síndrome de Down possuem uma maior propensão à obesidade ainda durante a infância, e isso pode ocorrer, além do fato da baixa estatura, característica da SD, também devido à uma dieta inadequada e desbalanceada em macronutrientes, com consumo em excesso de alimentos ricos em carboidratos.

Quanto ao consumo de micronutrientes na dieta dos incluídos no grupo controle, verificou-se o consumo adequado de Zinco (67,5%) (média de 7,34 mg/dia) e vitamina C (59,4%) (média de 64,98 mg/dia) e um déficit de ferro (51,3%) (média de 9,41 mg/dia) e de vitamina A (67,5%) (média de 446,38 mcg/dia). Quando considerada a dieta das crianças e adolescentes com a SD a ingestão de ferro foi adequado (69,2%) (média de 9,6 mg/d) e foi verificada uma dieta com déficit zinco em crianças acima dos 5 anos de idade. Houve diferença significativa na ingestão de vitamina C e de vitamina A, sendo maior e mais adequada no grupo das crianças com a SD, como mostra a tabela 3.

A ingestão adequada dos micronutrientes é um ponto muito importante para o adequado crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes, uma vez que a multideficiência de minerais pode acarretar aumento na suscetibilidade a infecções, afetando a eficácia de intervenções terapêuticas. Para crianças com a síndrome de Down essa preocupação é ainda maior, sendo recomendada uma maior atenção no consumo de zinco e selênio, minerais que têm efeito antioxidante, sendo esses nutrientes adquiridos por meio da alimentação (AQUINO, 2013b).

Variável	Grupo caso			Grupo controle			P
	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mediana	1º quartil	3º quartil	
Zinco	8,4	5,8	9,8	6,4	4,2	8,6	0,100
Ferro	9,3	6,8	11,2	9	6,2	11	0,660
Vitamina C	103,3	46,9	137,9	50,5	18,4	77	<b>0,007</b>
Vitamina A	486,4	288,5	959	291,3	171,7	507,1	<b>0,008</b>

Tabela 3. Mediana, 1º e 3º quartil, referentes às variáveis de micronutrientes segundo grupos, 2017-18, Botucatu/SP.

Quanto à classificação dos dados antropométricos e o estado nutricional das

crianças dos grupos do estudo é relevante a porcentagem de diagnósticos de risco de sobrepeso, sobrepeso e obesidade que somados resultam em 40,5% em ambos os grupos, valor próximo ao encontrado para eutrofia dos dois grupos. Houve 8 crianças classificadas com magreza, sendo 2 no grupo caso e 6 no grupo controle (tabela 4).

Diagnóstico nutricional	Grupo Caso		Grupo Controle		Total	
	N	%	N	%	N	%
Magreza	2	5,4	6	16,2	8	10,8
Eutrofia	20	54,0	16	43,3	36	48,6
Risco de sobrepeso	7	18,9	5	13,5	12	16,2
Sobrepeso	4	10,8	3	8,10	7	9,45
Obesidade	4	10,8	7	18,9	11	14,8
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>100,0</b>	<b>37</b>	<b>100,0</b>	<b>74</b>	<b>100,0</b>

Tabela 4. Distribuição de frequências dos indivíduos segundo grupos e diagnóstico nutricional (p=0,28).

Crianças e adolescente com a Síndrome de Down, devido às suas alterações genéticas específicas, pertencem a uma população ímpar nos quais observa-se maior prevalência de excesso de peso e obesidade em relação aos que não tem a síndrome (SILVA *et al.*, 2006).

As mudanças no perfil nutricional decorrem da urbanização e da industrialização, que levam ao aumento da ingestão de calorias e à diminuição da atividade física, com consequente acúmulo de gordura (CASTILHO, 2014) na população em geral, devendo, portanto, haver preocupação com a dieta de todas as crianças e adolescentes.

O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade em idades cada vez mais precoces tem despertado a preocupação de pesquisadores e profissionais da área de saúde, em razão dos danos e agravos à saúde com aumento do risco cardiovascular provocados pelo excesso de peso, tais como hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, dentre outras (ENES, 2010). As crianças com a SD têm maior propensão à obesidade, devido a uma taxa de metabolismo mais lenta, por compulsão alimentar e menor saciedade e hipotonia muscular, incluindo os envolvidos na digestão (MOURA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2006).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adequação nutricional de ingestão de nutrientes da dieta foi melhor no grupo com SD, talvez devido maior empenho e preocupação dos pais e dos profissionais de saúde sobre as suas dietas.

Sobrepeso e obesidade em idade tão precoce em ambos os grupos é

preocupante, e uma realidade na infância e adolescência nos dias atuais.

A baixa ingestão de fibras observada em nosso estudo revela uma dieta desbalanceada e com baixa ingestão de frutas e vegetais, e já mostra repercussões nos hábitos intestinais destas crianças e adolescentes.

#### 4.1 Limitações do estudo

Os dados devem ser analisados de maneira cautelosa, uma vez que o “n” de incluídos é pequeno e, por se tratar de um levantamento de dados em ambulatório de assistência. Ampliação do estudo para redução de potencial confundidores está previsto e devem ser oportunamente apresentados.

### AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP e à FAPESP, pelo apoio com bolsas de Iniciação Científica, à todas as crianças e aos adolescentes e aos seus pais, que concordaram em participar deste estudo.

### CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

### REFERÊNCIAS

ANÇÃO, M. S. et al. **Sistema de Apoio à decisão em Nutrição**: versão 2.5. São Paulo: Centro de Informática em Saúde, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 2002.

AQUINO, C. **Pesquisas sobre síndrome de Down no mundo**. Rio de Janeiro: Movimento Down, 2013a. Disponível em: <<http://www.movimentodown.org.br/2013/01/pesquisas-sobre-sindrome-de-down-nomundo>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

AQUINO, C. **Alimentação de crianças com síndrome de Down**. Rio de Janeiro: Movimento Down, 2013b. Disponível em: <<http://www.movimentodown.org.br/2013/02/alimentacao-de-criancas-com-sindormede-down/>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher. **PNDS-2006: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança**. Brasília: Ministério da Saúde/Centro Brasileiro de Saúde e Planejamento, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **II pesquisa de prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Dez passos para uma alimentação saudável**: guia alimentar para crianças menores de dois anos: um guia para o profissional da saúde na atenção básica. 2. ed. 2. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Criança**: orientações para

implementação. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BUZZARD, M. 24-hours dietary recall and food record methods. In: WILLETT, W. C. **Nutritional epidemiology**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 50-73.

COUTINHO, J. C.; GENTIL, P. C.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, supl. 2, p. S332-S340, 2008.

ENES, C. C; SLATER, B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. **Rev Bras Epidemiologia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p.163-171, 2010.

FISHER, L.D. Biostatistics - **A Methodology for the Health Sciences**. Wiley-interscience, New York, 1993, 991p.

FRANÇA, F. C. O. et al. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. In: SEMINÁRIO ALIMENTAÇÃO E CULTURA NA BAHIA, 1., 2012, Feira de Santana. **Anais...**. Feira de Santana: UEFS, 2012. p. 1-7. Disponível:<[http://www2.uefs.br:8081/cer/wp-content/uploads/FRANCA\\_Fabiana.pdf](http://www2.uefs.br:8081/cer/wp-content/uploads/FRANCA_Fabiana.pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2017.

GARTNER, L.M.; MORTON, J.; LAWRENCE, R.A.; NAYLOR A.J.; O'HARE, D.; SCHANLER, R.J.; et al. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics** v.115, p.496-506, 2005.

LEÃO, A. L. M.; SANTOS, L. C. Consumo de micronutrientes e excesso de peso: existe relação?. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 85-95, 2012.

LIMA, S. C. V. C.; ARRAISII, R. F.; PEDROSA, L. F. C. Avaliação da dieta habitual de crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 469-477, 2004 .

MENDONÇA, C. P.; DOS ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 698-709, 2004.

MOURA, A.B. et al. Aspectos nutricionais em portadores da Síndrome de Down. **Cad. Escola Saúde**, Curitiba, v.2, p.1-11, 2009.

PEDRAZA, D. F. et al. Baixo peso ao nascer no Brasil: revisão sistemática de estudos baseados no sistema de informações sobre nascidos vivos. **Pediatr. Mod.**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 51-64, 2014.

PEREIRA, R.S.V. DE OLIVEIRA, M.I.C.; ANDRADE, C.L.T.; BRITO, A.S. Fatores associados ao aleitamento materno exclusivo: o papel do cuidado na atenção básica. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, p.2343-54, 2010.

RAMOS, M.; STEIN, L. M. Desenvolvimento do comportamento alimentar infantil. **J. Pediatr.**, v. 76, supl. 3, p. S229-S237, 2000.

SILVA, D. L.; SANTOS, J. A. R.; MARTINS, C. F. Avaliação da composição corporal em adultos com Síndrome de Down. **Arq. Med.**, Porto, v. 20, n. 4, p. 103-110, 2006

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Anthroplus for personal computers**: software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: <[https://www.who.int/growthref/tools/who\\_anthroplus\\_manual.pdf](https://www.who.int/growthref/tools/who_anthroplus_manual.pdf)>. Acesso em: 15 Abr. 2019.

WHO. World Health Organization. **Report of an expert consultation on the optimal duration of exclusive breastfeeding**. Geneva: World Health Organization; 2001.

## AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FOLHAS DE *PIPTADENIA STIPULACEA*

### **Geovanna Hachyra Facundo Guedes**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE  
Recife, Pernambuco

### **Bruno Mendes Tenorio**

Universidade da Paraíba, Departamento de  
Morfologia, UFPB

### **José Anderson da Silva Gomes**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Letícia Simone Melo dos Santos**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Marcos Aurélio Santos da Costa**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Maria Luísa Figueira de Oliveira**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Matheus Carvalho Brito Leite**

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE  
Recife, Pernambuco

### **Renatha Claudia Barros de Sobreira**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Tainá Maria Santos da Silva**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e embriologia, UFPE

### **Carolline Guimarães D'Assunção**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,  
UFRPE

### **Cintia Giselle Martins Ferreira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,  
UFRPE

**RESUMO:** O presente trabalho descreve a investigação do potencial toxicológico do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea*, através da ensaio de fragilidade osmótica dos eritrócitos de carneiro. O material vegetal foi coletado, posteriormente a obtenção do extrato. Após isso, amostras de sangue de carneiro comercial (Laborclin®) (25 $\mu$ L) foram expostas ao extrato, durante 30 minutos a temperatura ambiente em diferentes concentrações: 50 $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 250 $\mu$ g/mL, 500 $\mu$ g/mL, 750  $\mu$ g/mL e 1000 $\mu$ g/mL diluídas em solução isotônica de cloreto de sódio 0,9%. As soluções com as amostra foram centrifugadas a 2500rpm, por 3 minutos a 25°C. Em seguida, foi preparado um esfregaço em lâmina de vidro e as preparações histológicas foram coradas, e então observadas através de microscópio óptico conectado a Câmera Leica DFC-280 em aumento de 1000x. O extrato etanólico de folhas de *P. stipulacea* nas diferentes concentrações (50 $\mu$ g/mL,

100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL e 1000µg/mL), não apresentou fragilidade osmótica, quando avaliado, qualitativamente, pela tonalidade avermelhada (hemólise) no sobrenadante obtido após a centrifugação. As observações histológicas das preparações dos esfregaços do sangue de carneiro após o tratamento com o extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* não causou fragilidade osmótica nos eritrócitos do ensaio de fragilidade osmótica, quando comparado com os grupos controles. O ensaio de toxicidade *in vitro* com o extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* não apresentou atividade hemolítica, nem alterações na morfologia dos eritrócitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxicidade, *Piptadenia satipulaceae*, fragilidade osmótica.

### CYTOTOXIC EVALUATION OF THE LEAVES OF *Piptadenia stipulacea*

**ABSTRACT:** The present work describes the investigation of the toxicological potential of the ethanolic extract obtained from *P. stipulacea* leaves through the osmotic fragility assay of lamb erythrocytes. Initially the vegetal material was collected for later obtainment of the extract. After that, samples of commercial lamb blood (Laborclin®) (25 µL) were exposed to the extract for 30 minutes at room temperature in different concentrations diluted in 0.9% isotonic NaCl solution: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL and 1000µg/mL. Solutions with samples were centrifuged at 2500 rpm for 3 minutes at 25 ° C. Afterwards, a thin smear was prepared and the histological preparations were stained. These histological preparations were observed by light microscopy connected to a Leica DFC-280 Camera in a 1000x magnification. The ethanolic extract of leaves of *P. stipulacea* at different concentrations (50µg / mL, 100µg / mL, 250µg / mL, 500µg / mL, 750µg / mL and 1000µg / mL) did not provoked osmotic fragility when evaluated qualitatively through the red tonality (hemolysis) of the supernatant obtained after centrifugation. Histological observations of lamb blood thin smears after treatment with the ethanolic extract of *P. stipulacea* leaves showed no morphological changes in the erythrocytes of the osmotic fragility assay as compared to the control groups. The *in vitro* toxicity test with the ethanolic extract of leaves of *P. stipulacea* did not show hemolytic activity nor alter erythrocyte morphology.

**KEYWORDS:** Toxicity. *Piptadenia satipulaceae*. Osmotic fragility.

## 1 | INTRODUÇÃO

O interesse popular no uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido muito significativo nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. De acordo com a OMS, entre 60- 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças<sup>1</sup>.

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana,

antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certas drogas vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos<sup>2</sup>.

Muitos testes comprometidos com a análise de agentes tóxicos utilizam animais de laboratório. Entretanto, existe uma busca crescente por métodos *in vitro* que não utilizem animais em sua execução<sup>4</sup>. Laboratorialmente, o ensaio de hemólise *in vitro* vem sendo utilizado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais e de utilidade pecuária, exibindo-se positivo, principalmente, as espécies que apresentam saponinas em sua composição<sup>16</sup>.

A Fabaceae é uma grande família de ervas, arbustos e árvores com grande variedade de habitats, incluindo aquáticas, xerófitas e trepadeiras. Tem distribuição cosmopolita nas zonas tropicais, subtropicais e temperadas<sup>5</sup>. E é constituída por 476 gêneros e 13.855 espécies<sup>6</sup>.

O gênero *Piptadenia* possui cerca de 80 espécies de árvores, arbustos e trepadeiras<sup>7,8</sup>. No Brasil, as espécies desse gênero estão presentes nos estados Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo<sup>7</sup>.

A espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke é uma árvore típica da Caatinga do Nordeste Brasileiro<sup>9</sup> (Figura 1), amplamente distribuída no bioma caatinga, do Piauí à Bahia<sup>10</sup> e é conhecida popularmente como “jurema branca”<sup>11</sup>. Essa espécie é muito usada na medicina popular no tratamento dos processos inflamatórios e estudos científicos confirmam sua atividade antimicrobiana e antifúngica<sup>12</sup>.

As cascas do caule e folhas de *P. stipulacea* são usadas na medicina popular na forma de tintura ou decocto para tratar feridas<sup>9</sup>, sendo indicado como cicatrizante<sup>13</sup>. Estudos farmacológicos indicam que alguns extratos de *P. stipulacea* são eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecius* e *Neurospora crassa*<sup>12</sup> e que o extrato etanólico das folhas dessa espécie foi ativo contra *Klebsiella pneumoniae* resistentes a várias drogas e contra cepas de *Candida albicans*<sup>13</sup>, além disso recentemente foi demonstrado que as frações acetato de etila e aquosa obtidas das partes aéreas desta espécie apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos<sup>14</sup>.

Após levantamento da literatura, poucos estudos farmacológicos foram encontrados, sendo assim para maior compreensão da atividade toxicológica desta espécie, este trabalho tem o objetivo de investigar o potencial toxicológico do extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* através do ensaio *in vitro* de fragilidade osmótica em eritrócitos de carneiro, teste capaz de promover uma avaliação preliminar da toxicidade de extratos vegetais.



Figura 1: *Piptadenia stipulacea*

Fonte: Plantas do Brasil, 2012.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Extrato Etanólico das Folhas

O extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* utilizado no experimento foi doado pelo Laboratório de Cancerologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

### 2.2 Ensaio de Fragilidade Osmótica

A técnica de fragilidade osmótica realizada baseou-se na metodologia descrita por Dacie e Lewis (1975). Amostras de sangue de carneiro comercial (Laborclin®) (25 $\mu$ L) foram expostas ao extrato, durante 30 minutos a temperatura ambiente em diferentes concentrações sendo estas de, 50 $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 250 $\mu$ g/mL, 500 $\mu$ g/mL, 750  $\mu$ g/mL e 1000 $\mu$ g/mL diluídas em solução isotônica de cloreto de sódio 0,9%. Em seguida, as soluções com as amostras foram centrifugadas à 2500rpm, por 3 minutos a 25°C. O controle negativo foi realizado com solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% e o controle positivo com água destilada, os quais receberam os mesmos procedimentos empregados nas amostras testes. O ensaio foi realizado em triplicata e o percentual hemolítico foi estabelecido com controle positivo sendo designado como 100%. O grau de hemólise foi avaliado, qualitativamente, pela tonalidade avermelhada (hemólise) no sobrenadante obtido após a centrifugação. Foram atribuídas “cruzes” a intensidade de hemólise, onde uma cruz (+) indica ligeira hemólise, duas cruzes (++) hemólise significativa e três cruzes (+++) indicam hemólise intensa.

### 2.3 Observação Morfológica dos eritrócitos.

As amostras dos pellets centrifugadas dos grupos controle negativo, controle positivo e o tratado com o extrato etanólico de folhas de *P. stipulacea*, foi realizado



esfregação em lâmina de vidro e as preparações histológicas coradas através de técnica Coloração de hematoxilina e eosina. Preparações histológicas foram observadas através de microscópio óptico conectado a Câmera Leica DFC-280 em aumento de 1000x. Para cada grupo foi analisado o aspecto morfológico e/ ou hemólise dos eritrócitos.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Ensaio de Fragilidade Osmótica

O extrato etanólico de folhas de *P. stipulacea* nas diferentes concentrações (50µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL e 1000µg/mL), não apresentou fragilidade osmótica, quando avaliado, qualitativamente, pela tonalidade avermelhada (hemólise) no sobrenadante obtido após a centrifugação, permanecendo límpida a solução de soro fisiológico, caracterizando integridade das hemácias, que permaneceram no fundo dos tubos, com formação de um precipitado, sem que tenha havido a lise das células. A tabela 1 representa os resultados do ensaio da fragilidade osmótica atribuídas por sinais: mais (+) ou menos (-). Intensidade de hemólise onde uma cruz (+) indica ligeira hemólise ou menos (-) indica ausência hemólise.

A ação hemolítica dos diferentes compostos tóxicos é atribuída a vários mecanismos inespecíficos. Como por exemplo, os compostos surfactantes, que produzem seu efeito hemolítico por meio da solubilização da membrana plasmática do eritrócito, ou pela lise osmótica, que promove alterações na permeabilidade da membrana plasmática da hemácia<sup>15</sup>.

Em contrapartida, os compostos xenobióticos reduzidos, como os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando meta-hemoglobulina<sup>3</sup>.

Em nosso estudo não foi demonstrada atividade hemolítica do extrato etanólico de folhas de *P. stipulacea* nas concentrações testadas.

Entretanto este resultado, não exclui a existência de toxicidade, uma vez que maiores concentrações de extrato ainda não foram testadas e poucos estudos farmacológicos com a espécie que é encontrada na literatura.

Grupos	Concentrações (µg/ml)	Hemólise
Extrato de <i>P. stipulacea</i>	50	-
	100	-
	250	-
	500	-
	750	-
	1000	-
Controle (+)	Água Destilada	+

Tabela 1: Ensaio da Fragilidade osmótica do sangue de carneiro tratado com do extrato etanólico de folhas de *P. stipulacea*

Legenda: (-) ausência de hemólise, (+) ligeira hemólise, (++) hemólise significativa, (+++) hemólise intensa.

### 3.2 Estudo morfológico dos eritrócitos.

Observações histológicas são importantes ferramentas para detectar alterações histofisiológicas nas funções dos órgãos, tecidos e células.

A observação morfológica dos eritrócitos obtidos de sangue de carneiro após tratamento com o extrato etanólico de folhas de *P. stipulacea* está representado na figura 2 (A, B, C, D, E, F, G, H). As observações histológicas das preparações dos esfregaços do sangue de carneiro após o tratamento com o extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* não mostrou qualquer alterações morfológicas nos eritrócitos do ensaio de fragilidade osmótica, quando comparado com o grupo controle negativo (figura 2G), com o grupo controle positivo (figura 2H).

O ensaio de toxicidade *in vitro* com o extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* não evidenciou alterações na morfologia eritrocitária. Desta forma, este estudo demonstrou ausência de dano à membrana eritrocitária. Estudos similares verificaram alterações no perfil osmótico em eritrócitos quando incubados com extratos vegetais<sup>17, 18</sup>. É afirmativo, portanto, que eritrócitos incubados com produtos naturais podem sofrer um distúrbio em sua estrutura e citoesqueleto causado por alteração do coeficiente de partição na membrana destas células<sup>19</sup>. Desta maneira, alterações provocadas na estrutura da membrana plasmática modificam o transporte de íons, causando ou não a lise celular, estudos obtiveram aumento e diminuição da fragilidade osmótica, devido ação de extratos de *Indigofera suffruticosa* e *Turnera subulata*, respectivamente<sup>20, 21</sup>. A liberação de hemoglobina no plasma ocasionada pela hemólise, que consiste na lise eritrocitária, pode gerar situações de riscos ao organismo, entre elas danos aos rins (nefrotoxicidade), e ao coração (efeito vasomotor). A liberação de íons potássio resultante de processos hemolíticos somada a rápida liberação de  $K^+$  no meio extracelular, ainda pode levar à parada cardíaca e a morte<sup>22</sup>, em vista disso negativa atividade hemolítica encontrada neste estudo, pode ser um indicativo de atividade protetora do extrato de *P. stipulacea*, considerando-se que a citotoxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos nos permite investigar tanto o efeito tóxico como protetor de princípios ativos sobre a membrana celular<sup>23</sup>. A ação hemolítica dos diferentes compostos vegetais é atribuída a vários mecanismos inespecíficos, como por exemplo, os compostos surfactantes que produzem seu efeito hemolítico por meio da solubilização da membrana plasmática, ou pela lise osmótica, promovendo alterações na permeabilidade das hemácias<sup>15</sup>. Desta forma, em nossos dados é provável que não haja dano à membrana eritrocitária.

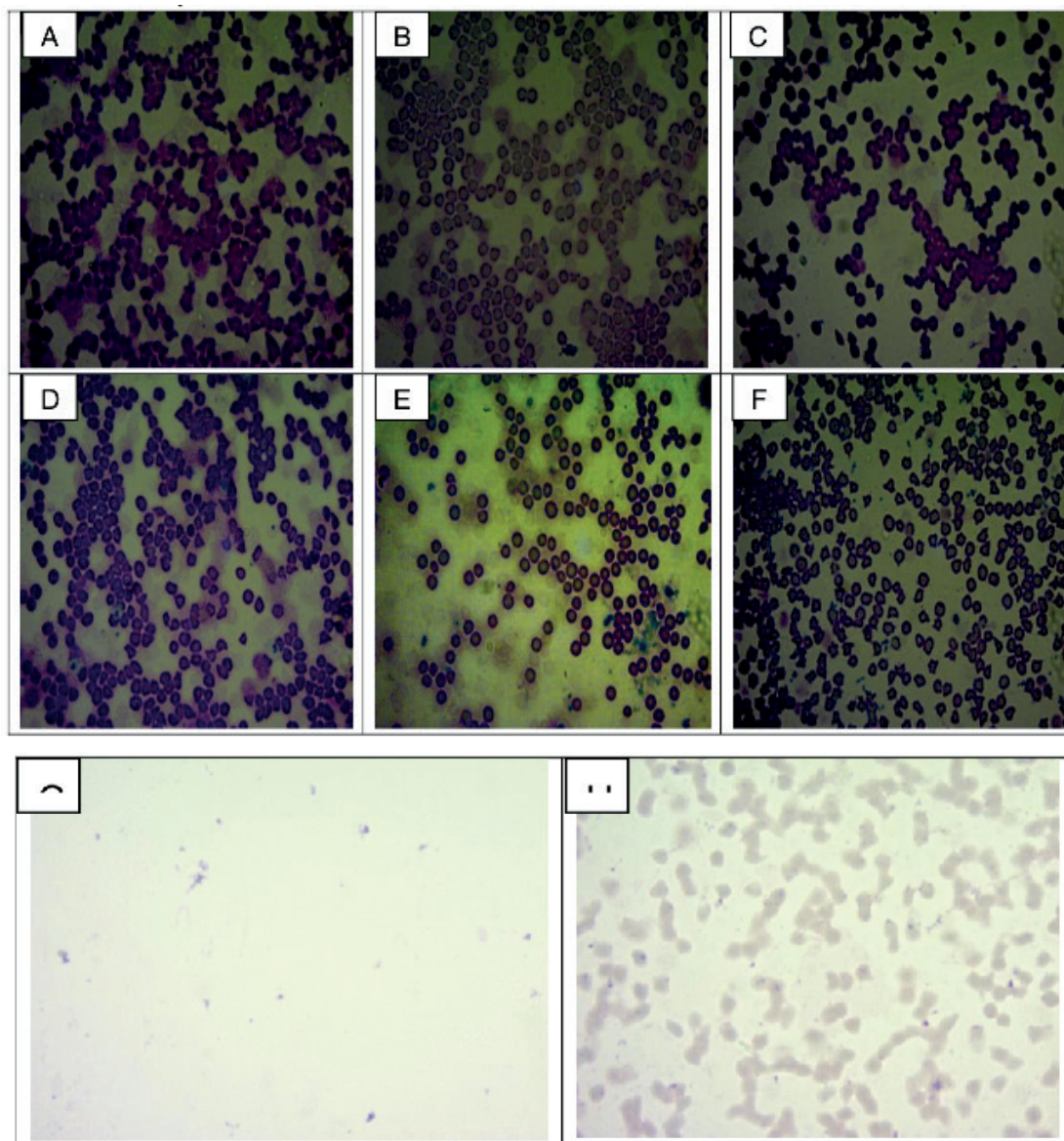


Figura 2 - Fotomicrografia de eritrócitos de sangue de carneiro: (A) Extrato na concentração de  $50\mu\text{g/mL}$ , (B) Extrato na concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ , (C) Extrato na concentração de  $250\mu\text{g/mL}$ , (D) Extrato na concentração de  $500\mu\text{g/mL}$ , (E) Extrato na concentração de  $750\mu\text{g/mL}$  (F) Extrato na concentração de  $1000\mu\text{g/mL}$  (G) Controle Negativo (H) Controle Positivo Coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 100x.

#### 4 | CONCLUSÕES

O ensaio de toxicidade *in vitro* com o extrato etanólico das folhas de *P. stipulacea* não apresentou atividade hemolítica, nem alterações na morfologia dos eritrócitos. Entretanto, mais estudos futuros devem ser realizados com extratos em concentrações maiores, bem como o teste em diferentes metodologias.

#### REFERÊNCIAS

1. BAGATINI, Margarete Dulce; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; TEDESCO, Solange Bosio. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.

2. SCOPEL, Marina. Análise botânica, química e biológica comparativa entre flores das espécies *sambucus nigra* L. e *sambucus australis* cham. & Schlttdt. e avaliação preliminar da estabilidade. 2005.
3. BUKOWSKA, Bozena; KOWALSKA, Sylwia. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology letters**, v. 152, n. 1, p. 73-84, 2004.
4. HARBELL, J. W. et al. IRAG working group 4: cell cytotoxicity assays. **Food and chemical toxicology**, v. 35, n. 1, p. 79-126, 1997.
5. HEYWOOD, V. H. In: Flowering Plants of the World. B.T. Batsford Ltd – London, 149-152, 1996.
6. STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny website, 2001. Disponível em: <http://www.mobot.org>. Acesso em: 20 outubro 2017.
7. CARDOSO, N.A.R. Metabolitos isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacabtha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae) 2006. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
8. JOBSON, Richard W.; LUCKOW, Melissa. Phylogenetic study of the genus *Piptadenia* (Mimosoideae: Leguminosae) using plastid trnL-F and trnK/matK sequence data. **Systematic Botany**, v. 32, n. 3, p. 569-575, 2007.
9. PAULINO DE ALBUQUERQUE, Ulysses; DE HOLANDA CAVALCANTI ANDRADE, Laise. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**, v. 27, n. 7, p. 336-346, 2002.
10. DE VASCONCELLOS BARBOSA, Maria Regina. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 313-322, 2007.
11. FABRICANTE, Juliano Ricardo; DE ANDRADE, Leonaldo Alves. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 341-349, 2007.
12. CHIAPPETA, A.D.A.; DE MELLO, J.F. Higher Plants with Biological Activity. Plants os Pernambuco. II. III. Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, v.11, n. (1/2), p.99-11, 1984.
13. BEZERRA, Denise AC. Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Campina Grande, PB. apresentada como dissertação de mestrado, Departamento de Zootecnia, UFCG**, 2008.
14. QUEIROZ, A. C.; LIRA, D.P.; DIAS, T.L.M.F.; SOUZA, E.T.M.C.B.B; AQUINO, A.B.; SILVA, L.H.A.C.; SILVA, D.J.C.; MELLA, E.A.C.; AGRA, M.F.; FILHO, J.M.B.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities os *Piptadenia stipulaceae* Benth. (Fabaceae). **Journal os Ethnopharmacology**, v. 128, p. 377-383, 2010.
15. APARICIO, Rosa M. et al. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 39, n. 5, p. 1063-1067, 2005.
16. FERNANDES PEQUENO, Nebson; SOTO-BLANCO, Benito. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, 2006.
17. ARAÚJO, Josenildo Segundo Chaves de et al. Investigação dos efeitos citotóxico, genotóxico e antibacteriano dos taninos isolados de *Anacardium Occidentale* Linn e *Anadenanthera Macrocarpa* (Benth.) Brenan em linhagens de *Streptococcus* associados ao biofilme dental. 2013.

18. VELOSO, Carlos Arthur Gouveia. *Triagem fitoquímica e avaliação do potencial antifúngico e citotóxico das folhas de Calotropis procera (Ait.) Ait. f. (Apocynaceae)*. Monografia (Graduação). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande – PB. 2015.
19. DIDELON, J. et al. Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration. **Biorheology**, v. 37, n. 5, 6, p. 409-416, 2000.
20. ROCHA PEREIRA, Dewson et al. **Influência de extrato aquoso de Indogosfera suffruticosa na marcação com Tecnécio-99m in vivo e in vitro**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
21. SILVA, Thassiany Rebeca Paiva Moura da. **Avaliação de atividades biológicas da Turnera subulata**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
22. CARVALHO, Eunice B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29, n. 2, p. 149-52, 2007.
23. COSTA, Amanda Justino. Avaliação fitoquímica e potencial toxicológico do caule de Calotropis procera (Ait.) Ait. f.(APOCYNACEAE). 2015.

## AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DE LESÕES CRANIOENCEFÁLICAS EM PEQUENOS ANIMAIS

### **Barbara Wagner Duarte Ferraz de Camargo**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Botucatu - SP

### **Tália Missen Tremori**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Botucatu – SP

### **Selene Daniela Babboni**

Universidade Paulista  
São José dos Campos – SP

### **Maria Jaqueline Mamprim**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Botucatu - SP

### **Noeme Sousa Rocha**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Botucatu – SP

**RESUMO:** A casuística de traumas cranioencefálicos tem se tornado cada vez mais presente na rotina veterinária de pequenos animais, sendo este originário de diferentes causas. O presente trabalho possui como objetivo avaliar as principais lesões presentes em animais que vieram a óbito decorrente do trauma cranioencefálico. No decorrer do estudo foram avaliados oito animais, dentre cães e gatos, oriundos do Canil Municipal de Botucatu – SP. Através do exame necroscópico identificaram-se alterações patológicas, as quais foram fotodocumentadas utilizando o

aparelho Macro Path DM, Milestone (Itália). Para realização da avaliação microscópica foram coletadas amostras de encéfalo, cerebelo e medula espinhal para posterior histopatologia. Os resultados foram analisados e descritos, buscando assim, documentar as possíveis lesões encontradas em consequência do trauma cranioencefálico.

**PALAVRAS-CHAVE:** medicina veterinária legal, pequenos animais, trauma cranioencefálico.

### MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC EVALUATION OF CRANIOENCEPHALIC TRAUMA IN SMALL ANIMALS

**ABSTRACT:** Cranioencephalic trauma's appearance within the small animal veterinary clinic has become more frequently, which can be originated from several sources. The following paper aims to evaluate the main injuries present in deaths due to trauma. Along the study, eight animals were evaluated, among cats and dogs, from Botucatu's City Shelter – SP. Through necroscopic exam, pathological findings were photodocumented with Macro Path DM, Milestone (Italy). Regarding the microscopic evaluation, tissue samples from encephalus, cerebellum and spinal cord were harvested for further histopathological examination. The results were analyzed and described, reaching

to document the possible injuries found as consequence of the cranioencephalic trauma.

**KEYWORDS:** legal veterinary medicine, small animal, cranioencephalic trauma.

## INTRODUÇÃO

As lesões cranioencefálicas são aquelas produzidas na caixa craniana que afetam o encéfalo e tem como causa principal as energias de ordem mecânica. Este tipo de energia é definida como a ação de uma força sobre um corpo, sendo capazes de modificar o seu estado de repouso ou movimento. A natureza dos agentes causadores da energia mecânica é variável, podendo ser divididos em puntiformes, cortantes, contundentes, perfurocortantes, perfurocontusos e cortocontusos.

Atualmente o politraumatismo cranioencefálico em pequenos animais representa uma porcentagem significativa da rotina da clínica médica, sendo que a maioria dos casos culmina no óbito do animal (DEWEY et al., 2000). Os traumas podem ser decorrentes de atropelamentos, ataques de outros animais, lesões físicas (mecânicas), armas de fogo e diferentes crimes contra os animais. Neste aspecto é que destacamos a patologia forense veterinária, como uma ciência essencial na investigação de óbitos de origem desconhecida, principalmente em casos relacionados à processos judiciais envolvendo animais (CUEVAS, 2016).

No cenário jurídico dispomos de leis que defendem os direitos dos animais, como o artigo 32 e 37 da Lei 9.605 de fevereiro de 1998, no qual consta “Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos: Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa” além disso nesta mesma lei possuímos o artigo 37 que regulamenta sobre o abate de animais, sendo que estes só são permitidos se necessários como subsistência ou proteção de plantações, e por fim animais nocivos.

A Constituição Federal de 1988 possui em seu capítulo VI (do meio ambiente) o Artigo 225 que coloca o meio ambiente como fator essencial para qualidade de vida, além de seus incisos, por exemplo, o inciso V que controla a produção e tudo aquilo que condiz com fatores de risco para qualidade de vida e meio ambiente, inciso VI que promove a necessidade da conscientização pública a respeito do meio ambiente, e inciso VII que protege a fauna e flora de atos que coloquem em risco sua função ecológica.

A causa animal tem se tornado cada vez mais visível nos últimos anos, entretanto os registros de crimes relacionados a maus tratos aumentaram, em consequência disso foi sancionada a criação de uma Delegacia Eletrônica de Proteção aos Animais (DEPA) no estado de São Paulo, para o segundo semestre de 2016 com o objetivo de facilitar a denúncia de crimes envolvendo animais, além de possibilitar o cidadão a acompanhar o progresso do caso online.

O traumatismo pode ser originado de várias maneiras, no entanto a maioria

resulta de atropelamentos, como descrito por Figuera (2008) num estudo relatando 155 casos fatais de atropelamento de cães nos quais o trauma cranioencefálico foi responsável pela morte de 26 destes. Outras causas incluem quedas, abusos, crueldade e até mesmo links entre violência doméstica e abuso contra animais já foram descritos na literatura (BARRERO, 2015).

No aspecto da patologia forense veterinária é fundamental buscar a origem das lesões, além do tempo aproximado de sua ocorrência e quais foram os mecanismos responsáveis por esta. Tratando-se de traumas cranioencefálicos, no entanto, há uma certa dificuldade em acessar certos dados que possam ajudar no reconhecimento da lesão devido a fatores que vão desde o intervalo entre o óbito do animal e a necropsia, a idade do paciente (sendo que cérebros imaturos e maduros podem ter diferentes tempos de reações para processos patológicos), até artefatos encontrados post-mortem que devem ser diferenciados dos encontrados ante-mortem (FINNIE, 2016).

Ao realizar um exame necroscópico em pequenos animais, deve-se levar em consideração que cães e gatos possuem uma superfície de contato grande em relação sua superfície corpórea em relação ao impacto (SIQUEIRA, 2013). É possível realizar a análise macroscópica das lesões causadas nos animais para determinação da causa e outros achados patológicos, levando-se em conta que estas podem ser de aspecto primário, ou seja, resultante de uma força mecânica capaz de criar uma deformação no cérebro (BLUMBERGS, 2005), ou então secundária, que também pode ser considerada uma reação tardia a complicações das lesões primárias (FINNIE, 2016). Uma terceira condição envolve lesões penetrantes causadas por projeteis de armas de fogo que vão depender muito do curso deste projétil pelo crânio e cérebro além da energia liberada por este (DIMAIO, 1999). Desse modo, podem ser divididas em armas, do tipo branca e do tipo fogo.

A necropsia para determinar as condições de tais lesões deve ser feita com o menor intervalo de tempo possível para que se diminua as alterações cadavéricas cronológicas naturais reduzindo a ocorrência de artefatos tornando o exame mais fidedigno possível, de maneira que possa contribuir inclusive na elucidação de processos judiciais.

Para que se obtenha resultados satisfatórios com a realização da necropsia é fundamental a presença de um profissional capacitado que possua conhecimentos para uma boa análise, por esse motivo a formação de profissionais vinculados a medicina legal é essencial, e uma demanda que vem apenas crescendo nos últimos anos (SALVAGNI, 2016).

Além da presença de profissionais na realização da necropsia é de suma importância que sejam realizados exames complementares como o exame histopatológico, o qual conta com achados microscópicos para refinar, confirmar e excluir possíveis causas para a morte do animal, como a técnica que utiliza da análise microscópica de fibras danificadas por projeteis de arma de fogo como uma maneira de visualizar o local de entrada e saída deste (DETTMEYER, 2011), além



de exames toxicológicos, citológicos, entre outros.

É indispensável, portanto que casos envolvendo traumas cranioencefálicos sejam amplamente estudados, tanto macroscopicamente quanto microscopicamente principalmente quando estes se relacionarem ao abuso animal ou que tenham importância no cenário judicial, para que sempre que possível possa se determinar a origem desta lesão.

## **OBJETIVOS**

O principal objetivo do estudo consiste em examinar no aspecto macroscópico e microscópico as lesões e consequências causadas por traumas cranioencefálicos em cães e gatos.

Determinar a origem das lesões causadas pelo trauma e fazendo umnexo causal com as alterações patológicas encontradas pelos exames necroscópicos.

Correlacionar as lesões com casos que possam ter implicação jurídica.

## **METODOLOGIA**

Após aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais, foram disponibilizados oito animais, sendo cinco cães e três gatos, oriundos do Canil Municipal de Botucatu-SP, que vieram a óbito decorrentes de trauma.

Foram coletadas informações descritivas do prontuário dos animais, como sexo, idade, peso, origem e informações relevantes para a anamnese.

Para o exame necroscópico, foi utilizada a técnica de Gohn modificada, que consiste na abertura do cadáver desde a região mentoniana até a sínfise púbica, e posterior retirada dos conjuntos em blocos anatômicos relacionados funcionalmente para análise. Dos blocos anatômicos foram selecionados o encéfalo, cerebelo e medula espinhal para o análise microscópico e macroscópico. O exame necroscópico foi realizado e fotodocumentado com o equipamento Macro Path DM, Milestone (Itália).

Para a realização do exame histopatológico que permitirá a análise microscópica foram coletados fragmentos dos órgãos que serão armazenados em formalina a 10% em uma quantidade que seja 10 vezes maior em relação ao espaço do material no recipiente.

Os dados obtidos até o momento foram tabulados em MS Excel 2010, para futura análise estatística.

## RESULTADOS

Foram obtidos cinco cães e três gatos, totalizando oito animais, todos oriundos do Canil Municipal de Botucatu-SP (Gráfico 1) para a execução do projeto. Dentre os animais, foi constatado que todos foram submetidos a traumas principalmente mecânicos, sendo que o atropelamento se mostrou como a maior causa. A Tabela 01 descreve os casos de animais que vieram a óbito por trauma relacionando idade, sexo, espécie, raça, causa mortis e processo principal.

Após a realização do exame necroscópico foi observado que todos os animais traumatizados sofreram de trauma cranioencefálico, e na grande maioria esta foi a causa mortis.

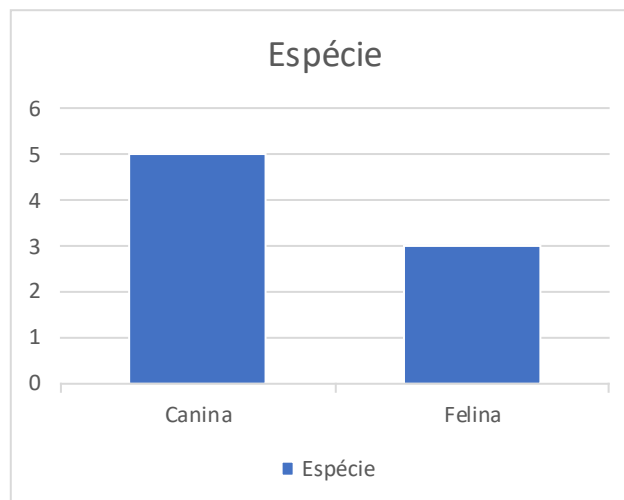


Gráfico 1: Distribuição das espécies do estudo.

A principal causa que levou os animais a óbito foram de origem mecânica, sendo que de oito animais, sete foram vítimas de atropelamento e um de enforcamento (Gráfico 2).

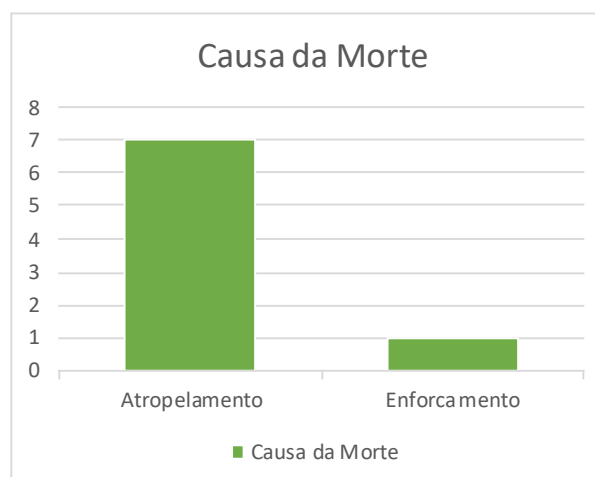


Gráfico 2: Causas dos traumas que levaram os animais a óbito.

Sexo	Faixa Etária	Espécie	Raça	Causa Mortis	Processo Principal
Fêmea	Filhote	Canino	SRD	Choque misto (neurogênico e hipovolêmico)	Ruptura esplênica, laceração pulmonar, congestão encefálica, laceração hepática.
Macho	Jovem	Felino	SRD	Choque hipovolêmico	Ruptura de baço, laceração hepática, hemorragia e congestão pulmonar, congestão cerebelar e de encéfalo.
Fêmea	Adulto	Felino	SRD	Edema pulmonar	Hemorragia pulmonar, hiperemia de encéfalo.
Fêmea	Adulto	Canino	SRD	Trauma cranioencefálico	Fratura de crânio, autólise de encéfalo e cerebelo, hemorragia pulmonar.
Macho	Jovem	Felino	SRD	Politraumatismo	Fratura de crânio, evisceração, ruptura diafragmática, edema pulmonar.
Fêmea	Adulto	Canino	SRD	Edema pulmonar	Hemorragia pulmonar, congestão de encéfalo, laceração hepática.
Macho	Adulto	Canino	SRD	Isquemia cerebral	Ruptura de anel traqueal, edema e hemorragia pulmonar.
Jovem	Jovem	Canino	Poodle	Edema pulmonar	Fratura de crânio, congestão de encéfalo e cerebelo, hemorragia e edema pulmonar.

Tabela 1: Informações sobre sexo, idade, espécie, raça, causa mortis e processo principal dos exames necroscópicos em animais vítimas de trauma.

Dentre as lesões macroscópicas foi possível constatar que três animais possuíam fratura em crânio (Figuras 1 e 1.2) e cinco apesar de possuírem o crânio intacto apresentavam encéfalo edemaciado e congesto. Outras lesões sistêmicas puderam ser analisadas, sendo que na grande maioria dos animais foi possível observar pulmões congestos e hemorrágicos e presença de líquido na região traqueal caracterizando edema pulmonar.



Figura 1: Cão. Fratura de crânio.



Figura 1.2: Cão. Exame radiográfico realizado do mesmo animal apresentando fratura de crânio.

A fotodocumentação de todos os animais foi realizada utilizando o aparelho Macro Path DM, Milestone, para posterior análise e registro. Para as análises microscópicas das lesões foram coletadas principalmente amostras de tecidos post-mortem de cerebelo, cérebro e medula espinhal, porém, também foram coletadas amostras de alterações secundárias em tecidos observadas durante a necropsia.

As amostras de tecidos foram processadas e realizado exame histopatológico, dentre os principais órgãos analisados estavam componentes do sistema nervoso central, como, medula espinhal, cerebelo e cérebro. Outros órgãos que possuíssem qualquer alteração necroscópica, no entanto, foram coletados e analisados conjuntamente para que se pudesse obter maiores informações em relação as lesões oriundas do trauma.

De acordo com análises histopatológicas do Sistema Nervoso Central foi possível observar que a lesão mais frequentemente relatada foi a presença de neurônios diminuídos de tamanho e acidofílicos, localizados principalmente na camada molecular do encéfalo (Figura 2). Este tipo de lesão é possível ser correlacionado com o processo hipóxia que pode ter acometido o órgão decorrente do trauma, justificando também a presença de edema e congestão presentes em análise macroscópica. É importante notar que a lesão se apresentou tanto em animais que possuíam alterações em crânio, quanto àqueles que possuíam crânio intacto. Através da análise microscópica foi possível caracterizar o processo de Coagulação Intravascular Disseminada em dois animais, sendo que ambos possuíam capilares encefálicos contendo hemácias em seu interior e aderidas ao endotélio vascular (Figura 3), esse processo foi observado também em demais órgãos coletados destes animais, como pulmão e fígado.

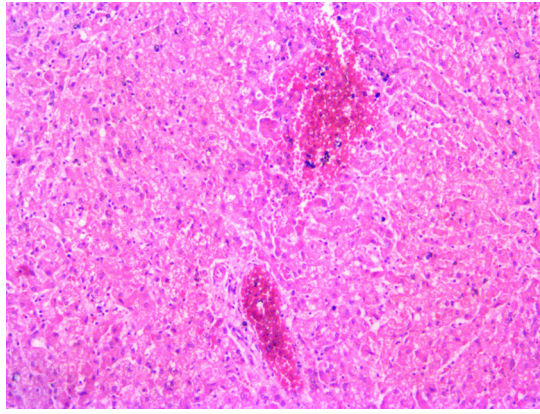


Figura 2: Cão. Encéfalo. Lesão neuronal em camada molecular com presença de neurônios diminuídos de coloração acidofílica. HE. 200x.

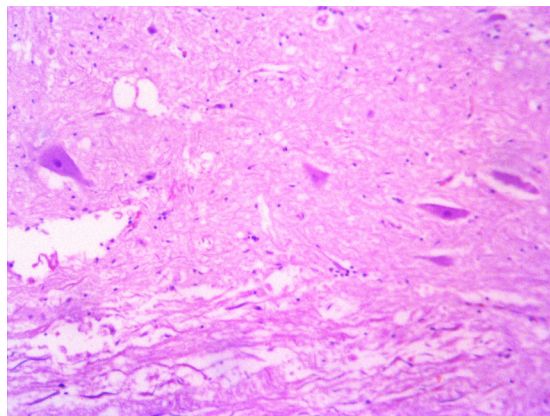


Figura 3: Cão. Encéfalo. Processo de Coagulação Intravascular Disseminada (CID). HE. 200x.

Analisando demais constituintes do Sistema Nervoso Central, como cerebelo e tronco encefálico, a alteração predominante foi vacuolização de neurônios caracterizando a desmielinização destes componentes, presentes em massa branca (Figura 4). Esta lesão, no entanto, na maioria dos animais, foi relatada apenas discretamente. Na medula espinhal não houve alterações significantes tanto em massa cinzenta, quanto em massa branca que pudessem ser justificadas pelo trauma.

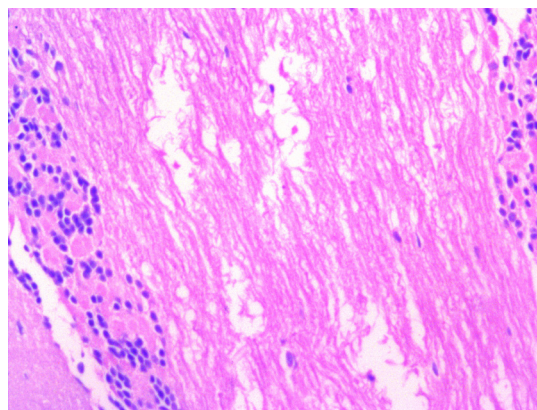


Figura 4: Cão. Cerebelo. Desmielinização em massa branca. HE. 200x.

As alterações sistêmicas encontradas microscopicamente encontradas dentre a análise dos oito animais estão descritas na Tabela 2, dentre estas foram identificadas, principalmente, edema e congestão pulmonar, caracterizado por material amorfo preenchendo espaços alveolares e hemácias preenchendo vasos, além do processo de embolismo pulmonar observado em pelo menos três animais (Figura 5 e 6). Ainda em tecido pulmonar, foi possível observar a presença de pigmento acastanhado em pontos focais espalhados pelo parênquima, fato que pode ser explicado se o animal sofreu de morte agônica ou inspirou conteúdo para o interior pulmonar. Apenas dois animais apresentaram hemorragia em fígado, justificadas pelo extravasamento de hemácias do interior de vasos sanguíneos, no entanto, em mais dois animais um processo de hepatite focal pode ser observado, não concomitante com hemorragia. Em baço, foi possível observar hiperplasia de polpa vermelha (Figura 7), ou extravasamento de hemácias distribuídas pelo parênquima do órgão em apenas um animal, sendo que o restante apresentou discreta hiperplasia de polpa branca. Como último órgão analisado, os rins, não houveram alterações significantes e justificadas pelo trauma, no entanto, dois animais da espécie felina apresentaram esteatose renal

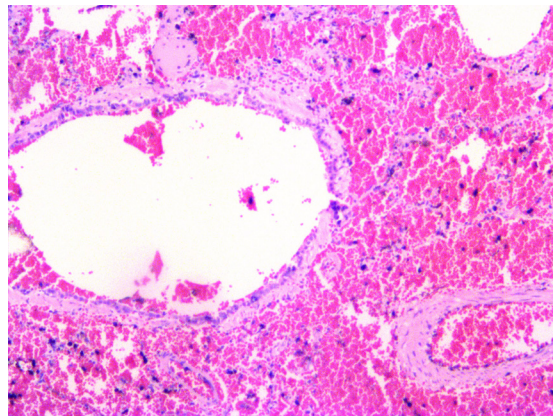


Figura 5: Cão. Pulmão. Alvéolos edemaciados e presença de êmbolos nos vasos, caracterizando embolismo pulmonar. HE. 200x.

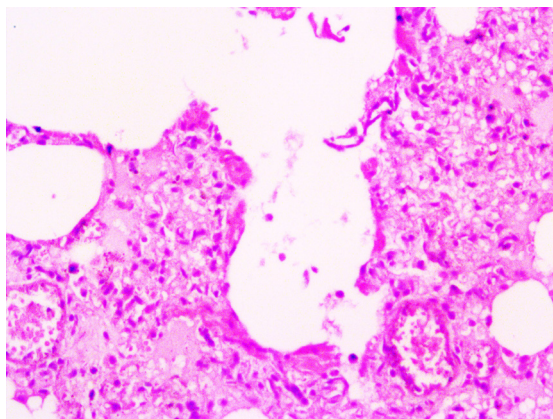


Figura 6: Cão. Pulmão. Hemorragia e congestão pulmonar evidência pela presença de hemácias em permeio aos pneumócitos e espaços interalveolares. HE. 200x.

Sistema Nervoso Central	Sistêmicas
<p>Lesão neuronal por hipóxia Desmielinização em cerebelo Coagulação Intravascular Disseminada em encéfalo</p>	<p>Edema pulmonar Hemorragia pulmonar Hemorragia hepática Hepatite focal Embolismo pulmonar Hiperplasia de polpa branca Coagulação Intravascular disseminada Hiperplasia de polpa vermelha</p>

Tabela 2: Principais alterações encontradas em cada órgão do Sistema Nervoso Central, além de alterações sistêmicas listados por ordem de frequência de aparecimento nas análises histopatológicas.

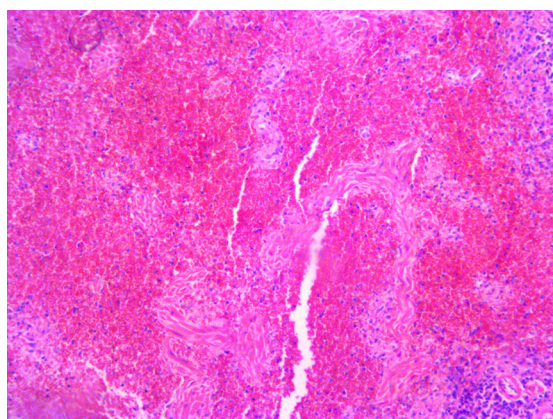


Figura 7: Cão. Baço. Hiperplasia de polpa vermelha. HE. 200x.

Dentre os achados necroscópicos a Tabela 3 e as imagens abaixo ilustram os diversos tipos de patologias encontradas nos exames necroscópicos analisados nos casos de animais que vieram a óbito por trauma neste estudo, como por exemplo: ruptura de crânio, hérnia diafragmática, ruptura de baço, evisceração, laceração pulmonar e hepática e fraturas (Figuras 8 a 14).



Figura 8: Cão. Hiperemia de medula espinhal.



Figura 9: Felino. Congestão encefálica e presença de petéquias em massa branca.

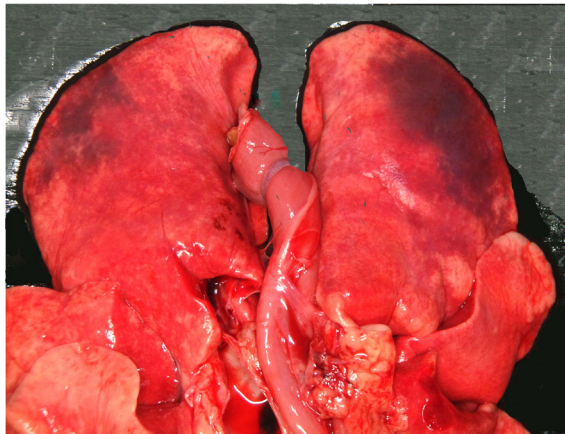


Figura 10: Cão. Hemorragia e edema pulmonar. Manchas hipostáticas.

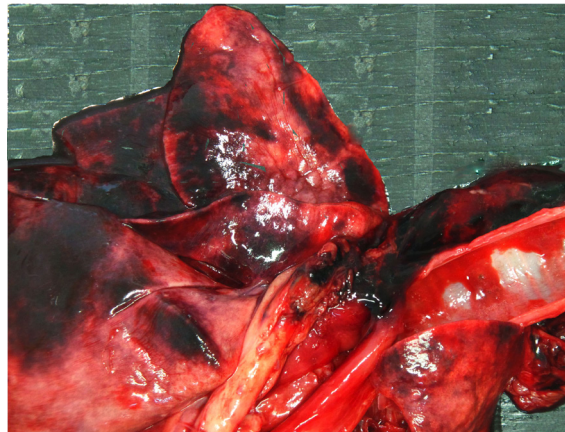


Figura 11: Cão. Hemorragia pulmonar. Manchas hipostáticas.



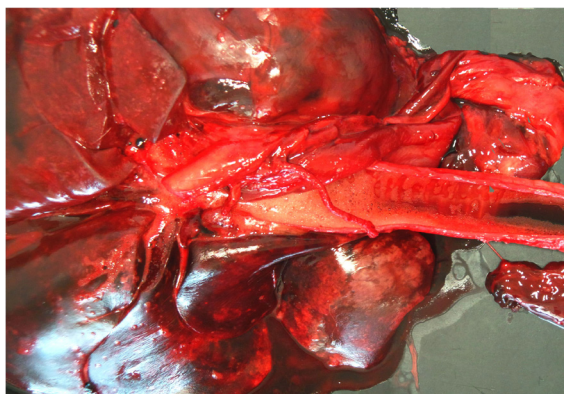


Figura 12: Cão. Congestão e edema encefálico e cerebelar.

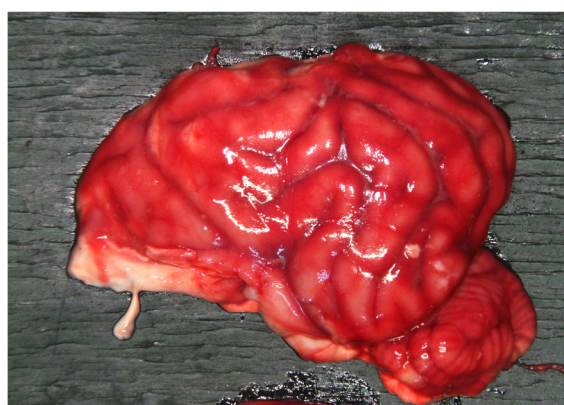


Figura 13: Cão. Hemorragia e edema pulmonar.

Sistema Nervoso Central		Sistêmicas	
Microscópicas	Macroscópicas	Microscópicas	Macroscópicas
Lesão neuronal por hipóxia	Edema e congestão encefálica e cerebelar	Edema pulmonar	Hemorragia pulmonar
Desmielinização em cerebelo		Hemorragia pulmonar	Congestão pulmonar
Coagulação Intravascular Disseminada apresentada em encéfalo	Petéquias em encéfalo	Hemorragia hepática	Edema pulmonar
	Hiperemia de medula espinhal.	Hepatite focal	Laceração hepática
		Embolismo pulmonar	Laceração esplênica
		Hiperplasia de polpa branca	Laceração pulmonar
		Coagulação Intravascular disseminada	Alças intestinais hemorrágicas
		Hiperplasia de polpa vermelha	Ruptura diafragmática
			Ruptura de língua
			Hemorragia de baço e omento
			Evisceração

Tabela 3: Lesões microscópicas e macroscópicas de Sistema Nervoso Central e sistêmicas encontradas durante a análise de oito animais, em ordem de frequência.

## DISCUSSÃO

Mediante a origem e anamnese prévia dos animais necropsiados que vieram a óbito decorrente de trauma foi possível perceber que a maioria (88%) foi decorrente de atropelamento, e também que em nenhum dos casos foi prestado socorro ao animal ou assistência médica veterinária. Uma possível causa para tal, é a que ainda não há legislação vigente que assegure animais em casos de omissão de socorro.

Foi constatado também que de oito animais, apenas um possuía raça definida, ainda dentre estes apenas possuía tutor, sendo que outros sete eram animais errantes, fato que contribui para elucidação de que animais errantes são mais susceptíveis a acidentes automobilísticos sendo um risco para saúde humana e animal. Além disso, é possível observar que a maioria de animais que se envolveram em tais acidentes eram de espécie canina e minoria felina.

Com relação às lesões encontradas ao exame necroscópico foi possível observar que as fraturas de crânio estavam presentes e mesmo quando ausentes ainda haviam alterações encefálicas primárias ou secundárias (ao choque distributivo, por exemplo). Além do trauma cranioencefálico, foi possível também observar que este tipo de trauma de origem mecânica pode levar a lesões principalmente pulmonares, em baço e fígado, além de osteomusculares sendo suficientes para levar o animal a óbito.

Diante dos casos analisados é importante ressaltar a necessidade do exame necroscópico e registros do mesmo, além da fotodocumentação e exame histopatológico, para que haja devida elucidação da causa mortis e origem das lesões. As análises macroscópicas e microscópicas são relevantes ao estudo para que se permita entender as consequências do trauma e também quais principais características das mesmas. Além disso, o estudo tem pode contribuir com a Patologia Forense Veterinária a fim de auxiliar também na determinação de lesões que são identificadas antes da morte do animal e também após a morte, podendo assim também auxiliar em futuros casos com implicação jurídica, servindo como embasamento teórico científico.

## CONCLUSÃO

De acordo com as análises macroscópicas e microscópicas através dos exames necroscópicos e histopatológicos foi possível observar que o trauma cranioencefalico está presente em todos os casos e que este tem grande influência para a *causa mortis* de cães e gatos vítimas de trauma.

## AGRADECIMENTO

CAPES Edital Pró Forenses 25/2014.

## REFERÊNCIAS

- BARRERO, S.M. et al. Link entre o abuso contra os animais e a violência humana: uma revisão sistemática. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.13, n. 3, p.79, 2015
- BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**: promulgada em 5 de outubro de 1988. Organização do texto por Juarez de Oliveira. 4. ed. São Paulo: Saraiva, 1990. 168 p. (Série Legislação Brasileira).
- BRASIL. Lei n. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Lex**: coletânea de legislação e jurisprudência, São Paulo, v. 60, p. 1260, 1998.
- BRASIL. Lei n. 24.645, de 10 de julho de 1934. Estabelece medidas de proteção aos animais. **Lex**: coletânea de legislação e jurisprudência, Rio de Janeiro, v. 3, p. 140, 1934.
- BLUMBERGS, P.C. Pathology. **Head Injury: Pathophysiology and Management**, 2 ed., Londres: Hodder Arnold, 2005. 544p.
- CUEVAS, S.V.C et al. Papel da patologia forense veterinária na investigação de óbito sob circunstâncias desconhecidas de um cão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 49-49, 2016.
- DETTMEYER, R.B. **Forensic Histopathology: Fundamentals and Perspectives**, 1 ed. Berlim, Heidelberg: Springer, 2011. 454 p.
- DIMAIO, V.J.M **Gunshot Wounds: Pratical Aspects of Firearms, Ballistics and Forensic Techniques**, 3 ed. Boca Ranton: CRCPress, 1999. 377 p.
- FINNIE, J.W. et al. Forensic Pathology of Traumatic Brain Injury. **Veterinary Pathology**; v. 53; p.962-678, 2016.
- SALVAGNI, F. A. et al. Contribuição da medicina veterinária legal em caso de morte de animais em massa. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 70-70, 2015.
- SIQUEIRA, E.G.M. et al. Trauma cranioencefálico em pequenos animais. **Veterinária e Zootecnia**; v. 20, p.112, 2016.

## CRISPR/CAS9 COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO NICHOS ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

### Matheus Morais Miranda

UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências  
Botucatu - SP

### Lucas Benites Doretto

UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências  
Botucatu - SP

### Rafael Henrique Nóbrega

UNESP-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências  
Botucatu - SP

**RESUMO:** A espermatogênese é um processo altamente complexo, no qual envolve a geração de milhões de gametas haplóides (espermatozoides) a partir de uma única espermatogônia tronco. Esse tipo específico de célula apresenta uma função imprescindível para a evolução, já que é a partir dos gametas que mutações são acumuladas ao longo do tempo e transmitidas para as próximas gerações, permitindo o surgimento de novos caracteres e consequentemente podendo representar uma maior diversidade. Este processo é orquestrado por hormônios gonadotrópicos que se ligam a receptores presentes nas células somáticas do testículo, regulando localmente a atividade das espermatogônias tronco pela liberação de

fatores de crescimento. As gonadotropinas hipofisárias - hormônio folículo-estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh) - controlam o desenvolvimento e funcionamento gonadal através da regulação da atividade de sinais locais, como esteróides sexuais, fatores de crescimento, pequenos RNAs e mudanças epigenéticas. No entanto, os mecanismos que regem a regulação parácrina e endócrina no nicho espermatogonial são incertos. Para responder essas diversas questões sobre a regulação das espermatogônias tronco, o sistema CRISPR/Cas9 surge como ferramenta para nocautear os genes que codificam os receptores envolvidos nesse processo, a fim de investigar o papel desempenhado pelo Fsh e andrógenos no desenvolvimento gonadal dos peixes teleósteos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Espermatogênese, Crispr/Cas9, Zebrafish.

### CRISPR/CAS9 AS A TOOL TO STUDY THE SPERMATOGONIAL NICH OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

**ABSTRACT:** Spermatogenesis is a complex process, in which millions of haploids gametes are formed from a single spermatogonial stem cell. This specific cell type presents an essential function on evolution, since it is from the gametes

that mutations are accumulated through time and transmitted to the next generation, allowing the appearance of new characters and consequently can represent a greater diversity. This process is orchestrated by gonadotropic hormones that bind to testicular somatic cells, regulating locally, the spermatogonial stem cell activity by growth factors production. The pituitary gonadotropins - follicle stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh) - control development and gonadal function, regulating the local signals as sexual steroids, growth factors, small RNAs and epigenetic changes. Currently, mechanisms regulating the paracrine and endocrine of spermatogonial niche are still uncertain. To answer the questions about spermatogonial stem cell regulation, CRISPR/Cas9 system emerges as a tool to knockout receptor encoding genes, in order to investigate Fsh and androgens role on teleost gonadal development.

**KEYWORDS:** Spermatogenesis, Crispr/Cas9, Zebrafish.

## 1 | INTRODUÇÃO

A espermatogênese é um processo altamente organizado, no qual células indiferenciadas, as espermatogônias tronco, transmitem o material genético de um indivíduo para a próxima geração através de ciclos de mitose e meiose, através da formação de espermatozoides capacitados a fertilizar os oócitos (Hess & França, 2008; Schulz et al., 2010). Neste sentido, as espermatogônias tronco são as únicas células tronco do corpo capazes de contribuir na formação do material genético da prole, e, portanto, mostram ser peças chave na evolução (Hofmann, 2008). As espermatogônias tronco possuem potencial de auto-renovação, para manter sua população de células no testículo, assim como também de produzir células altamente diferenciadas comprometidas com o processo de formação de gametas. As espermatogônias tronco residem em um microambiente específico no testículo conhecido como nicho espermatogonial (Figura 1 e 2) (de Rooij, 2006; de Rooij 2009; Oatley & Brinster, 2008). Tanto em peixes como em mamíferos, o nicho é composto tanto por células germinativas quanto somáticas (Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). Em peixes, dois tipos de células tronco são encontradas entre a linhagem germinativa de zebrafish (Leal et al., 2009): espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund\*, que apresentam características típicas de células indiferenciadas, tais como núcleo amplo com pouca heterocromatina, grande volume de citoplasma e “nuages” (acúmulo de RNA) ao redor do envoltório nuclear, e espermatogônias indiferenciadas do tipo Aund, com maior presença de heterocromatina, menor volume citoplasmático e menor quantidade de “nuages”. As células somáticas são responsáveis pela função de sustentação e fornecimento de fatores de crescimento, sendo representadas pelas células de Sertoli, células peritubulares mióides e células de Leydig (Nóbrega et al., 2010). As células de Sertoli estão localizadas no interior dos túbulos seminíferos e estão em íntimo contato com as células germinativas. Além de suporte estrutural, as células de Sertoli são responsáveis por integrar

sinais endócrinos, produzindo diversos fatores de crescimento (Nóbrega et al., 2014). Dentre estes fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli, destacam-se aqueles que atuam no nicho espermatogonial como o GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor (auto-renovação) (Meng et al., 2000; Yomogida et al., 2003; Savitt et al., 2012), activina A, BMP4 (bone morphogenetic protein 4) (Loveland and Robertson, 2005) (diferenciação) e Igf3 (Nóbrega et al., 2015), Amh (Skaar et al., 2011) e outros. As células peritubulares mióides envolvem os túbulos seminíferos tendo um papel de suporte estrutural nos testículos (Oatley et al., 2009). Estas células também secretam certas substâncias, incluindo fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, que regulam as espermatogônias tronco (Oatley et al., 2009). Por exemplo, as células peritubulares mióides e as células de Leydig secretam o CSF1 (colony-stimulating factor 1) que estimula a auto-renovação das espermatogônias tronco (Oatley et al., 2009). As células de Leydig por sua vez, encontradas no compartimento intersticial, tem como função produzir andrógenos e fatores de crescimento (Oatley et al., 2009), como Inls3 (Assis et al., 2016). O nicho espermatogonial apresenta diferentes formas de organização nas mais diversas espécies de vertebrados. Em anamniotas (peixes e anfíbios), a espermatogênese é classificada como cística, pois um grupo de células de Sertoli envolve uma única espermatogônia indiferenciada (espermatogônia tronco), formando o cisto. O desenvolvimento das células germinativas ocorre no interior dos cistos até a formação de espermatozóides que são posteriormente liberados dos cistos para o interior dos túbulos seminíferos, logo tais cistos compreendem a unidade morfofuncional das gônadas de anamniotas (Lacerda et al., 2014). Em amniotas (répteis, aves e mamíferos), a organização é não-cística, ou seja, a célula de Sertoli suporta ao mesmo tempo diferentes “clones” de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (Grier, 1993; Pudney 1993; 1995; Schulz et al., 2010).

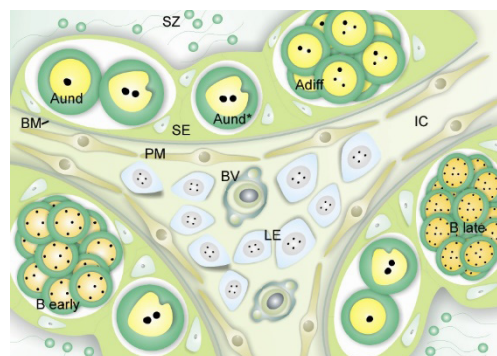


Figura 1. Nicho espermatogonial em zebrafish, *Danio rerio*. As espermatogônias tronco distribuem-se preferencialmente nas regiões dos túbulos seminíferos próximas das áreas de confluência de tecido intersticial, onde estão localizadas as células produtoras de esteróides, as células de Leydig (LE), vasos sanguíneos (BV) e outros elementos do tecido conjuntivo. **BM**, membrana basal; **PM**, células peritubulares mióides; **SE**, células de Sertoli; **A<sub>und</sub>\*/A<sub>und</sub>'**, espermatogônias iniciais; **Adiff**, espermatogônias diferenciadas; **B early**, espermatogônias do tipo B inicial; **B Late**, espermatogônias do tipo B final; **SZ**, espermatozóides; e seta indicando o epitélio germinativo. Retirado de Nóbrega (2014).

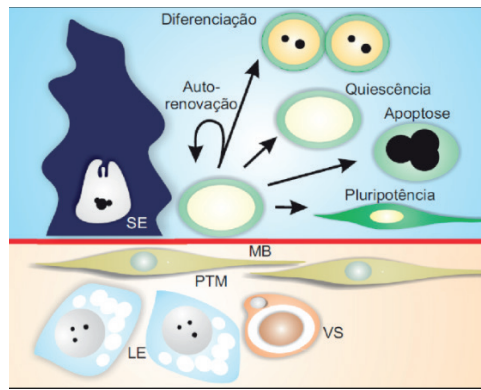


Figura 2. Representação esquemáticas do nicho das espermatogônias tronco em roedores. Apesar da membrana basal ser uniforme ao longo da circunferência dos túbulos seminíferos, as espermatogônias tronco concentram-se preferencialmente nas áreas próximas do interstício, em especial de células de Leydig e vasos sanguíneos. O nicho das espermatogônias tronco, portanto, é definido pelas células de Sertoli (**SE**), membrana basal (**MB**), células peritubulares mióides (**PTM**) subjacentes e pelos elementos intersticiais, como células de Leydig (**LE**) e vasos sanguíneos (**VS**). Através de sua composição celular e molecular, o nicho regula as propriedades das espermatogônias tronco. Retirado de Nóbrega (2014).

### 1.1 Zebrafish (*Danio Rerio*)

O Zebrafish (*Danio rerio*) pertence a família Cyprinidae, representando a maior família de peixes de água doce, e com exceção da Gobiidae, representa a maior família de vertebrados (Nelson, 1994) (Figura 3).



Figura 3. Imagem mostra *Danio rerio* e suas características. Proveniente da Índia, esse peixe é conhecido popularmente como zebrafish por apresentar listras escuras horizontais, possui corpo fusiforme e achatado lateralmente.

O mecanismo de determinação sexual nesses organismos ainda é um assunto desconhecido, mas sabe-se que inicialmente todas as gônadas se desenvolvem como ovários e a diferenciação sexual masculina ocorre na 5-7 semana após eclosão, no qual os testículos se formam a partir da degeneração do ovário (hermafroditismo juvenil).

O Zebrafish vem sendo utilizado amplamente como organismo modelo em diversas áreas de pesquisa, como biologia do desenvolvimento, estudos toxicológicos, neurofisiologia, genética e em pesquisas biomédicas. A escolha desse animal na experimentação se dá devido ao fato de possuir características favoráveis como seu pequeno porte possibilitando manter de um grande número de indivíduos

em um mesmo tanque, o que resulta em um baixo possível de manutenção, são animais que se reproduzem durante todo o ano. O período entre as gerações comparada com outros modelos vertebrados é curta, levando de 3-4 meses para que os novos indivíduos atinjam a fase adulta, sendo então muito útil para pesquisas sobre gerações. São animais com fertilização externa e os ovos são transparentes, sendo os embriões passíveis de serem manipulados facilmente para pesquisas de desenvolvimento embrionário, onde os estágios de desenvolvimento são visíveis ao estereomicroscópio. O zebrafish foi assunto das primeiras análises de scaneamento de genoma em busca de mutações aleatórias em larga escala realizada em vertebrados (Granato & Nüsslein-Volhard, 1996). Os resultados mostraram mais de 4.000 mutações e identificaram mais de 400 genes relacionados ao controle do desenvolvimento de vertebrados. Desde então com o avanço tecnológico, foi criado o “Zebrafish Genome Project”, baseado no Instituto Sanger em Cambridge (Driever et al., 1996).

## 1.2 Crispr-Cas9 como Técnica para Gerar *Knockouts*

O sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas foi descoberto em 1987 por Yoshizumi Ishino e colaboradores da Universidade de Osaka (Japão). Estes pesquisadores identificaram um loco peculiar no genoma de *Escherichia coli*, constituído por uma configuração incomum: sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas (“spacer”) de função desconhecida. Apenas em 2005, foi sugerido que o sistema CRISPR-Cas9 seria um sistema imune adaptativo de procariotos, no qual os espaçadores serviriam como “memória de invasões anteriores” por bacteriófagos (Mojica et al., 2005). Assim, RNAs derivados desses espaçadores serviram como moléculas complementares aos patógenos invasores, permitindo combatê-los de maneira sequência-específica (Introdução à técnica de CRISPR. SBG. Pág. 30 cap 1). Somente em 2012/13 foi descoberto que essa técnica poderia ser utilizada no meio científico. Duas publicações merecem destaque nesse quesito, a primeira, que introduziu o conceito e evidenciou seu potencial (Jinek et al., 2012) e uma segunda, onde foi mostrado o amplo sucesso, fácil acessibilidade e versatilidade da técnica (Cong et al., 2013).

A técnica baseia-se na síntese de uma molécula de RNA complementar à uma sequência genômica alvo. Para tal, o RNA se associa à uma endonuclease que o guia até seu alvo complementar. Quando há complementariedade do RNA para com o alvo e a endonuclease reconhece a sequência PAM (Figura 4), ocorre a clivagem dos nucleotídeos. Essa enzima com atividade nuclease é a Cas-9, pertencentes à família das enzimas Cas (Figura 4). Com a mutação, a sistema de reparo de DNA da célula é ativado e inserções ou deleções de pares de bases acabam por abolir a expressão do gene alvo.



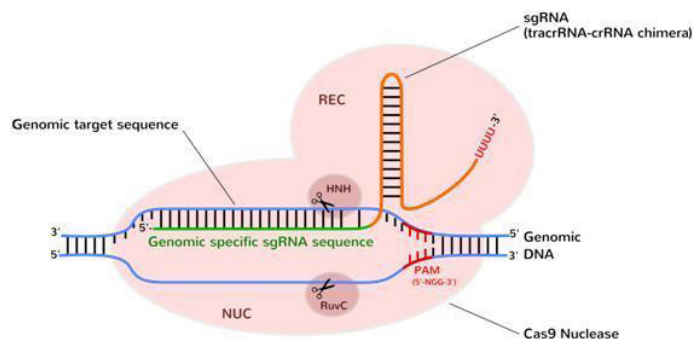


Figura 4. CRISPR-Cas9 e seus componentes básicos que em conjunto inibem a expressão de um gene de interesse. No DNA genômico encontra-se o gene alvo, onde a Cas9 endonuclease irá produzir uma mutação indel (inserção-deleção). O crRNA (*CRISPR-derived RNA*) juntamente com o tracrRNA (trans-activating RNA) são responsáveis por guiar e ativar o sistema, respectivamente. Atualmente, ambos RNAs são sintetizados numa única molécula, chamada de gRNA ou sgRNA (*single guide RNA*). A sequência 5'-NGG-3' é necessária estar presente adjacente ao alvo, para que a atividade endonucleásica da Cas-9 funcione adequadamente. Tal sequência é conhecida como PAM, ou Protospacer adjacent motif. REC – lobo de reconhecimento e NUC – lobo nucleásico da Cas9. RuvC e HNH são dois domínios da Cas9, cada qual responsável por “cortar” uma fita da molécula de DNA. Imagem retirada de <http://www.ozbiosciences.com/content/58-transfection-reagents-for-genome-editing>.

Em relação às demais técnicas de edição genômica, como ZFN (*Zinc Fingers Nucleases*) e TALENs, (*Transcription Activator-like Effector Nucleases*), o CRISPR-Cas9 apresenta algumas vantagens como: rápida e fácil metodologia, baixo custo e principalmente elevada taxa de sucesso devido a sua alta sensibilidade para o reconhecimento de sequências específicas presentes no DNA (Cencic e Hisashi, 2014).

Estudos de perda e ganho de função tem como objetivo identificar e compreender a função de um determinado gene. Neste sentido, a obtenção de animais *knockouts* podem melhor elucidar o papel de reguladores do nicho espermatogonial em peixes. Considerando as vantagens do sistema CRISPR-Cas9, é possível editar o genoma de diversas espécies com praticidade, eficácia e baixo custo. Somado à isso, trabalhos recentes mostraram que o papel do Fsh e Lh parecem ser dispensáveis para o processo da espermatogênese. Assim, o estudo em conjunto dos receptores para o Fsh e andrógenos, juntamente com análises moleculares e celulares é de grande valia para o entendimento cada vez mais completo da biologia das espermatogônias tronco em peixes.

## 2 | MATERIAL E MÉTODO

Para identificar os alvos para os genes *fshr* e *ar* a serem deletados, foi utilizado o software ZiFit, seguindo critérios para que a eficiência da técnica fosse ideal: Para que houvesse menor possibilidade da ocorrência de “off-targets”, os alvos possuíam entre 18-20 nucleotídeos e eram adjacentes a sequência PAM (NGG) na porção 3' do alvo. Após serem selecionados, os alvos foram “blastados” no database Ensembl

para verificar se as sequências dos alvos escolhidos não eram complementares a outros genes que não o de interesse (*off-targets*). Publicações recentes mostraram que um alvo ideal deve ter no máximo 4 mismatches (Fu *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Foram escolhidos 3 alvos diferentes para cada gene de interesse, e com pelo menos a presença de um nucleotídeo guanina (G) na ponta 5' do alvo.

Após a escolha dos alvos, a síntese do gRNA (RNA guia) foi realizada de acordo com recomendações do protocolo “GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit” (Thermo Fisher Scientific). Os oligos (primers) foram sintetizados de acordo com instruções do protocolo “GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit” (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, ambos primers *forward* e *reverse* deveriam conter sequências adicionais, como mostradas nas Figura 5 e 6.

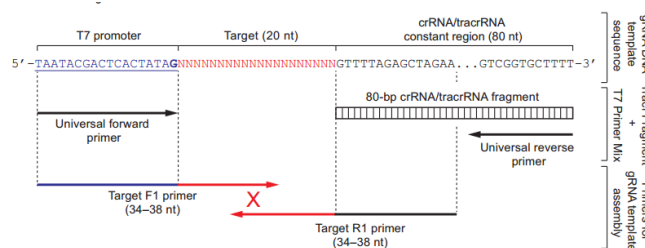


Figura 5. Metodologia utilizada para a síntese dos primers/oligos. A sequência em azul na extremidade 5' corresponde à “TAATA” que será reconhecida pela T7 para a transcrição in vitro (TIV). Esta sequência “TAATA” é adicionada à extremidade 5' do primer a ser sintetizado. A sequência do alvo indicada em vermelho por “NNNNNNNNN...” contém de 17 a 19 nucleotídeos. Por fim, em preto, está mostrado o fragmento correspondente ao crRNA/tracrRNA. Os primers sintetizados contêm a sequência do alvo (17 a 19 nucleotídeos). Esta sequência se sobrepõe formando ao final da reação de PCR, uma dupla fita (Figura 7). Imagem retirada do protocolo (GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit) (Thermo Fisher Scientific).



Figura 6. Resultado da PCR. Fita de DNA contendo: a sequência da T7 (azul), o alvo (verde), e o tracrRNA (vermelho). Imagem adaptada de Laurentino, E. CRISPR-Cas9 – Uma introdução à ferramenta e sua aplicação na edição de genomas, 2016.

Após a transcrição in vitro (TIV) e a purificação do gRNA gerado, a molécula assume sua conformação ativa (Figura 7), pronta para ser injetada em ovos recém-fertilizados de Zebrafish.

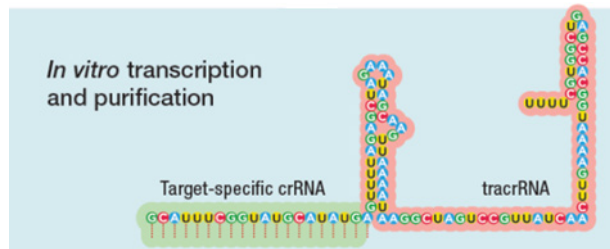


Figura 7. Conformação do gRNA após TIV e purificação. Após estas etapas, basta injetar essa molécula juntamente com a Cas9 em ovos recém-fertilizaados. Imagem adaptada de Laurentino, E. CRISPR-Cas9 – Uma introdução à ferramenta e sua aplicação na edição de genomas, 2016.

## 2.1 Reprodução

Os peixes reprodutores foram mantidos em tanques com sistema de circulação e as variáveis foram controladas. Estudos mostram que a dieta e fotoperíodo são fatores cruciais para o sucesso da reprodução, portanto os animais foram alimentados 3 vezes ao dia e suplementados com proteína de origem animal (*Artemia sp*), mantidos a 28 °C e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Para obter os embriões para a microinjeção, os reprodutores foram separados um dia antes da coleta, mantendo machos e fêmeas separados por uma divisória na mesma caixa de reprodução e em uma proporção de 2:1 respectivamente. No dia seguinte, os animais eram colocados em contato e assim acontecia a reprodução. Após meia hora os embriões eram coletados e mantidos em meio para que fossem realizadas as microinjeções.

## 2.2 Microinjeção dos gRNAs e da Cas9 em ovos recém-fecundados de zebrafish

O gRNA para os diferentes alvos/exons do *fshr* foram microinjetados em embriões em estágio de uma célula (ovos recém-fecundados) (Kimmel *et al.*, 1995). Para a microinjeção, uma solução contendo 320ng de cada gRNA mais 200ng de Cas9 e 2% Phenol Red (Sigma Aldrich) foi preparada. Para cada ovo, foi injetado 10% do seu volume total, ou seja, aproximadamente 500 picolitros (pl). Os ovos são injetados através de microinjetor Narishige (IM-11-2 Pneumatic Microinjector). O mesmo protocolo foi seguido para realizar as injeções para os alvos do *ar*.

## 2.3 Análise da eficiência da técnica via T7 endonuclease

Enzima T7endonuclease I (T7E1 - Nem England BioLabs) é capaz de reconhecer e clivar regiões de DNA mal-pareados. A partir dessa técnica é possível identificar, após etapas identificadas na Figura 8, regiões em que a técnica obtivesse sucesso em induzir mutações indel nos alvos dos gRNAs.

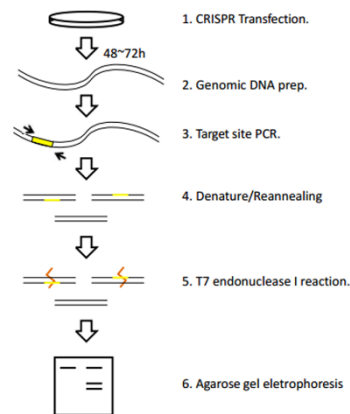


Figura 8. A técnica de T7E1 consiste em se infectar a célula de interesse com seus gRNAs (1) seguida da extração do DNA genômico (2) e ampliação da região de interesse com primers flanqueando a região alvo (3). Após a confirmação da especificidade via sequenciamento ou eletroforese, desnatura-se e renatura-se os amplicons (4) para geração dos mal-pareamentos e consequente identificação pela T7E1 destas regiões (5). Confirmação das mutações através de eletroforese em gel de agarose (6).

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 Seleção de potenciais alvos para gerar gRNA para os alvos *fshr*, *lhcg* e *ar E* **SINTESE DOS ALVOS**

A identificação dos possíveis alvos para suprimir a expressão dos genes *fshr* e *ar* foi realizada pelo software online ZiFit (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>). Este software é uma ferramenta confiável e simples para identificar os possíveis gRNA. Os alvos selecionados para este trabalho contém entre 17 à 20 nucleotídeos e todas as recomendações para evitar alvos não desejáveis, ou seja, “*off-targets*”, foram levadas em consideração. Em seguida, os gRNAs foram sintetizados utilizando protocolo do kit “GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit” (Thermo Fisher Scientific). A sequência nucleotídica dos genes foram obtidas no *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>).

A síntese da molécula de DNA molde foi realizada com primers/oligos específicos para cada alvo (ver abaixo) juntamente com o crRNA/tracrRNA (80 pares de base), conforme especificações do fabricante (Thermo fisher scientific). Conforme protocolo, a molécula de DNA molde obtida deve possuir aproximadamente 100 pares de base (pb), como foi observado em nossas amostras para os alvos do *fshr* (Figura 9). O mesmo protocolo foi seguido para o *ar* e os dados foram confirmados por eletroforese.

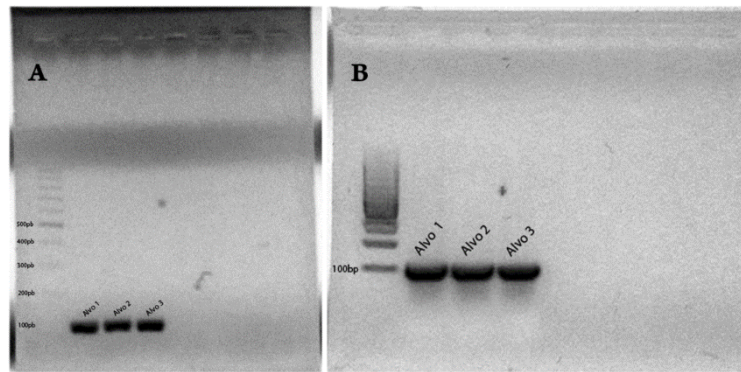


Figura 9. A. Gel de eletroforese 2% para os oligos sintetizados a partir de reações de RT-PCR com primers para os alvos do *fshr* (mostrados acima). Cada alvo representa um exon. A integridade do gRNA obtido (para os 3 alvos/exons do *fshr*) via TIV utilizando como template o produto da RT-PCR obtida em A.

A síntese do gRNA foi realizada a partir do molde de DNA obtido através de uma reação de transcrição *in vitro* (TIV), conforme instruções do fabricante (Thermo fisher scientific). O gRNA obtido teve sua integridade confirmada com eletroforese através de bandas únicas de aproximadamente 100 pares de base.

A eficiência da reação foi considerada ótima, visto que  $5\mu\text{g}$  de gRNA em ( $7\mu\text{g}$  para o alvo 1;  $5,4\mu\text{g}$  para o alvo 2 e  $3,9\mu\text{g}$  para o alvo 3) foram obtidos em média.

### 3.2 Análise da eficiência da técnica e genotipagem

Dois conjuntos de primers foram desenhados para cada alvo flanqueando os sítios de clivagem. Tais primers possuem o objetivo de isolar os três fragmentos de DNA do *fshr* que contenham as possíveis deleções. Logo, para o exon 6, um fragmento de 609 pb foi obtido. Para o exon 8, 386 pb e para o exon 9, 453pb.

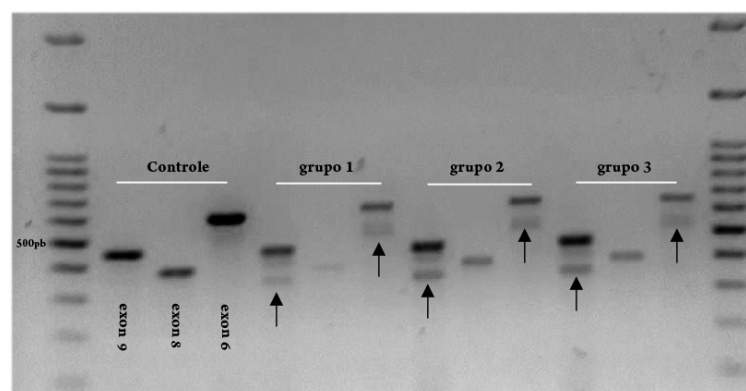


Figura 10. Comparação entre três grupos de embriões de *D. rerio* tratados com T7E1 comparados com o grupo controle (animal não injetado) para análise da eficiência da técnica com gRNAs para *fshr*. Observar que nos grupos contendo apenas embriões injetados, encontra-se bandas extras identificadas por setas. Tais bandas são decorrentes de mal-pareamentos devido a deleções de pares de bases pela técnica CRISPR/Cas-9 identificados e clivados pela T7E1. Tais padrões de bandas mostram que houve eficiência na técnica, porém, para facilitar a genotipagem dos animais knockout.

A microinjeção do gRNA para o receptor de andrógeno foi realizada em um total

de 35 embriões, verificando-se após 5 dias a ocorrência de diferentes níveis de má formação em 20% dos animais injetados (Figura 11).

Para confirmar a possível ocorrência de mutações para o *ar* nesses animais, foram realizadas genotipagens nos animais não injetados (grupo controle), animais injetados apresentando má formação e animais injetados sem má formação.

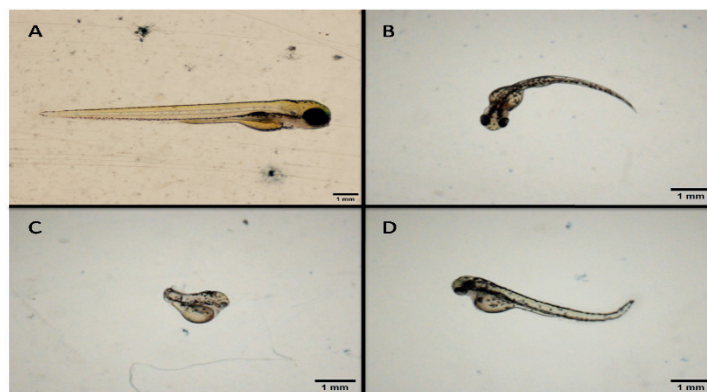


Figura 11. Registro dos animais injetados com gRNA para o receptor de andrógeno. Verificou-se que 20% dos animais injetados apresentavam algum tipo de má formação em diferentes níveis de intensidade. A: animal injetado não portador de má formação. B, C e D: animais injetados e apresentando diferentes níveis de má formação.

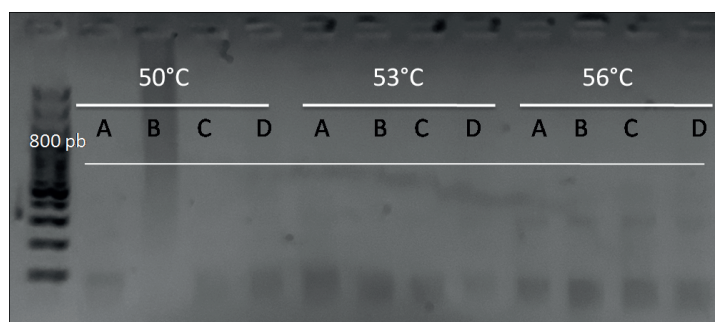


Figura 12. Resultado da comparação de diferentes temperaturas para genotipagem de três grupos de animais injetados para deleção do gene *ar*. **A:** grupo controle (não injetado), **B:** larvas de zebrafish com má formação, **C,D:** larvas de zebrafish injetadas e sem má formação.

#### 4 | DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As regiões alvo dos genes a sofrerem mutações *indel* foram determinadas e algumas tiveram sua síntese finalizada (como é o caso do *fshr* e *ar*). Os genes propostos são os receptores para o hormônio folículo estimulante (Fsh) e o receptor para andrógenos (Ar). O método pelo qual pretendeu-se inibir a expressão de tais receptores foi o sistema CRISPR-Cas9, uma técnica recente, eficiente, barata e acessível. Tal técnica já foi reproduzida com sucesso em diferentes espécies de peixes, como zebrafish (Hwang *et al.*, 2013), truta (Edvardsen *et al.*, 2014) e carpa (Zhong *et al.*, 2016). Nesse trabalho, pretendeu-se identificar as possíveis respostas do nicho espermatogonial quando genes relacionados à sua regulação perdem sua expressão definitivamente. Zhang e colaboradores (2015a) mostraram em zebrafish que a perda de expressão de ambos os ligantes (*fsh* e *lh*) não resultou

em consequências significativas para o desenvolvimento e maturação de gônadas de machos e fêmeas, porém apenas o duplo *knockout* levou à masculinização de fêmeas e ao atraso do desenvolvimento testicular. Estas observações alteram a visão clássica/tradicional da importância dos hormônios gonadotrópicos na reprodução de machos de zebrafish. Além disso, é bem provável que após o início da puberdade induzida pelo Fsh, o testículo torna-se independente deste hormônio. Tal fato é semelhante em mamíferos, onde o FSH é responsável pelo início da espermatogênese, mas não pela sua manutenção (Kumar *et al.*, 1997, Plant *et al.*, 2001, Tapanainen *et al.*, 1997). No entanto, alguns autores afirmam que estas informações ainda são bastante controversas na literatura (Kumar *et al.*, 2009). Talvez, os reguladores mais importantes em zebrafish (e também em mamíferos) estejam atuando à nível parácrino ou autócrino, como mostrado na introdução deste trabalho. Por isso, a análise de testículos *ar* (-/-) e de outros fatores parácrinos, como o Igf3 e Amh e de genes relacionados (cf. *cyp17*, *nanog*, *nanos3* e *pou5f1*) e inclusive o transcriptoma de células germinativas e somáticas isoladamente sob efeito do Fsh será de grande valia visto que andrógenos estão relacionados com a proliferação e diferenciação das espermatogônias tronco em zebrafish adulto e respondem significativamente a aplicação de Fsh recombinante em estudos *in vitro* (artigo em elaboração) naquele sentido. Zhang e colaboradores (2015b) também mostraram que a deficiência na expressão dos genes *fshr* e *lhr* sozinhos não alteram significadamente o desenvolvimento e maturação de ambas gônadas masculinas e femininas. Alguns resultados foram semelhantes ao knockout dos ligantes (Zhang *et al.*, 2015a). Em fêmeas, a deleção do *fshr* levou a sua masculinização, porém em machos, apenas um retardo no desenvolvimento gonadal foi observado. Tal evidência, corrobora com a teoria de que, semelhantemente em mamíferos, em zebrafish o Fsh é responsável apenas pela instalação da puberdade. Mais uma vez, a análise de testículos *ar* (-/-) e de outros fatores e genes relacionados com o controle fisiológico e molecular em gônadas masculinas se faz muito importante para entender o papel destes no controle da reprodução em peixes.

## REFERÊNCIAS

HESS RA, FRANCA LR. (2008) **Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium**. *Adv Exp Med Biol* 636: 1-15.

SCHULZ RW, FRANÇA LR, LAREYE JJ, LE GAC F, CHIARINI-GARCIA H, NÓBREGA RH, MIURA T. 2010. **Spermatogenesis in fish**. *Gen Comp Endocrinol* 165:390-411.

HOFMANN MC. 2008 **Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche**. *Mol Cell Endocrinol*. 288(1-2):95-103. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.012.

DE ROOIJ DG. 2006. **Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box**. *Proc Natl Acad Sci* 103(21):7939-7940

DE ROOIJ DG. 2009. **The spermatogonial stem cell niche**. *Microsc Res Tech* 72(8):580-5.

OATLEY JM, BRINSTER RL. (2008) **Regulation of spermatogonial stem cell selfrenewal in mammals**. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 263-286.

LEAL MC, CARDOSO ER, NÓBREGA RH, BATLOUNI SR, BOGERD J, FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2009 **Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations** *Biol Reprod* 10.1095/biolreprod.109.076299

NÓBREGA RH, GREEBE CD, VAN DE KANT H, BOGERD J, DE FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2010 **Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish**. Milstone DS, ed. *PLoS ONE*.; 5(9):e12808.

NÓBREGA RH. **Spermatogonial stem cells and their endocrine and paracrine regulation in zebrafish**. University of Utrecht 2014.

MENG, XIAOJUAN, et al. (2000) **Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF**. *Science* 287.5457 :1489-1493.

YOMOGIDA, K., YAGURA, Y., TADOKORO, Y. AND NISHIMUNE, Y. (2003). **Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell linederived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells**. *Biol. Reprod.* 69, 1303-1307.

SAVITT, J., SINGH, D., ZHANG, C., CHEN, L. C., FOLMER, J., SHOKAT, K. M., & WRIGHT, W. W. 2012 **The In Vivo Response of Stem and Other Undifferentiated Spermatogonia to the Reversible Inhibition of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Adult**. *Stem Cells*; 30(4), 732-740.

LOVELAND, K. L., AND D. M. ROBERTSON. (2005) **The TGF $\beta$  superfamily in Sertoli cell biology**. *Sertoli cell biology*: 227-247.

NÓBREGA RH, MORAIS RD, CRESPO D, WAAL PP DE, FRANÇA LR, SCHULZ RW, BOGERD J. 2015 **Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3**. *Endocrinology*. Oct;156(10):3804-17.

SKAAR KS, NÓBREGA RH, MAGARAKI A, OLSEN LC, SCHULZ RW, MALE R. 2011 **Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures**. *Endocrinology*. Sep;152(9):3527-40.

OATLEY, J. M., OATLEY, M J., AVARBOCK, M. R., TOBIAS, J. W. & BRINSTER, R. L. (2009) **Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem ce1111 self-renewal**. *Development*; 136, 1191-1199.

ASSIS LH, CRESPO D, MORAIS RD, FRANÇA LR, BOGERD J, SCHULZ RW. 2016 **INSL3 stimulates spermatogonial differentiation in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*)**. *Cell Tissue Res*. Feb;363(2):579-88.

LACERDA SM, COSTA GM, DE FRANÇA LR. 2014 **Biology and identity of fish spermatogonial stem cell**. *Gen Comp Endocrinol*. Oct 1;207:56-65.

GRIER HJ. 1993. **Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier**. In: RUSSELL LD & GRISWOLD MD (Eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, pp 703-739.

PUDNEY J. 1993. **Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell**. In: RUSSELL LD & GRISWOLD MD (Eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, pp 611-657.



PUDNEY J. 1995. **Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates**. *Microsc Res Tech* 32:459-497.

NELSON JS. **Fishes of the world**. . Wiley, New York, 1994; v3, p 245

Granato, M., van Eeden, F.J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., and Nüsslein-Volhard, C. (1996) **Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva**. *Development (Cambridge, England)*. 123:399-413.

Driever, W. and Fishman, M.C. (1996) **The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos**. *J. Clin. Invest.* 97(8):1788-94.

Pereira, T. **Introdução a técnica de CRISPR**. São Paulo: SBG, 2016.

JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. **2012 A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**. *Science*. Aug 17;337(6096):816-21

CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU X, JIANG W, MARRAFFINI LA, ZHANG F. 2013 **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems**. *Science*. Feb 15;339(6121):819-23.

CENCIC R & HISASHI. 2014 **Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Distal Sequences Engage CRISPR Cas9 DNA Target Cleavage**. *PLoS ONE* 9 (10): e109213.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013) **Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system**. *Nat. Biotechnol.* 31(3):227-229.

KUMAR TR, WANG Y, LU N, MATZUK MM. 1997 **Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility**. *Nat Genet.*;15:201–204.

KUMAR TR. 2009 **FSH $\beta$  knockout mouse model: a decade ago and into the future**. *Endocrine.*;36:1–5., Google Scholar CrossRef, Medline

ZHANG Z, ZHU B, GE W. 2015a **Genetic Analysis of Zebrafish Gonadotropin (FSH and LH) Functions by TALEN-Mediated Gene Disruption**. *Molecular Endocrinology* 29: 76–98.

## PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Anacardium occidentale* L. AND *Myracrodruon urundeuva* ALLEMÃO

### Sérvio Quesado Junior

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE; Camocim, Ceará, Brasil.

### Márcia Maria Mendes Marques

Universidade Federal do Piauí - UFPI; Picos, Piauí, Brasil.

### Ana Raquel Araújo da Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE; Paracuru, Ceará, Brasil

### Maria Izabel Florindo Guedes

Universidade Estadual do Ceará - UECE; Fortaleza, Ceará, Brasil.

**RESUMO:** Os antioxidantes são substâncias capazes de eliminar radicais livres e impedi-los de causar danos celulares. Neste contexto, a atividade antioxidante dos extratos alcoólicos das folhas de *Anacardium occidentale* e *Myracrodruon urundeuva* foi avaliada pelos métodos de 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis-(3-etil-benzothiazolin-6- sulfônico ácido) (ABTS). O conteúdo fenólico e análise fitoquímica dos extratos também foram avaliados. As duas espécies exibiram atividade sequestradora de radicais livres. Estes resultados estão relacionados com alto teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos. *M. urundeuva* mostrou atividade antioxidante

semelhante ao butilhidroxitolueno (BHT), se tornando uma fonte promissora de antioxidante natural.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes naturais. *Anacardium occidentale*. *Myracrodruon urundeuva*. Conteúdo fenólico. Atividade antioxidante.

**ABSTRACT:** Antioxidants are substances capable of scavenging free radicals and preventing cell damage. In this context, antioxidant activity of alcoholic extracts from leaves of *Anacardium occidentale* and *Myracrodruon urundeuva* was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH and 2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid) ABTS methods. Phenolic content and phytochemical analysis were performed for each species. Results showed that both species exhibited free radical scavenging activity. These results are directly related to high phenolic content found in the extracts. *M. urundeuva* showed antioxidant activity similar to butylhydroxytoluene (BHT) and could be considered a promising plant source of natural antioxidant.

**KEYWORDS:** Natural antioxidants. *Anacardium occidentale*. *Myracrodruon urundeuva*, phenolic content, antioxidant activity..

## 1 | INTRODUÇÃO

Anacardiaceae é uma família predominantemente pantropical, Pantrópicas, sendo também observada representante nas áreas temperadas da Europa, Ásia e América do Norte. Compreende cerca de 80 gêneros e 800 espécies, representada no Brasil por 15 gêneros e aproximadamente 70 espécies pertencentes a três diferentes tribos: *Mangiferae*, *Spondiaceae* e *Rhodeae* (HALL; GIL 2017; ROCHA et al., 2017; MACHADO; KONNO 2010).

Suas espécies são importantes na produção de madeira de boa qualidade, *Astronium fraxinifolium* Schott (gonçalo-alves), *Astronium graveolens* Jacq. (guaritá), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (aroeira-branca) e *Schinopsis brasiliensis* Engl. (braúna); na produção de frutos comestíveis, *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Mangifera indica* L. (mangueira), *Spondias* spp. (cajás), *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro), *Spondias purpurea* L. (seriguela); ornamental, *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), *Rhus succedanea* L. (charão) e *Schinus molle* L. (aroeira-salsa) (TOLKER, 2013).

Muitas espécies de Anacardiaceae são usadas na medicina popular, podemos citar *Myracrodruon urundeuva* Allemão, a aroeira-do-sertão, ou simplesmente aroeira. A casca, as folhas e as raízes são usadas na forma de decocto e infusão em aguardente, como balsâmica e hemostática, contra inflamação de garganta, para curar gastrite, como regulador menstrual, contra as doenças das vias respiratórias e do aparelho urinário, nas hemoptises, metrorragias e diarreias, e são também muito empregadas no tratamento caseiro das inflamações e de úlceras e feridas, neste caso através de banhos (MAIA, 2004).

*Anacardium occidentale* L. conhecido popularmente como cajueiro, é usado na medicina caseira principalmente, no Nordeste brasileiro para aliviar dor de dente, bronquites, artrites, cólicas intestinais, icterícia e até mesmo usado como afrodisíaco (SILVA; ALMEIDA 2013). A entrecasca tem emprego como antiasmático, antidiarréico, adstringente, depurativo, tônico e antidiabético. O chá da entrecasca obtido por cozimento tem uso tópico através de bochechos e gargarejos para o tratamento de feridas e úlceras na boca e em certas infecções da garganta, podendo também ser ingerido para o tratamento de reumatismo (SOUSA et al., 2004).

A aroeira e o caju são importantes fontes de compostos fenólicos (LORENZI; MATOS 2008). Os compostos fenólicos possuem ação antioxidante e têm um papel importante por atuarem na inibição dos radicais livres formados. Os danos oxidativos provocados por radicais nas células e tecidos têm sido relacionados a uma série de doenças que afetam o ser humano, como aterosclerose, isquemia, doenças auto imunes e inflamatórias crônicas, além de serem considerados causas do envelhecimento. Em muitas dessas doenças a natureza da espécie radicalar não é conhecida, tornando difícil o desenvolvimento de fármacos com propriedades antioxidantes (VILA, 2006). Alguns antioxidantes sintéticos como BHA (butil-

hidroxianisol), BHT (butil hidroxi tolueno) e TBHQ (terci-butil-hidroquinona) são aplicados em óleos e alimentos gordurosos para prevenir deterioração oxidativa, mas tem sido associado a esses compostos propriedades carcinogênicas, acarretando maior interesse por parte da comunidade científica em estudos com antioxidantes naturais (RAMALHO; JORGE, 2006).

O presente estudo objetivou avaliar a composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *A. occidentale* e *M. urundeuva*, bem como determinar a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*, pelos métodos de captura de radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>+</sup>.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Folhas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) foram coletadas no município de Crateús, Ceará. As coordenadas e altitude do local foram 5°12,187'S 40°39,674'W e 308,6 metros, respectivamente. Foi preparada uma exsicata e depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da UFC, sob o número de registro 45.743. A planta foi identificada por Antônio Sérgio Farias Castro como *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

As folhas de *Anacardium occidentale* (cajueiro) foram coletadas em Fortaleza, Ceará. As coordenadas e altitude do local foram 3°50,807'S 38°28,290'W e 19,2 metros, respectivamente. Foi preparada uma exsicata e depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) sob o número de registro 45.744. A planta foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes como *Anacardium occidentale* Linneus.

### 2.2 Preparação dos extratos

As folhas de aroeira e cajueiro foram secas em estufa a 50° C. Para a obtenção do extrato etanólico as folhas foram trituradas e submetidas à extração com etanol absoluto à temperatura ambiente por uma semana. A solução resultante foi filtrada e depois concentrada em evaporador rotatório.

### 2.3 Análise fitoquímica

Os testes dos constituintes químicos das folhas da planta foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009).

### 2.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados através do método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, utilizando o ácido gálico como padrão

de referência (Souza, 2007). Cada extrato etanólico foi dissolvido em metanol para preparar soluções de 150 ppm. Em uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada solução resultante, foi acrescido 50  $\mu$ L do reagente de *Folin-Ciocalteu* e 6 mL de água destilada. Após um minuto, adicionou-se 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15%) e agitou-se por 30 segundos. Finalmente, o volume da solução foi completado para 10 mL com água destilada. A mistura foi armazenada ao abrigo da luz por duas horas e, logo em seguida, a absorbância foi medida a 750 nm em cubetas de vidro, o tubo branco continha apenas metanol e reagentes. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de fenóis totais foi determinado pela comparação da absorbância das amostras com uma curva padrão de ácido gálico e os resultados expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

## 2.5 Avaliação da atividade antioxidante

### 2.5.1 ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante total (AAT), foi preparada uma solução estoque de ABTS, solução de persulfato de sódio, radical ABTS e diluições sucessivas da amostra, conforme segue abaixo:

#### 1. Preparo de solução estoque de ABTS (7 mM)

Em um balão volumétrico (100mL) colocou-se 384 mg de ABTS e o volume foi completado com água destilada. Depois de homogeneizado, foi transferido para um frasco de vidro âmbar e armazenado em geladeira até o uso.

#### 2. Preparo de persulfato de potássio (140 mM)

Em um balão volumétrico foram dissolvidos 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada até completar o volume 10 mL. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e transferida para frasco de vidro âmbar e armazenado em geladeira até o uso.

#### 3. Preparo do radical ABTS

Foram misturados 5 mL da solução de ABTS com 88  $\mu$ L da solução de persulfato de potássio. A solução foi homogeneizada e foi mantida no escuro por 16 horas. Após esse período, foi retirado 1 mL da solução e completado até 100mL com etanol. A leitura da absorbância foi feita a 734nm.

#### 4. Diluições das amostras

Uma solução estoque foi preparada utilizando 15 mg dos extratos brutos e 1,5mL de etanol absoluto (10.000ppm). A partir dessa concentração, diluições sucessivas foram realizadas para obter concentrações de 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5ppm. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

#### 5. Determinação da AAT

Em ambiente escuro foram transferidos 30  $\mu$ L de cada diluição para tubos de ensaio com 3 mL do radical ABTS. Os tubos foram homogeneizados e deixados

em repouso por 6 minutos. Em um tubo adicionou-se apenas álcool etílico (branco) e em outro tubo apenas o reagente ABTS. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 734 nm.

#### 6. Cálculos

Foram feitas as médias dos valores obtidos e a partir delas, obteve-se o índice de varredura (IV), conforme a fórmula a seguir:

$$IV = \left( \frac{\text{AbsABTS} - \text{AbsAmostra}}{\text{AbsABTS}} \right) \times 100$$

Um gráfico foi produzido com o eixo-x contendo os valores das diluições e o eixo-y os valores dos IVs. Em seguida, calculou-se a reta de regressão linear e dela o EC<sub>50</sub>, ou seja, ponto em que a concentração de antioxidantes da amostra consome 50% da quantidade inicial do radical (RE et al., 1999, com modificações).

### 2.5.2 DPPH

Para a determinação da AAT foram preparadas a solução estoque de DPPH e as diluições da amostra para se obter a atividade antioxidante total, conforme segue abaixo.

#### 1. Preparo de solução estoque de DPPH

Pesou-se 5,2 mg de DPPH e acrescentou-se metanol absoluto em um balão volumétrico de 200mL até completar o volume.

#### 2. Diluições da amostra

Uma solução estoque foi preparada utilizando 30 mg dos extratos brutos e 3 mL de etanol absoluto (10.000ppm). A partir dessa concentração, diluições sucessivas foram realizadas para obter concentrações de 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5ppm. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

#### 3. Determinação da AAT

Transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio e acrescentou-se 3,9 mL da solução estoque de DPPH, homogenizando. Em um tubo adicionou-se apenas álcool metílico absoluto (branco) e em outro tubo apenas o reagente DPPH. Todos os tubos permaneceram por uma hora em ambiente sem luz. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro em 515 nm (Yepez et al., 2002)

#### 4. Cálculos

Foram feitas as médias dos valores obtidos e a partir delas, obteve-se o índice de varredura (IV), de acordo com a fórmula:

$$IV = \left( \frac{\text{AbsDPPH} - \text{AbsAmostra}}{\text{AbsDPPH}} \right) \times 100$$

Um gráfico foi produzido e calculou-se o EC<sub>50</sub> conforme descrito na metodologia

para ABTS.

## 2.6 Análise estatística

Os valores de média  $\pm$  desvio padrão foram calculados. Foi usado o teste de variância (ANOVA) para determinar as diferenças estatísticas entre os extratos de Anacardiaceae e o padrão, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de  $P < 0,05$ .

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica revelou a presença de fenol e flavononóis no extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* (aroeira) e *A. occidentale* (cajueiro). Não foram detectados flavanonas, flavonóis, xantonas e saponinas. No entanto, as espécies diferiram no tipo de tanino: taninos condensados em *M. urundeuva* e taninos hidrolisáveis em *A. occidentale* (Tabela 1).

A entrecasca é a principal parte de *M. urundeuva* e *A. occidentale* usada na medicina caseira, sendo interessante comparar a composição da entrecasca com a dos extratos etanólico extraídos das folhas. Lorenzi e Matos (2008) relatam que na entrecasca da aroeira foram encontrados diversos compostos fenólicos, dentre eles taninos dos tipos catéquico e pirogálico, chalconas diméricas e outros flavonóides, que se mostraram biologicamente ativos. Na entrecasca do cajueiro pode-se detectar a presença de esteróides, flavonóides, tanino, catequinas e outros fenóis.

Espécie	Fenol	Taninos Hidrolisáveis	Taninos Condensados ou Catéquicos	Flavanonóis	Flavanonas, flavonóis, xantonas	Saponinas
<i>M. urundeuva</i>	+	-	+	+	-	-
<i>A. occidentale</i>	+	+	-	+	-	-

Tabela 1. Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos de *M. urundeuva* Allemão e *A. occidentale* L.

(+) detectado; (-) não detectado

A partir da análise fitoquímica as folhas, de aroeira e cajueiro, possuem composição química semelhante as da entrecasca. Ademais, as folhas de aroeira apresentam fenóis totais, taninos catéquicos e flavonóides. As folhas de cajueiro apresentaram fenóis totais, taninos e flavonóides, porém não foi detectada a presença de catequinas. Contudo, existe ainda a possibilidade de os flavanonóis das folhas terem mascarado a presença de outros componentes (Matos, 2009).

A curva de calibração de concentrações conhecidas de ácido gálico para a determinação do teor de fenóis totais é mostrada na Figura 1.

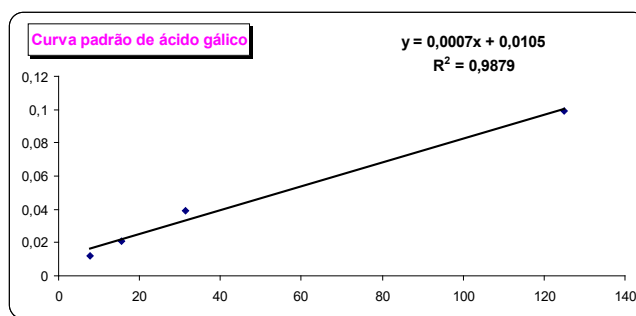


Figura 1. Curva padrão do ácido gálico

A determinação dos fenóis totais pelo método *Folin-Ciocalteu*, expressos como EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato, são apresentados na Tabela 2. A quantidade de compostos fenólicos no extrato de *M. urundeuva* foi de 388,86 mg GAE/g maior que *A. occidentale* que obteve 280,93 mg GAE/g. Os resultados mostram que as espécies de *M. urundeuva* e *A. occidentale* são ricas em fenóis totais, pois apresentam concentrações de fenóis maior que 100 mg GAE/g (OLIVEIRA et al., 2012; VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

Amostras	Conteúdo de fenóis totais (mg de EAG/g de extrato ± DP)
<i>M. urundeuva</i>	388,86 ± 23,96 <sup>a</sup>
<i>A. occidentale</i>	280,93 ± 19,06 <sup>b</sup>

Tabela 2. Compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos de *M. urundeuva* Allemão e *A. occidentale* L.

EAG: equivalente de ácido gálico. DP: desvio padrão da média

A atividade antioxidante foi realizada pelos métodos de sequestro de radical livre ABTS e DPPH com a EC<sub>50</sub> expressa em mg/mL, que corresponde à quantidade de extrato necessária para reduzir o radical em 50%; assim, quanto menor o EC<sub>50</sub>, melhor é a capacidade antioxidante do extrato. O antioxidante sintético BHT foi usado como padrão (Tabela 3).

Extratos	ABTS	DPPH
	(EC <sub>50</sub> ± DP) mg/mL	(EC <sub>50</sub> ± DP) mg/mL
<i>M. urundeuva</i>	0,279 ± 0,0119 <sup>a</sup>	0,217 ± 0,0014 <sup>b</sup>
<i>A. occidentale</i>	0,350 ± 0,0255 <sup>b</sup>	0,260 ± 0,0070 <sup>c</sup>
BHT	0,309 ± 0,0026 <sup>a</sup>	0,165 ± 0,0075 <sup>a</sup>

Tabela 3. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de *M. urundeuva* Allemão e *A. occidentale* L. em EC<sub>50</sub>.

EC<sub>50</sub>: concentração eficiente de 50%. DP: desvio padrão. Letras diferentes referem-se a dados estatisticamente distintos (P<0,05).



Pelo método de DPPH todos os extratos tiveram atividade antioxidante diferente, com valor melhor para BHT ( $EC_{50}$  de  $0,165 \pm 0,0075$  mg/mL) seguido de *M. urundeuva* ( $EC_{50}$  de  $0,217 \pm 0,0014$  mg/mL) e *A. occidentale* ( $EC_{50}$  de  $0,260 \pm 0,0070$  mg/mL).

O extrato de *M. urundeuva* ( $EC_{50}$   $0,279 \pm 0,0119$ ) apresentou atividade antioxidante melhor que o extrato de *A. occidentale* ( $EC_{50}$   $0,350 \pm 0,0255$ ) e similar ( $P < 0,05$ ) ao BHT ( $EC_{50}$  de  $0,309 \pm 0,0026$ ), através do método de ABTS. Como não há diferença entre o poder antioxidante de *M. urundeuva* e do BHT medido pelo método de ABTS, o extrato obtido das folhas de aroeira poderia ter a mesma aplicação que o BHT, que é utilizado como conservante em alimentos gordurosos (BORGUINI, 2006).

Os resultados mostram que o extrato de *M. urundeuva* tem ação antioxidante melhor que o extrato de *A. occidentale* e similar ao BHT, através do método de ABTS. Analisando os resultados pelo método DPPH, os extratos de *M. urundeuva* e *A. occidentale* não apresentaram atividade antioxidante comparável ao BHT. De acordo com Cabral et al. (2009), essa diferença na atividade antioxidante da amostra pode ocorrer devido o método empregado. Rufino et al. (2010) demonstraram que o método ABTS<sup>+</sup> é geralmente indicado para compostos hidrofílicos e o método DPPH é mais empregado com extratos contendo compostos hidrofílicos e lipofílicos. Ambos os métodos são utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

As folhas de *Myracrodruon urundeuva* e *Anacardium occidentale* apresentaram composição química semelhante à sua respectiva entrecasca, sendo um bom indicativo de que as folhas poderão substituir o uso da entrecasca na medicina caseira, reduzindo o impacto sobre as plantas estudadas, notadamente *M. urundeuva* está na lista de espécies ameaçadas de extinção. A atividade antioxidante de *Anacardium occidentale* e *Myracrodruon urundeuva* pode ser justificada pela quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos, ou seja, *M. urundeuva* apresentou maior teor de fenóis que *A. occidentale*, conseqüentemente teve maior atividade antioxidante. Novos estudos necessitam ser conduzidos em busca do isolamento, purificação e identificação e avaliação da toxicidade dos compostos bioativos das espécies de Anacardiaceae.

#### REFERÊNCIAS

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional.** São Paulo: Faculdade de Saúde Pública / USP, 2006. Tese de doutorado.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI,

M.; ROSALEN, P. L. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira**. Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

HALL, C.F.; GIL, A.S.B. **Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Anacardiaceae**. Rodriguésia, 68, n.3, p. 911-916, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, N.C., KONNO, T.U.P. **Flórua do parque nacional da restinga de jurubatiba, rio de janeiro, brasil: anacardiaceae**. Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, v.68, n.3-4, p.173-176, 2010.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: Ed. D&Z, 2004.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

OLIVEIRA, L. M.; CARDOSO, N. S. N.; FERNANDEZ, L. G.; ROQUE, M. R. A.; SANTANA, J. R. F.; PELACANI, C. R.; CASTRO, R. D. **The effect of growing conditions on phenolic compounds and antimicrobial activity of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão**. African Journal of Biotechnology, Nairobi, v. 11, n. 41, p. 9770-9775, 2012.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos**. Química Nova, V. 29, N. 4, 755-760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay**. Free Radical Biology and Medicine, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA, L. A., ROCHA, A. M., PACHECO, A. C. L., ABREU, M. C. **Diferenças foliares morfoanatômicas de quatro espécies da família anacardiaceae**. Caderno de Pesquisa, série Biologia v.27, n. 2, p. 35-48, 2017.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil**. Food Chemistry, v.121, p.996-1002, 2010.

SILVA, A.E.S.; ALMEIDA, S.S.M.S. **Análise fitoquímica das cascas do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale* L. – Anacardiaceae)**. Estação Científica (UNIFAP) Macapá, v. 3, n. 2, p. 81-88, jul.-dez. 2013.

SOUSA, C. M. M. SILVA H. R. E, VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L. S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO, M.S., CHAVES, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, M. P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2004.

TÖLKE, E.E.A.D. **Estudos estruturais em órgãos reprodutivos de *Tapirira guianensis* aubl. (anacardiaceae)**. Campinas, SP, 2013. Dissertação de mestrado.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. **Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador**. Food Chemistry, Barking, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VILA, F.C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos / USP, 2006. Dissertação de mestrado.

YEPEZ, B., ESPINOSA, M., LÓPEZ, S., BOLAÑOS, G. **Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction**. *Fluid Phase Equilibria*, v. 194, p. 879-884, 2002.

## LIMNOLOGIA COMPARADA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE HABITATS DO RESERVATÓRIO DE ROSANA, RIO PARANAPANEMA (SP/PR)

### **Rafaela Shizuko Yamashita Kimura**

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – São Paulo

### **João Felipe Denys Pereira**

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – São Paulo

### **Maria Luisa Passos Frigero**

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – São Paulo

### **Marco Aurélio Pessotto**

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – São Paulo

### **Pedro Vinícius Melo dos Santos**

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – São Paulo

### **Marcos Gomes Nogueira**

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – São Paulo

**RESUMO:** O reservatório da usina hidrelétrica de Rosana está localizado no trecho inferior do rio Paranapanema, na divisa entre os Estados de São Paulo e Paraná. Apesar de operar como um sistema a fio d'água, isso é, com baixo tempo de retenção água, possui grandes dimensões (e.g. área de 220 km<sup>2</sup> e eixo longitudinal de aproximadamente 90 km), o que pode levar ao estabelecimento de uma considerável heterogeneidade espacial. Para o estudo foram selecionados 3 tipos de

habitats aquáticos associados ao reservatório e considerados os mais representativos: ambiente lótico no compartimento superior, lagoa marginal conectada ao canal principal do rio e ambiente lêntico próximo a barragem. Os trabalhos de campo foram realizados no início do período seco, em junho de 2018. As seguintes variáveis limnológicas foram determinadas em cada local: profundidade, transparência, concentração de clorofila *a* total e perfis verticais de temperatura, pH, condutividade elétrica, potencial de óxido-redução, oxigênio dissolvido e sólidos totais dissolvidos. Quando pertinente os resultados foram confrontados com a legislação vigente para qualidade de água. A análise descritiva dos dados, complementada por uma ordenação feita através de uma análise de componentes principais, permitiu identificar tendências diferenciadas para a maioria das variáveis, tais como maior turbidez e concentração de clorofila fitoplanctônica na Lagoa e maior pH e concentração de oxigênio no compartimento lêntico. A comparação entre os habitats corrobora a hipótese inicial de haver uma importante variabilidade de condições limnológicas, representativas dos ecossistemas aquáticos regionais e que certamente contribuem para a manutenção de uma alta diversidade de comunidades bióticas e de complexas interações ecológicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ambiente lótico, ambiente

## COMPARATIVE LIMNOLOGY OF THE MAIN TYPES OF HABITATS OF ROSANA RESERVOIR, PARANAPANEMA RIVER (SP/PR)

**ABSTRACT:** The hydropower reservoir of Rosana is in the lower stretch of Paranapanema River, in the border of São Paulo and Paraná States. Although it operates as a run-of-river system, with low water retention time, the reservoir has large physical dimensions (220 km<sup>2</sup> in area and longitudinal axis of approximately 90 km), what can promote a considerable spatial heterogeneity. In the study it was selected 3 types of aquatic habitats associated to the reservoir and considered the most representatives: Lotic environment in the reservoir upstream zone, marginal Lagoon connected to the river main channel and Lentic environment close to the dam. The following limnological variables were determined in each site: depth, transparency, chlorophyll concentration and vertical profiles of temperature, pH, electric conductivity, redox potential, dissolved oxygen and total dissolved solids. Some data were also confronted with the water quality legislation. The descriptive data analyzes, complemented by an ordination (principal component analyzes), make possible to identify differential trends for most limnological variables, such as higher turbidity and phytoplankton chlorophyll in the Lagoon and higher oxygen and pH in the Lentic compartment. Comparisons among habitats corroborated the initial hypothesis of the existence of an important variability in the limnological conditions, which are representative of the regional aquatic ecosystems and certainly contribute to the maintenance of a high diversity of biotic communities and complex ecological interactions.

**KEYWORDS:** Lotic environment, lentic environment, lagoon, physical-chemical, chlorophyll

### 1 | INTRODUÇÃO

A água é um recurso invariável e vital, estabelecendo o equilíbrio do planeta por estar presente nos ciclos estacionais climáticos e nos ciclos biológicos, portanto, esse é um recurso limitante de grande importância para a vida na Terra. Em termos de volume a água tem se mantido no planeta de forma relativamente constante, nos últimos 500 milhões de anos (1.386 milhões de km<sup>3</sup>). Contudo, consideráveis variações temporais ocorrem nas quantidades armazenadas nos diferentes reservatórios: líquido, sólido, vapor e biomassa, cuja dinâmica é determinada por um potente mecanismo de renovação movido pela energia solar e pela força gravitacional (Rebouças, 2006). A parcela de água que precipita sobre as porções continentais é drenada pelos rios, abastece lagos e reservatórios, reconstitui a umidade do solo, responsável pela manutenção da cobertura vegetal, além de repor os estoques armazenados no subsolo.

Os rios representam uma parcela de água de grande importância dentro da porção continental pois transportam recursos naturais indispensáveis aos seres vivos e possuem grande importância socioeconômica, cultural e histórica.

Entre os grandes rios da região sudeste do país, bacia do alto rio Paraná, podemos mencionar o Paranapanema, que nasce na Serra de Paranapiacaba (ca. 800 m), sul do estado de São Paulo, possui uma extensão de 929 km, numa orientação leste e oeste e em grande parte fazendo a divisa com o estado do Paraná. Sua foz (ca. 258 m) encontra-se no rio Paraná (Sampaio, 1889), atualmente a jusante da usina hidrelétrica (UHE) de Porto Primavera (SP/MS).

A declividade natural do rio Paranapanema foi intensamente aproveitada para fins de exploração energética, com a construção ao longo das últimas décadas de um sistema em cascata de 11 UHEs (Nogueira *et al.*, 2006). Outra característica marcante desse rio, sobretudo quando comparado a outros sistemas fluviais de mesmo porte da região (e.g. rio Tietê no centro do estado de São Paulo), é a boa qualidade de suas águas com o predomínio de condições oligotróficas e oligomesotróficas (Pomari *et al.*, 2018).

O reservatório da UHE de Rosana, objeto de nosso estudo, está localizado no trecho final do rio Paranapanema, no extremo oeste do Estado de São Paulo, em uma região conhecida como Pontal do Paranapanema – divisa entre os Estados de São Paulo e Paraná. Trata-se de um corpo d'água de grande porte, com uma área inundada de 220 km<sup>2</sup> e um eixo longitudinal de aproximadamente 90 km.

O objetivo do trabalho foi identificar e ressaltar a diversidade de ambientes aquáticos associados ao reservatório de Rosana, através de uma análise limnológica comparativa entre os principais tipos de habitats encontrados.

Embora seja do tipo fio d'água, com tempo médio de residência da água relativamente curto, em torno de 20 dias (Nogueira *et al.*, 2006), suas grandes dimensões suscitaram a questão de haver uma relativa heterogeneidade espacial nas condições limnológicas do sistema.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Três distintos habitats aquáticos foram selecionados para o desenvolvimento do estudo na área de influência do reservatório da UHE Rosana: um trecho no compartimento lótico (22°36'6"S; 52°9'44"O), uma lagoa marginal permanentemente conectada ao canal principal (22°38'1"S; 52°9'40"O) e um trecho no compartimento lêntico próximo a barragem (22°36'20"S; 52°51'39"O), conforme apresentado na Figura 1.

Os trabalhos de campo foram executados no mês de junho de 2018. Utilizando-se uma sonda multiparâmetros HORIBA (modelo U-52), foram determinados *in situ* perfis verticais (medidas a cada metro de profundidade) de temperatura (°C), pH,

potencial de oxido redução (mV), condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), turbidez (NTU); oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e sólidos totais dissolvidos ( $\text{g L}^{-1}$ ). Mediu-se também a profundidade (sonar Speedtech) e a transparência da água (disco de Secchi). Simultaneamente, foram coletadas amostras de água (1L por ponto) para análise da concentração de clorofila *a* total (espectrofotometria), um indicador da biomassa fitoplanctônica, sendo esta realizada pelo método de maceração manual dos filtros (Millipore AP40) e extração do pigmento em acetona 90% a frio (Golterman *et al.*, 1978).

Os dados obtidos foram apresentados em forma de tabela e gráficos com auxílio do programa Sigma plot 11 e confrontados, quando pertinente, com valores de referência da Resolução CONAMA 357/2005, sobre a classificação dos corpos d'água no país.

Uma análise de componentes principais (*software* PRIMER 6) foi realizada com o intuito de ordenar o conjunto de informações limnológicas e permitir discriminar as diferenças entre os distintos habitats considerados.

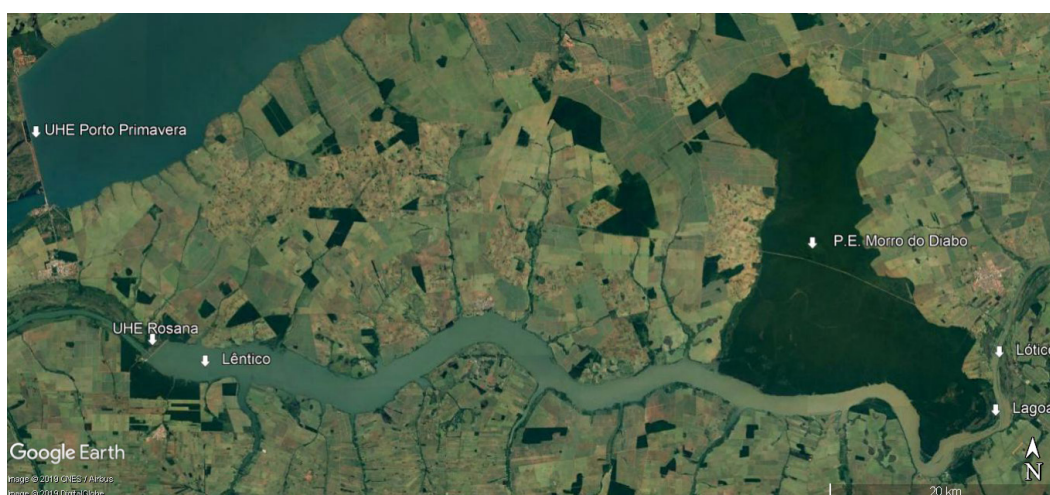


Figura 1. Trecho final do rio Paranapanema, com a localização dos pontos de amostragem (Lótico, Lagoa e Léntico) na área de influência do reservatório de Rosana. Em destaque na imagem o Parque Estadual do Morro do Diabo e a UHE de Porto Primavera (rio Paraná).

### 3 | RESULTADOS

Os valores das variáveis limnológicas medidas em perfis verticais nos três diferentes tipos de habitats aquáticos considerados são apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 também estão incluídos os valores de referência da Resolução 357 (classe 2), para fins comparativos.

A fim de facilitar a comparação entre os habitats distribuídos ao longo do eixo principal do reservatório, foram confeccionadas as Figuras 2, 3, 4, 5 e 6, correspondentes às variáveis transparência, turbidez, pH, condutividade elétrica e clorofila *a* total, respectivamente.

Por sua vez, as Figuras 7 e 8 mostram um perfil detalhado da distribuição da

temperatura e do oxigênio ao longo da coluna d'água analisada em cada um dos habitats.

A análise de componentes principais (Figura 9) explicou uma elevada percentagem da variabilidade dos dados (60,4 % componente 1; 39,6% componente 2). Todas as variáveis, com exceção do pH, apresentaram uma elevada correlação (> 0,4) com pelo menos um dos dois primeiros componentes da análise (Tabela 3).

	Temp. (°C)	pH	REDOX (mV)	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)	O.D. ( $\text{mg L}^{-1}$ )	O.D. (%)	S.T.D. ( $\text{g L}^{-1}$ )
Lótico	22,0 (0,1)	7,1 (0,1)	388 (16)	57,5 (0,5)	4,2 (0,3)	7,0 (0,1)	81,9 (2,1)	0,037 (0,0)
Lagoa	21,7 (0,2)	7,04 (0,06)	373 (9)	56,3 (0,0)	8,4 (0,3)	5,8 (0,3)	67,6 (4,5)	0,036 (0,0)
Lêntico	20,7 (0,07)	7,6 (0,1)	354 (20)	55,0 (0)	1,4 (0,6)	9,0 (0,3)	102,8 (3,6)	0,036 (0,0)

Tabela 1. Valores médios para a coluna d'água, e respectivos desvios-padrão, das variáveis limnológicas medidas nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

	Lótico	Lagoa	Lêntico	Classe 2*
pH	7,13	7,04	7,62	6 a 9
Turbidez (NTU)	4,24	8,49	1,43	< 100
S. T. D. ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,037	0,036	0,036	< 0,50
D. O. ( $\text{mg L}^{-1}$ )	7,0	5,8	9,0	> 5
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,9	4,9	2,0	< 30

Tabela 2. Valores médios das variáveis limnológicas medidas nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR), e padrões de referência para águas de classe 2 (Conama 357).

\* Enquadramento atual do rio Paranapanema em sua maior extensão.

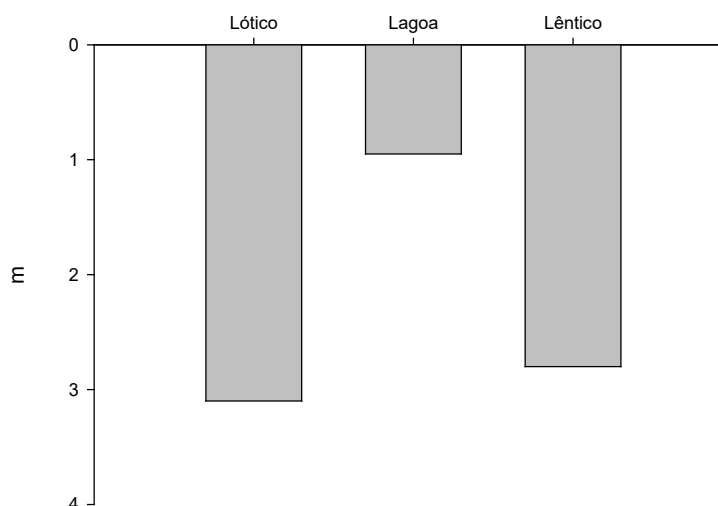


Figura 2. Variação da transparência da água nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).



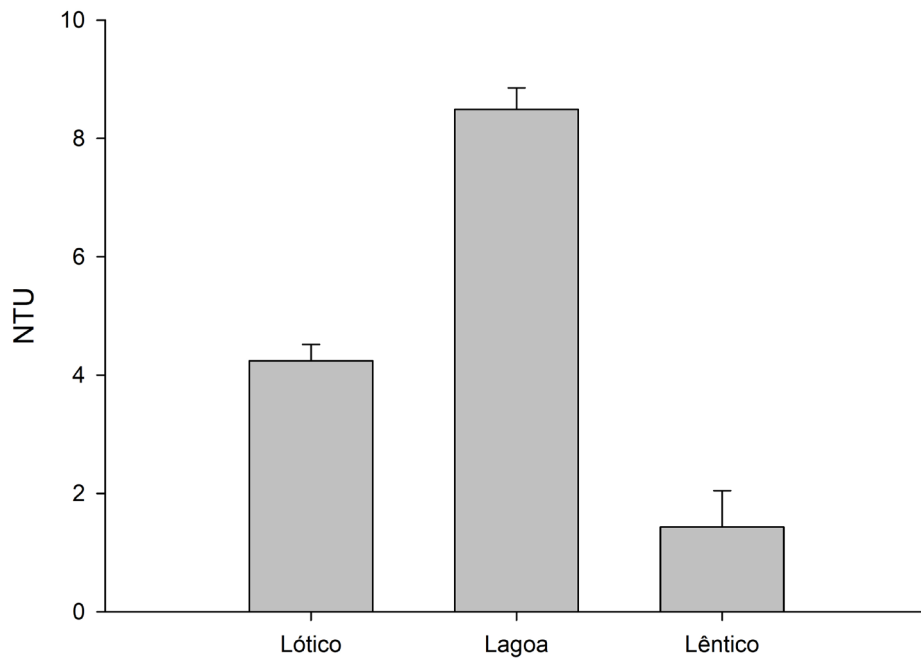


Figura 3. Variação da turbidez da água (média e desvio-padrão) nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

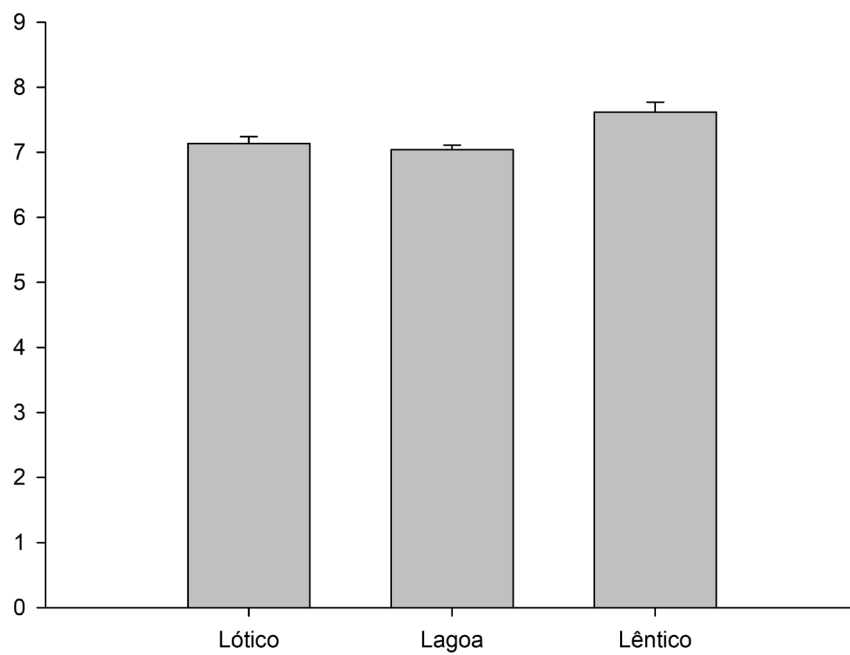


Figura 4. Variação do pH da água (média e desvio-padrão) nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

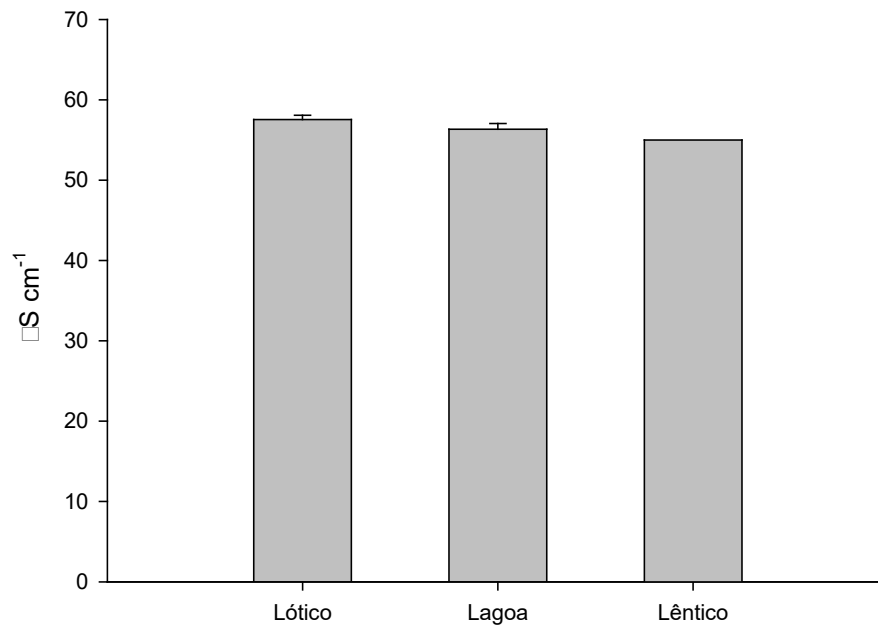


Figura 5. Variação da condutividade elétrica da água (média e desvio-padrão) nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

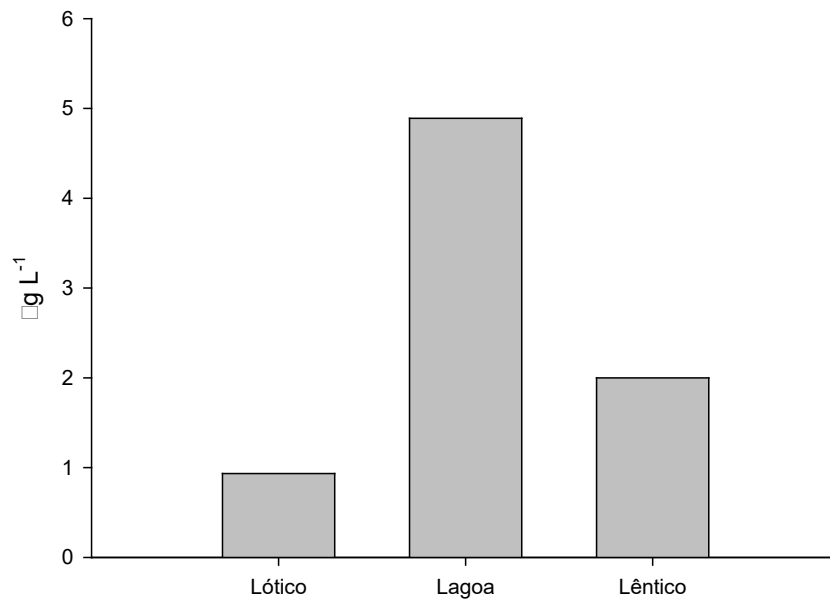


Figura 6. Variação da concentração de clorofila a nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

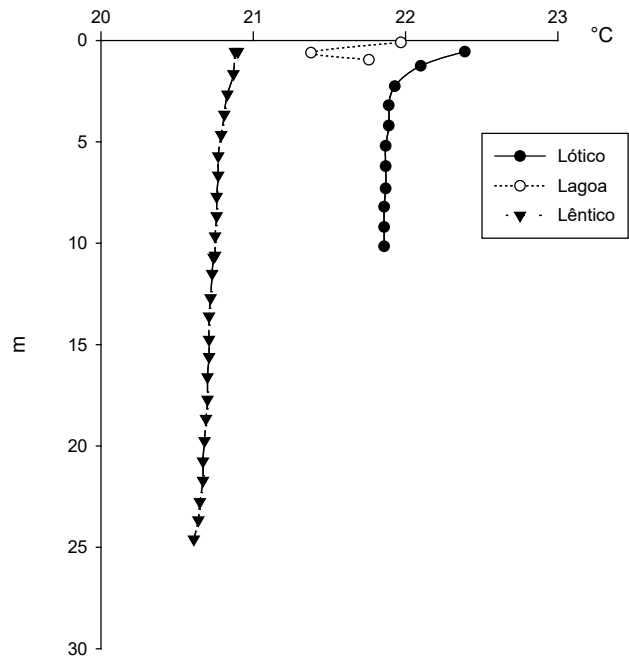


Figura 7. Variação vertical da temperatura da água nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

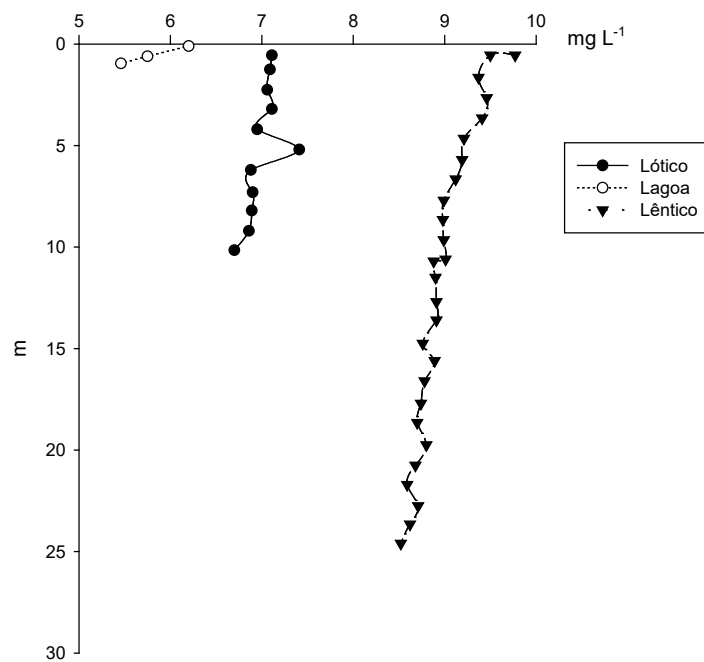


Figura 8. Variação vertical da concentração de oxigênio dissolvido na água nos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

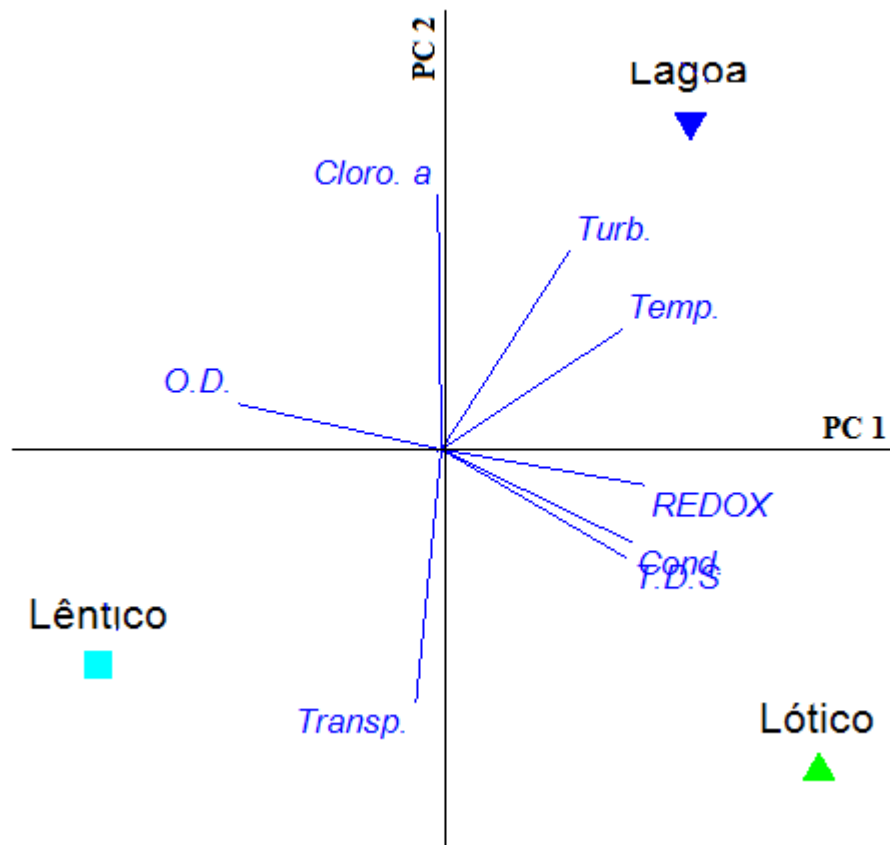


Figura 9. Resultado gráfico da análise de componentes principais (componentes 1 e 2) com base nas características limnológicas dos diferentes habitats aquáticos do reservatório de Rosana, rio Paranapanema (SP/PR).

Variáveis	PC1	PC2
Transparência	-0,056	-0,555
Temperatura	0,398	0,265
pH	-0,126	-0,062
REDOX	0,448	-0,078
Condutividade	0,421	-0,205
Turbidez	0,282	0,437
O.D.	-0,445	0,099
T.D.S	0,409	-0,239
Clorofila <i>a</i>	-0,008	0,559

Tabela 3. Valores de correlação (scores) entre as variáveis limnológicas e os componentes 1 e 2 da análise de componentes principais.

#### 4 | DISCUSSÃO

Os reservatórios construídos para atender as demandas de geração de energia elétrica podem ser classificados em dois tipos básicos, em termos de operação: de acumulação e fio d'água. A principal diferença entre eles está relacionada ao tempo de retenção hidráulica, mais elevado naqueles do tipo de acumulação, geralmente localizados na porção superior de bacias hidrográficas e que além da geração

têm a função de estocar e controlar a vazão de jusante. Estes distintos modelos operacionais têm implicações profundas na estrutura e funcionamento ecológico dos trechos represados, sendo que a magnitude das mudanças tende a ser menor nos reservatórios fio d'água, pelo fato destes preservarem as condições lóaticas ou semi-lóaticas (Nogueira et al., 2012).

Conforme mencionado anteriormente, o reservatório de Rosana, embora opere a fio d'água, é um sistema de grande porte (área de 220 km<sup>2</sup> e 90 km de eixo longitudinal) o que pode levar uma considerável heterogeneidade nas condições limnológicas dos seus distintos compartimentos.

Tal hipótese foi claramente demonstrada através dos resultados da análise de componentes principais, que resultou em uma nítida separação entre os três tipos de habitats considerados – trecho lóatico, lagoa marginal e trecho lêntico.

O ponto representado pela Lagoa marginal se destacou por apresentar maior turbidez, maior concentração de clorofila e menor concentração de oxigênio. Embora a transparência tenha sido consideravelmente mais baixa, comparada aos demais habitats, isso se deve ao fato de a lagoa apresentar uma baixa profundidade (ca. 1 m), uma vez que a visualização do disco de Secchi se deu até o fundo. Essa condição de penetração de luz em toda a coluna d'água, associada a uma maior estabilidade física e, provavelmente, maior disponibilidade de nutrientes, favorece o desenvolvimento do fitoplâncton, conforme indicado pela clorofila a. Por sua vez, tanto a menor concentração de oxigênio, bem como a maior turbidez (ainda que essa não limite a fotossíntese), devem estar relacionadas à decomposição das macrófitas aquáticas, que se proliferam intensamente nesse tipo de ambiente mas que entram em senescência durante o período de outono/inverno (período das amostragens). Em um estudo realizado na mesma região, mas que contemplou um conjunto de lagoas marginais (4 ambientes distintos, além do canal do rio), já havia sido verificado o fato de as lagoas apresentarem condições limnológicas distintas com relação ao rio/reservatório (Ferrareze et al., 2014). Certamente, isso contribui para que esses habitats marginais suportem uma alta variedade de distintas populações de fauna e flora, por exemplo do fitoplâncton, zooplâncton e da ictiofauna (Ferrareze & Nogueira, 2011a, b; Ferrareze & Nogueira, 2013), bem como de interações tróficas (Ferrareze et al., 2015).

O ambiente Lêntico se destacou dos demais pelos elevados valores de oxigênio dissolvido e de pH. Em relação à primeira variável, isso provavelmente se deve ao fato dessa zona do reservatório ser muito larga e exposta a ação do vento (pista de vento), ocorrendo de forma intensa e frequente trocas com a atmosfera. O maior pH deve estar relacionado ao metabolismo fotossintético do fitoplâncton, que tende a aumentar a basicidade do meio ao longo dos horários iluminados do dia (Esteves, 2011). Nesse local as concentrações de clorofila foram moderadas (2 µg L<sup>-1</sup>) e, diferente das lagoas, não há uma interferência da liberação de substâncias ácidas por macrófitas aquáticas.

Na dimensão vertical (perfis de medidas) verificou-se a ausência de estratificações térmicas nos três ambientes, apenas decréscimos graduais da temperatura. Contudo, destaca-se o rápido decaimento em direção ao fundo das concentrações de oxigênio no ambiente de Lagoa, a despeito da pouca profundidade. Novamente, isso se explica pela decomposição das plantas aquáticas e menor turbulência (estabilidade).

Em termos de qualidade de água, todas as variáveis que permitiram comparações, estiveram em conformidade com os padrões de referência da resolução Conama 357/205, para águas de classe 2, enquadramento atual do rio Paranapanema, em sua maior extensão. As águas de classe 2 podem ser destinadas: a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) a proteção das comunidades aquáticas; c) a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA 274/2000; d) a irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e e) a aquicultura e a atividade de pesca. Isso é mais uma evidência da manutenção da boa qualidade das águas desse grande rio do sudeste brasileiro, conforme analisado recentemente de forma detalhada por Pomari *et al.* (2018).

A comparação entre os habitats selecionados permitiu comprovar a existência de uma importante variabilidade de condições limnológicas, representativas dos ecossistemas aquáticos regionais e que certamente suportam uma alta diversidade de comunidades bióticas e de complexas interações ecológicas.

## REFERÊNCIAS

CONAMA. Available from: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> [Accessed: Abril 25, 2019].

CONAMA. Available from: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res27400.pdf> [Accessed: Abril 25, 2019].

ESTEVEZ, F. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 2011. p. 826.

FERRAREZE, M. and NOGUEIRA, M. G. Importance of lateral lagoons for the zooplankton assemblages (Cladocera and Copepoda) in a large tropical reservoir. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 3, p. 522-536, 2011 a.

FERRAREZE, M. and NOGUEIRA, M. G. Importance of lateral lagoons for the ichthyofauna in a large tropical reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 4, p. 807-820, 2011 b.

FERRAREZE, M.; NOGUEIRA, M. G. Phytoplankton assemblages in lateral lagoons of a large tropical reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 1, p. 163-171, 2013.

FERRAREZE, M.; NOGUEIRA, M. G. and SARTORI, L. P. Limnology of a lateral lagoon system connected to a subtropical reservoir (SE, Brazil). **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 36, p. 197-207. 2014.

FERRAREZE, M.; NOGUEIRA, M. G; CASATTI, L. Differences in ichthyofauna feeding habits among lateral lagoons and the river channel in a large reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 380-390, 2015.

GOLTERMAN, H. L., CLYMO, R. S. and OHSTAD M. A. 1978. **Methods for Physical & Chemical Analysis of Fresh Waters**, (2<sup>nd</sup> ed.). Blackwell Science, Oxford.

NOGUEIRA, M. G. JORCIN, A.; VIANNA, N. C. e BRITTO, Y. C. Reservatórios em cascata e os efeitos na limnologia e organização das comunidades bióticas (fitoplâncton, zooplâncton e zoobentos): Um estudo de caso no rio Paranapanema (SP/PR). In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R. e JORCIN, A. (Org.). **Ecologia de reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata** (2<sup>a</sup> ed.). São Carlos: Editora Rima, 2006. p. 435-459.

NOGUEIRA, M.G.; PERBICHE-NEVES, G.; NALIATO, D.A.O. Limnology of two contrasting hydroelectric reservoirs (Storage and Run-of-River) in southeast Brazil. In: Samadi-Boroujeni, H. (Org.) **Hydropower-Practice and Application**. Croatia: Tech. 2012. p.185-200.

POMARI, J.; KANE, D. D.; NOGUEIRA, M. G. Application of multiple-use indices to assess reservoirs water quality and the use of plankton community data for biomonitoring purposes. **International Journal of Hydrology**, v. 2, n. 2, p. 168-179, Jan. 2018.

REBOUÇAS, Aldo da C. Água doce no mundo e no Brasil. In. REBOUÇAS, Aldo da C.; BRAGA, Benedito e TUNDISI, José Galizia (Org.). **Águas Doces no Brasil**. São Paulo: Editora Escrituras, 2006. p. 1-35.

SAMPAIO, Theodoro F. **Exploração dos rios Itapetininga e Paranapanema**. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional, 1889.

## OLIGOMERIZAÇÃO DO COMPLEXO FERRITINA-LIGANTE POR MEIO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA FERRITINA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

### **Giovanna Tavares Jeronymo**

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP.

### **Ricardo Barros Mariutti**

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP.

### **Thaís Caroline Serafim**

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP.

**RESUMO:** As ferritinas são proteínas capazes de armazenar ferro, tornando este biodisponível para as células, além de sua importância na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. Essas proteínas tem um papel imprescindível em vários aspectos relacionados à bionanotecnologia. Como exemplo disso, elas estão relacionadas à biomineralização, podendo mineralizar uma série de complexos metálicos, além da entrega de drogas no interior da cápside da proteína e do desenvolvimento de vacinas, um papel precursor que pode ser utilizado em aplicações farmacêuticas e terapêuticas. Por conta das inúmeras aplicações da ferritina e pela dificuldade de purificação desta diretamente a partir de culturas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o

objetivo foi expressar e purificar a ferritina em *Escherichia coli* possibilitando a compreensão dos fatores que influenciam a oligomerização/desoligomerização do oligômero da ferritina para aplicação nas inúmeras áreas da bionanotecnologia. Esse procedimento foi realizado por meio da transformação bacteriana utilizando o vetor pET28a recombinante, subsequente expressão da proteína em larga escala e purificação em coluna de afinidade seguida de cromatografia de exclusão molecular. As proteínas purificadas foram utilizadas em ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para testar as condições que influenciam na oligomerização/desoligomerização da ferritina. Em relação aos resultados, as condições testadas (pH, presença de ferro e EDTA) influenciaram o raio hidrodinâmico da proteína e isso pode estar relacionado a indução da auto-montagem/desmontagem do oligômero. Enquanto a presença de ferro induziu a auto-montagem do oligômero, a diminuição do pH e adição de EDTA induziram sua desoligomerização. **PALAVRAS-CHAVE:** ferritina; oligômero; bionanotecnologia.

OLIGOMERIZATION OF THE FERRITIN-LIGAND COMPLEX BY THE EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE FERRITIN OF



**ABSTRACT:** Ferritins are proteins capable of storing iron, making it bioavailable to cells, in addition to its importance in the detoxification of reactive oxygen species. These proteins play an essential role in many aspects related to bionanotechnology. As an example, they are related to biomineralization, which can mineralize a series of metal complexes, as well as the delivery of drugs inside the protein capsid and the development of vaccines, a precursor role that can be used in pharmaceutical and therapeutic applications. Because of the innumerable applications of ferritin and the difficulty in purifying it directly from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the objective was to express and purify the ferritin in *Escherichia coli*, making possible the understanding of the factors that influence the oligomerization/desoligomerization of the ferritin oligomer for the application in the many areas of bionanotechnology. This procedure was performed by bacterial transformation using the recombinant pET28a vector, subsequent large scale protein expression and affinity column purification followed by molecular exclusion chromatography. Purified proteins were used in dynamic light scattering assays (DLS) to test conditions influencing ferritin oligomerization/desoligomerization. Regarding the results, the conditions tested (pH, presence of iron and EDTA) influenced the hydrodynamic radius of the protein and this may be related to the induction of self-assembly / disassembly of the oligomer. While the presence of iron induced self-assembly of the oligomer, the decrease in pH and addition of EDTA induced its desoligomerization.

**KEYWORDS:** ferritin; oligomer; bionanotechnology.

## 1 | INTRODUÇÃO

A ferritina é uma proteína codificada em genomas de uma gama enorme de organismos, desde Archaea até humanos e é expressa na maioria dos tipos celulares. Nas bactérias ela também está presente, sendo que muitas não utilizam apenas o ferro extracelular como fonte de ferro, mas depositam reservas intracelulares dentro das proteínas de armazenamento, sendo a ferritina uma das principais (ANDREWS, 1998). A ferritina arranja-se em um complexo protéico esférico formado por 24 subunidades (cada subunidade formada por um feixe de quatro  $\alpha$ -hélices) dispostas em simetria octaédrica ao redor de uma cavidade central que atua no armazenamento de ferro. Existem canais no revestimento da proteína nos eixos de simetria: 8 canais triplos e 6 canais quádruplos, sendo uma via de acesso importante para  $Fe^{2+}$  na cavidade proteica (BRADLEY et al., 2014) (Figura 1).

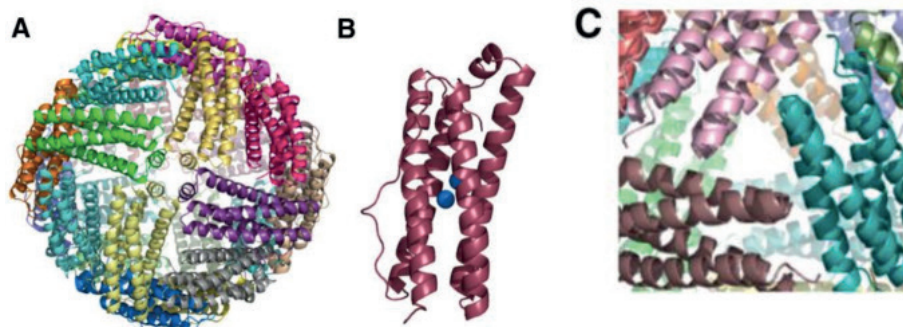


Figura 1. A) Representação esquemática de uma ferritina com 24 subunidades. B) Quatro estruturas de  $\alpha$ -hélices conservadas da subunidade de ferritina, com a quinta hélice curta em C-terminal. C) Visão em close de um dos oito canais tripos do eixo de simetria.

As ferritinas dos vertebrados contêm pelo menos dois tipos de subunidades: cadeias pesada (H) e leve (L). Uma distinção importante entre as duas subunidades é que as cadeias H contêm resíduos que formam um sítio de ferro dinuclear que catalisa a oxidação de  $\text{Fe}^{+2}$  à  $\text{Fe}^{+3}$  (centro catalítico de ferroxidase). O aumento da ferritina rica em subunidades H está relacionado com a utilização de ferro pelo organismo, enquanto o aumento da subunidade L está relacionado ao depósito de ferro, sendo que a ferritina apresenta-se como uma flexível reserva de ferro no organismo (YANG et al., 1999). Entretanto, as ferritinas procarióticas parecem ser homopolímeros que consistem apenas em subunidades do tipo cadeia H, mas estas não são particularmente similares às ferritinas de cadeia H eucarióticas em termos de similaridade geral de sequência (identidade de 20%) (BRADLEY et al., 2014).

Nessas proteínas, a cavidade central atua no armazenamento de ferro, sendo que este é absorvido na forma ferrosa solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ), mas é depositado na forma férrica oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Esse processo de armazenamento de ferro requer um passo de ferroxidação, catalisado pelo centro de ferroxidase localizado na região central das subunidades. Os resíduos neste local são altamente conservados e atuam como ligantes para a ligação de dois íons ferrosos (TOSHA et al., 2010), o primeiro passo no processo de absorção de ferro. O par de íons ferrosos ligado é posteriormente oxidado por  $\text{O}_2$  resultando na formação do ferro férrico e redução de  $\text{O}_2$  à peróxido de hidrogênio (ANDREWS et al., 2003). Os íons férricos migram para o exterior do centro de ferroxidase, transferidos para a cavidade central e ocorre sua mineralização formando pequenos aglomerados de ferro (hidretos de ferro) (BOU-ABDALLAH et al., 2002) (Figura 2). O núcleo de ferro mineralizado atua para fornecer ferro biodisponível a uma variedade de enzimas redox e também atende um papel de desintoxicação.

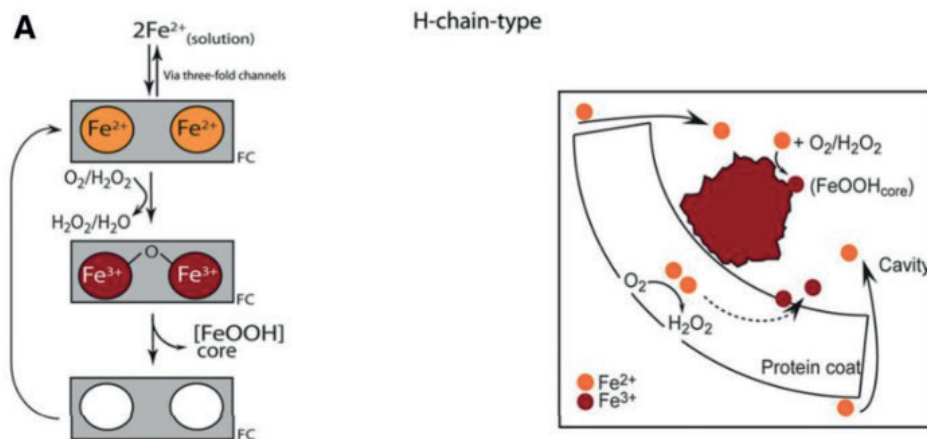


Figura 2. Mecanismo de mineralização das ferritinas do tipo cadeia-H, descrevendo o funcionamento do centro de ferroxidase.

Como as ferritinas são capazes de armazenar uma quantidade significativa de ferro dentro do seu núcleo oco, exibem estabilidade térmica e química notável, são passíveis de reconstituição através de desmontagem e de modificações químicas e biológicas, elas são alvos atraentes para a pesquisa em bionanotecnologia (MARLES-WRIGHT; HE, 2015). Algumas das suas aplicações bionanotecnológicas é a biomineralização. Na prática, a cápside da ferritina pode ser usada para mineralizar uma série de complexos metálicos. Esta exibe a capacidade de aceitar não apenas íons de ferro, mas também uma grande variedade de átomos, tornando-a um molde biocompatível perfeito para a síntese de nanopartículas controladas por tamanho e forma (SANO et al., 2005).

Outra aplicação é a entrega de medicamentos, na qual ocorre o carregamento da cavidade proteica com medicamentos contendo metal por meio da sua montagem e desmontagem em pH variados (MARLES-WRIGHT; HE, 2015). Ao combinar o carregamento da ferritina com fármacos e a modificação da sua superfície com epítopos de peptídeos, a ferritina pode ser direcionada especificamente para tumores de células particulares para a administração eficiente de agentes terapêuticos. Outro ponto importante é o desenvolvimento de vacinas, que ocorre por meio da ligação da ferritina à proteínas virais, por exemplo, proteínas do envelope de vírus patogênicos, sendo que essas proteínas de fusão são usadas no desenvolvimento de anticorpos contra os vírus. Um aspecto funcional dessas vacinas é que a proteína viral pode ser posicionada no interior da ferritina, assim a cápside não irá ser reconhecida como estranha pelo organismo até que comece a se desmontar e o antígeno se torne exposto (CARTER; LI, 2006). Isso significa que é possível criar um efeito antigênico que pode potencialmente produzir uma imunidade maior, pois a exposição aos antígenos continuará por um período de tempo muito mais longo.

## 2 | OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi expressar a ferritina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *E. coli*, realizar sua purificação e avaliar os fatores e condições que influenciam a oligomerização/desoligomerização do oligômero da ferritina, visando compreender o mecanismo de montagem e desmontagem da sua cápside para aplicação nas mais diversas áreas da bionanotecnologia. Para isso foram utilizadas técnicas de biologia molecular e análises biofísicas.

## 3 | JUSTIFICATIVA

Devido à dificuldade de purificação de proteínas bacterianas diretamente a partir de culturas de *C. pseudotuberculosis*, a expressão da ferritina em *E. coli* viabiliza a produção em larga escala desse alvo para estudos de interação e estruturais. Além disso, o conhecimento do mecanismo de oligomerização da ferritina permitirá no futuro, servir como base no desenvolvimento de complexos ferritina-ligante com aplicações na pecuária, medicina e agricultura, podendo ser utilizados para fabricação de nanopartículas metálicas, entrega de medicamentos, desenvolvimento de vacinas e muitas outras utilizações. Portanto, o entendimento sobre as modificações químicas, físicas e biológicas que influenciam o mecanismo de desmontagem e reconstituição da cápside da ferritina é essencial para avanços na área de bionanotecnologia.

## 4 | METODOLOGIA

Os vetores de expressão contendo as sequências nucleotídicas codificadoras da ferritina de *C. pseudotuberculosis* foram sintetizados pela empresa GenScript. O vetor utilizado foi o pET28a recombinante, o qual possui uma sequência codificadora de uma cauda de seis resíduos de histidina fusionada à proteína expressa. Primeiramente, foi realizada a transformação bacteriana, na qual 80 ng de plasmídeos recombinantes foram adicionados a 50 µL de solução contendo linhagens de *E. coli* competentes (BL21 RIL e BL21 T1). Essa mistura permaneceu no gelo durante 30 minutos, e então, foi submetida ao choque de temperatura a 42 °C por 1 minuto seguida de 2 minutos no gelo. Após o choque térmico foram adicionados 450 microlitros de meio de cultura LB (Luria Bertani) líquido pré-aquecido e 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, sendo mantido sob agitação (1 hora a 37°C a 250 rpm).

Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo LB contendo canamicina, para selecionar apenas os microrganismos que sofreram o processo de transformação bacteriana. As colônias resistentes foram inoculadas em tubos individuais contendo 10 mL de meio líquido LB com mesmo antibiótico (pré-inóculo), mantidos sob agitação e aeração constante e então, utilizados para expressão em pequena escala para determinar as melhores condições de expressão (variações

na linhagem celular, temperatura de indução, quantidade de indutor e tempo de expressão). A proteína foi expressa adicionando 10 mL de pré-inóculo em 1L de meio seletivo LB com 10 microlitros de canamicina, o qual foi mantido no shaker até atingir a densidade ótica entre 0,4 e 0,6 para indução da expressão com IPTG. Após aproximadamente 2 horas, a cultura foi induzida com IPTG a 0,3 mM.

Após 5 horas de expressão a cultura foi centrifugada por 15 minutos à 5000 x g à 5°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em tampão de lise celular ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 500 mM, Glicerol 10%, 10mM de imidazol, pH 7.8). A solução foi submetida à sonicação em sonicador (Marconi - MA 103) para lise celular. O lisado celular obtido desse processo foi centrifugado à 15000 x g por 40 minutos, à 5°C. Posteriormente, a purificação foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (Ni-NTA). O sobrenadante do lisado celular obtido após centrifugação foi passado através da coluna de purificação (coluna de gravidade, Bio-Rad) para que as proteínas (His-tagged) fossem adsorvidas ao níquel. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando tampão de lavagem (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500mM NaCl e 10 % glicerol, pH 7.7) com quantidades crescentes de imidazol para remover proteínas contaminantes adsorvidas inespecificamente na resina de níquel. Por fim, a proteína de interesse contendo a His-tagged foi eluída utilizando tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio dibásico, 300 mM NaCl, 400 mM imidazol, pH 7.7).

As proteínas da fração eluída foram concentradas até 500  $\mu\text{L}$  em filtros de centrífuga Amicon® Ultra-15. Posteriormente foram submetidas a um novo processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna Superdex G75 10/300 em Akta purifier com um tampão 10 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl, com 10% de glicerol em um pH 7 com a intenção de aumentar a pureza e melhorar a qualidade da amostra proteica. Posteriormente, foi realizada a remoção da cauda de histidina pela enzima TEV protease, na qual a proteína recombinante e a TEV protease foram incubadas em uma membrana de diálise, a qual foi mantida em um tampão Tris HCl 10 mM NaCl 100 mM (pH=7). Após a incubação, a solução contendo a proteína clivada e a TEV protease foi novamente submetida à cromatografia de afinidade, utilizando resina à base de níquel (repurificação por afinidade).

Após todas as etapas foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com detergente SDS (SDS-PAGE), que possibilita a separação de proteínas de acordo com o tamanho molecular para análise de pureza. Para determinar a presença da proteína com altíssima sensibilidade também foi realizado o Western Blot. Nesta técnica, foi utilizado um anticorpo primário (presente no antissoro monoclonal Antipoli-histidina) que interage especificamente com a cauda de histidina da proteína recombinante. Em seguida, o anticorpo secundário (presente no antissoro anti-IgG), se acopla ao primário, sendo responsável pela sua sinalização. É possível observar a coloração azul-púrpura apenas quando ocorre a reação antígeno/anticorpo, ou seja, na presença da proteína.

Foram realizados ensaio de DLS (espalhamento dinâmico de luz), no qual a solução proteica foi centrifugada por 10 minutos à 16000 x g à 4°C, e as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo para análise no aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Foram testadas diversas condições como presença de EDTA no tampão, alteração do pH e adição de cloreto ferroso (FeCl<sub>2</sub>) visando concluir se esses fatores influenciavam no raio hidrodinâmico (RH) da proteína, e consequentemente na montagem e desmontagem do oligômero da ferritina.

## 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise da intensidade das bandas do gel SDS-PAGE, concluiu-se que o melhor rendimento na expressão da proteína alvo foi utilizando a linhagem BL21-T1 em 1 L de meio LB na presença do indutor IPTG a 0,3 mM em temperatura de 30°C por 5 horas. Durante a primeira etapa de purificação por cromatografia de afinidade, foi visto que a ferritina era liberada durante a lavagem com tampão de eluição. Foi necessário realizar a cromatografia de exclusão molecular, a qual garantiu um maior grau de pureza da amostra pela separação da proteína alvo das contaminantes pelo seu tamanho (Figura 3). Por meio do Western Blot foi possível a detecção da presença da ferritina com um maior grau de sensibilidade pela reação antígeno-anticorpo (Figura 4).

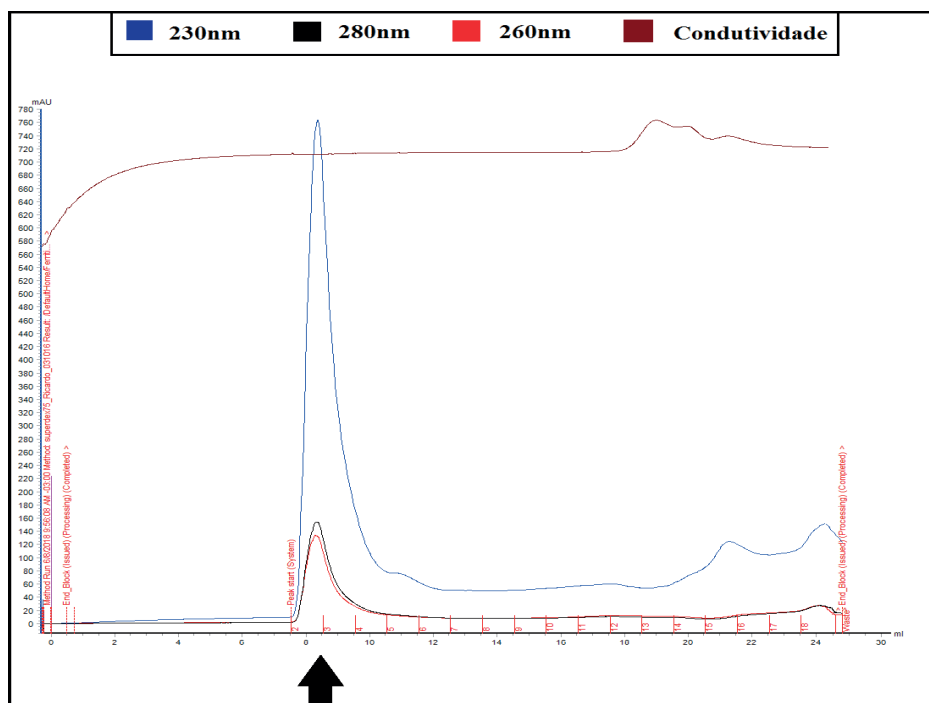


Figura 3. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da ferritina de *C. pseudotuberculosis* concentrada e aplicada em Superdex G75/300 (GE), após etapa de purificação a partir da coluna de níquel.

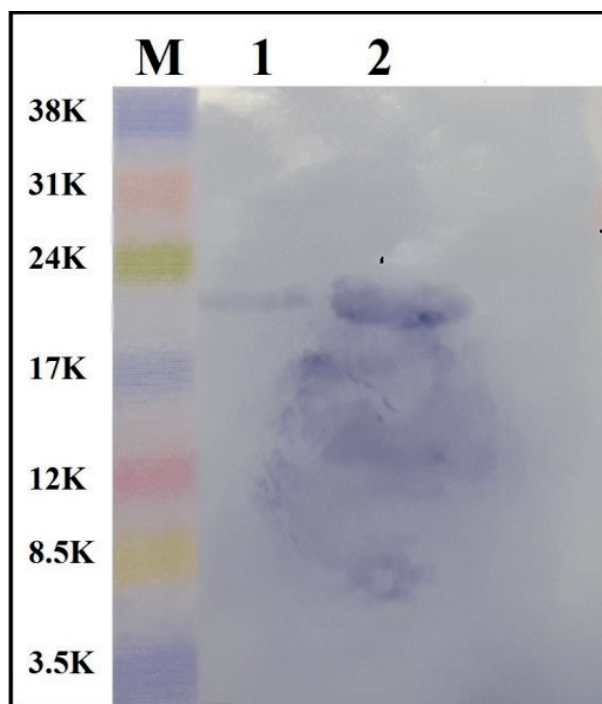


Figura 4. Resultado do *Western blot* evidenciando a reação específica do anticorpo Antipoli-histidina, para detecção da ferritina de *C. pseudotuberculosis*. **(M)** Marcador molecular pré-corado. **(1)** 5  $\mu$ L da ferritina linhagem BL21(DE3)-T1, 0,43mg/mL. **(2)** 15  $\mu$ L da ferritina linhagem BL21(DE3)-T1, 0,43mg/mL.

A clivagem da cauda de histidina ocorreu como o esperado, já que a proteína alvo antes da clivagem apresenta um tamanho em kDa maior que a proteína alvo após a clivagem (Figura 5). A repurificação por afinidade (Ni-NTA) também foi realizada com sucesso, sendo que a TEV protease e as proteínas contaminantes que possuíam muitos aminoácidos histidina ficaram aderidas ao níquel da resina, e a ferritina como não possuía mais a Histag foi eluída da resina com o tampão de lavagem contendo 60 mM de imidazol.

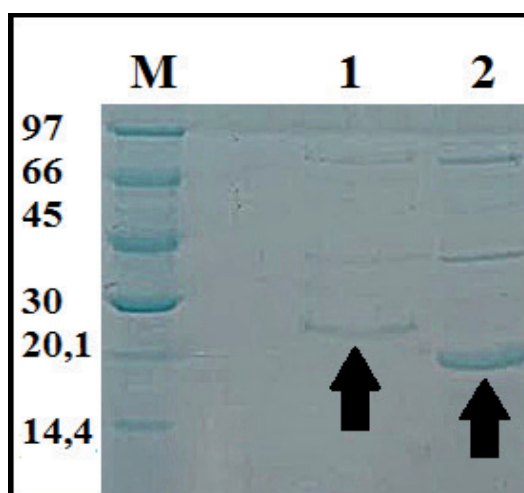


Figura 5. Gel SDS - PAGE 15% contendo a amostra antes e depois da remoção da Histag. **(M)** Marcador molecular em kDa. **(1)** Amostra de ferritina antes da clivagem. **(2)** 15  $\mu$ L da amostra de ferritina incubada com TEV protease. As setas pretas correspondem as bandas para comparação do tamanho em kDa da ferritina não clivada (1) e clivada com a TEV protease (2).

Por meio da utilização do espalhamento dinâmico de luz foram testadas diversas condições como variação de temperatura, concentração proteica, valores de pH, adição de diferentes metais e de compostos quelantes, que pudessem induzir ou reprimir a auto-montagem/desmontagem do oligômero da ferritina. A primeira condição testada foi a adição de EDTA no tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl, sendo que o diâmetro hidrodinâmico da proteína foi reduzido de 70 nm para 10 nm. Posteriormente, foi adicionado 0,5 M de Cloreto ferroso (II) ( $\text{FeCl}_2$ ) à essa solução, sendo que o diâmetro aumentou para 100 nm (Figura 6). Em relação ao EDTA, por ser um agente quelante, ou seja, tem a capacidade de complexar íons metálicos, pode estar sequestrando os íons de ferro da cavidade central induzindo sua desoligomerização, por isso houve redução do seu diâmetro. Na condição com  $\text{FeCl}_2$ , ocorreu aumento do diâmetro pois a ferritina absorve o ferro disponível e o armazena, induzindo a auto-montagem do oligômero. Isso pode ser explicado por conta da ferroxidação que ocorre no interior das ferritinas. Essas proteínas absorvem ferro na forma ferrosa solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ), mas o ferro é depositado na cavidade central na forma férrica oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$ ).

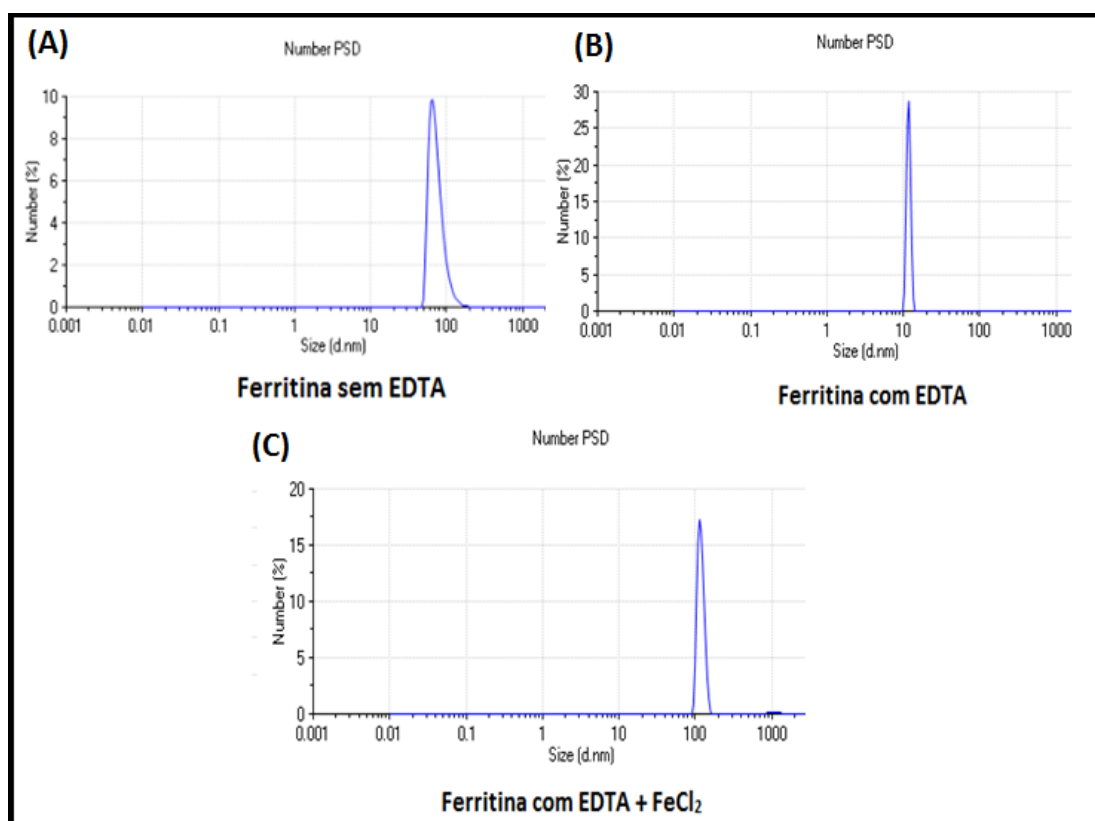


Figura 6. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS demonstrando o efeito do EDTA e  $\text{FeCl}_2$  sobre a ferritina. **(A)** Ferritina em tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl sem EDTA, evidenciando seu Dh próximo a 70 nm. **(B)** Ferritina com 1mM de EDTA, evidenciando o seu Dh próximo de 10 nm. **(C)** Ferritina com 1mM de EDTA e 0,5M de Cloreto de Ferro (II) ( $\text{FeCl}_2$ ), evidenciando seu Dh próximo de 100 nm.

As próximas condições testadas incluíram comparações do Dh da ferritina em diferentes pHs (tampão TRIS x tampão Glicina). Quando a proteína estava em



tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8) apresentou um Dh de 55 nm e quando estava em tampão 5 mM glicina (pH=2,5) o diâmetro diminuiu para 35 nm (Figura 7). Quando houve adição de 0,5 M de cloreto ferroso ao tampão 5 mM glicina (pH=2,5) o diâmetro aumentou de 35 para 55 nm (Figura 8), sendo que o mesmo ocorreu com o tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8), sendo que o diâmetro aumentou de 55 para 100 nm após a adição do ferro (Figura 9).

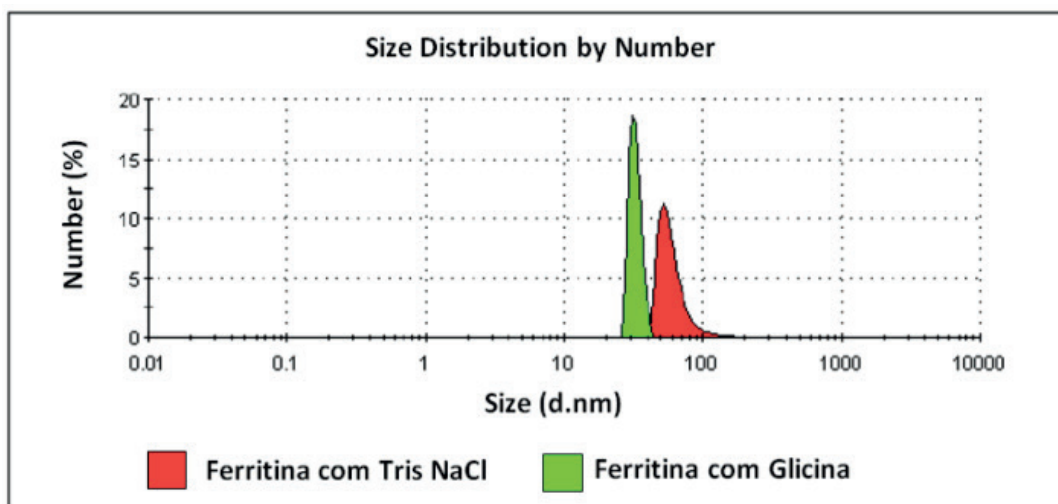


Figura 7. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS, comparando a diferença do Dh da ferritina em 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8) e em 5 mM de tampão glicina (pH=2,5).

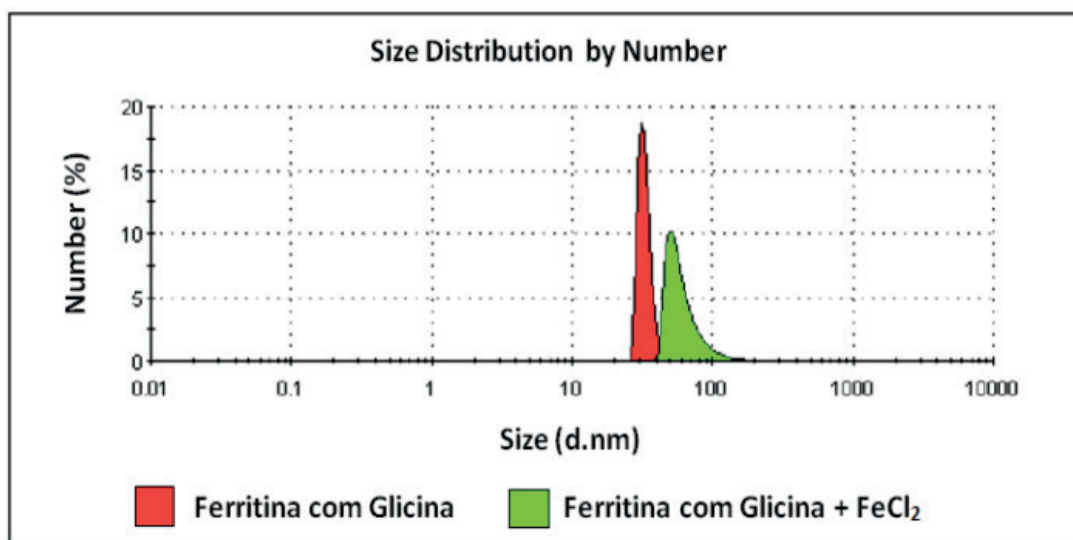


Figura 8. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS, comparando a diferença do Dh da ferritina em 5 mM de tampão glicina (pH=2,5) e com 0,5 M de FeCl<sub>2</sub>.

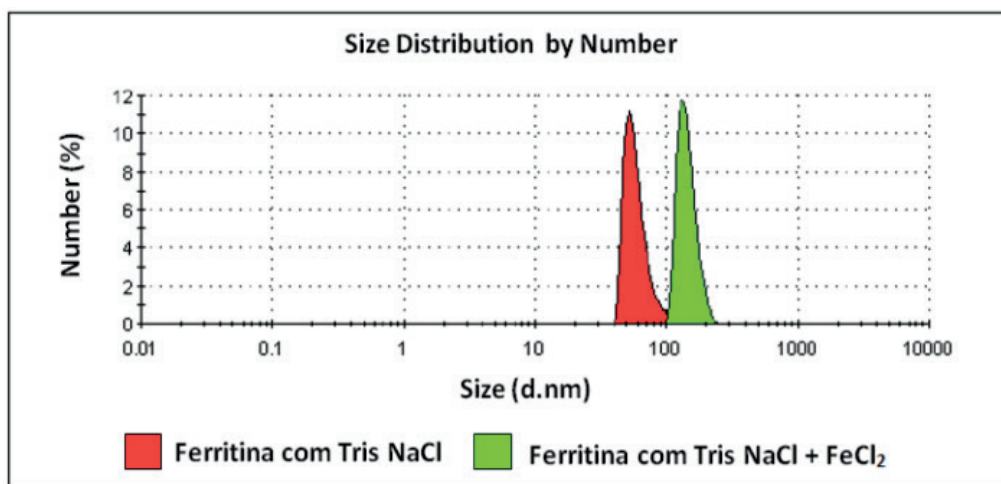


Figura 9. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS, comparando a diferença do Dh da ferritina em 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8) e com 0,5 M de FeCl<sub>2</sub>.

Levando em conta esses resultados, a conclusão é que ao diminuir o valor do pH de 8 para 2,5 a proteína se torna instável, ocorrendo possivelmente sua desnaturação e a desmontagem do oligômero, indicado pela diminuição do valor do Dh em todas as condições em que houve a utilização do tampão glicina com pH 2,5. Mesmo sabendo que a cápside da ferritina composta por 24 subunidades exibe estabilidade térmica e química notável, o pH usado foi tão baixo que a estabilidade foi perdida. Em um trabalho realizado por Kim et al. (2011), foi analisada a estabilidade da apoferritina mediante mudanças no valor do pH, sendo que abaixo do pH 3,4 a apoferritina tornou-se instável e passou por desmontagens graduais através de vários intermediários estruturais. Foi comprovado também que mesmo em um pH muito baixo (2,5), a presença de ferro continua atuando na auto-montagem das subunidades da cápside da ferritina. Na condição em que o pH foi diminuído pelo tampão glicina ocorreu primeiramente a desmontagem do oligômero, que depois foi novamente montado por conta da absorção do FeCl<sub>2</sub>.

## 6 | CONCLUSÃO

Os protocolos testados permitem expressar e purificar a ferritina de *C. pseudotuberculosis*. Os ensaios de espalhamento dinâmico de luz contribuíram para indicar as condições (pH, presença de ferro e EDTA) que influenciam no raio hidrodinâmico da amostra proteica e isso pode estar relacionado ao mecanismo de desmontagem e reconstituição do oligômero da ferritina, sendo imprescindível para avanços na área de bionanotecnologia como veículo de entrega de drogas, fabricação de nanopartículas metálicas, entre outros.

## REFERÊNCIAS

ANDREWS, S.C. **Iron storage in bacteria.** *Adv. Microb. Phys.*, v. 40, p. 281–351, 1998.

ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. **Bacterial iron homeostasis.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 215–237, 2003.

BOU-ABDALLAH, F. et al. **Mu-1,2-Peroxo-bridged di-iron(III) dimer formation in human H-chain ferritin.** *Biochem J*, v. 364, p.57–63, 2002.

BRADLEY, J.M.; MOORE, G.R.; LE BRUN, N.E. **Mechanisms of iron mineralization in ferritins: one size does not fit all.** *J Biol Inorg Chem.*, v. 19, p. 775-785, 2014.

CARTER, D. C.; LI, C.Q. **Ferritin fusion proteins for use in vaccines and other applications.** New Century Pharmaceuticals Inc., US Pat. 7,097,841, p. 29, 2006.

KIM, M. et al. **pH-Dependent Structures of Ferritin and Apoferritin in Solution: Disassembly and Reassembly.** *Biomacromolecules*, v. 12, p. 1629–1640, 2011.

MARLES-WRIGHT, J.; HE, D. D. **Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology.** *New Biotechnology.*, v. 32, i. 6, p. 651-657, 2015.

SANO, K. I. et al. **Endowing a ferritin-like cage protein with high affinity and selectivity for certain inorganic materials.** *Small*, v. 1, n. 8-9, p. 826-832, 2005.

TOSHA, T. et al. **Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold pores to catalytic sites.** *J Am Chem Soc.*, v. 132, p. 14562–14569, 2010.

YANG, F. et al. **Resistance of hypotransferrinemic mice to hyperoxia-induced lung injury.** *Am J Physiol*, v. 277, p. 1214–1223, 1999.

## TRANSLOCAÇÃO BALANCEADA HERDADA T(8;19) (Q12;Q13)MAT CONCOMITANTE À DELEÇÃO DE 15Q11.2 EM UM PACIENTE COM SÍNDROME DE ANGELMAN (SA) - A CITOGENÉTICA CLÁSSICA NÃO EVANESCE

### **Elenice Ferreira Bastos**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Carlos Roberto da Fonseca**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Patrícia Santana Correia**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Cristiane Queila Ebraim Barros**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Ingrid Bendas Feres Lima**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Anna Luiza Vaz Serrão**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Lúcia de Fátima Marques de Moraes**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

### **Juan Clinton Llerena Jr**

Departamento de Citogenética Médica /IFF/  
FIOCRUZ

linguagem, hipotonia e epilepsia. A maioria é causada pela ausência da contribuição materna ou erros de impressão genômica em 15q11-q13. Translocações recíprocas são anormalidades cromossômicas comuns, com incidência de 1/500 a 1/625 nativos. Apenas cerca de 6% estão relacionadas ao fenótipo anormal, porém, devem ser sempre consideradas em termos de aconselhamento genético. Com o desenvolvimento de diversas metodologias moleculares, a citogenética clássica vem sendo cada vez menos utilizada no diagnóstico, direcionando a busca especificamente para a síndrome investigada. Neste relato apresentamos um caso de SA, diagnosticada por FISH, concomitante a uma alteração cromossômica distinta. Paciente masculino, atualmente com 06 anos, nascido a termo, filho único de casal não consanguíneo, com história de uma perda gestacional de 1º trimestre, mãe 37 anos e pai 36 anos, ao nascimento. Ao exame clínico apresentava pele e cabelos claros, dentes espaçados, estereotípias em mãos, agitação, risos imotivados, espasticidade nos membros inferiores, ausência de fala e história de epilepsia. A suspeita foi de AS, sendo solicitados cariótipo e FISH. A técnica FISH identificou deleção em 15q11.2, confirmando o diagnóstico molecular por metilação. Adicionalmente, a análise por bandeamento GTG revelou translocação equilibrada entre os

**RESUMO:** A Síndrome de Angelman (SA) é um transtorno neurocognitivo caracterizado por retardo motor e intelectual grave, distúrbio de movimento ou equilíbrio, comportamentos anormais típicos, limitações graves na fala e na

cromossomas 8 e 19 (8q12 e 19q13) de origem materna. Cariótipo: 46,XY,t(8; 19)(q12;q13)mat. ish del (15)(q11.2q11.2) (SNRPN/GABRB3x1). A análise de metilação associada ao FISH foi fundamental para confirmar o diagnóstico. Entretanto, neste caso, a presença de alteração cromossômica familiar balanceada não relacionada ao diagnóstico, fortalece a idéia de que a citogenética clássica (bandeamento GTG) deve ser ainda aplicada para todos os casos de malformações congênitas e/ou retardo mental, mesmo naqueles suspeitos de síndromes bem caracterizadas. Não podemos deixar de considerar que, mesmo rara, a ocorrência de uma alteração balanceada familiar associada à microdeleções, modifica consideravelmente, os critérios de aconselhamento genético.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síndrome de Angelman; Translocação balanceada; Aconselhamento genético; FISH

## INTRODUÇÃO

A utilização de diferentes métodos de investigação molecular tem sido amplamente inserida na prática clínica, sendo em muitos casos, recomendados como padrão ouro para a definição diagnóstica em diferentes tipos de doenças genéticas, em especial aquelas relacionadas a microdeleções (Smith, 2017).

A Síndrome de Angelman (SA) é um transtorno neurocognitivo, resultante de anomalias no cromossomo 15 de origem materna, mais especificamente em sua região 15q11-q13, onde se localiza o gene UBE3A, cuja ausência da expressão é o fator determinante da síndrome. Esta perda de função do gene pode ser ocasionada por deleção, erros de impressão genômica, dissomia uniparental paterna ou mutações pontuais no gene UBE3A (Williams e cols, 2010). É uma síndrome rara, com incidência estimada em 1 a cada 10.000 a 20.000 indivíduos. (MALUF & RIEGEL, 2011).

O diagnóstico da SA pode ser confirmado em 80% dos casos pelos estudos genéticos (FRYBURG e cols., 1991; Liu e cols, 2019). Os exames genéticos para determinação da SA envolvem as técnicas: FISH, detectando perda da região 15q11-q13, análise do polimorfismo do DNA, capaz de detectar pequenas deleções do cromossomo materno ou dissomia uniparental paterna; análise do padrão de metilação da região 15q11-q13 e análise de mutações do gene UBE3A.

A análise citogenética por bandeamento GTG, mesmo em alta resolução, tem sido cada vez menos utilizada, sendo a análise molecular para averiguar o padrão de metilação para região 15q11-q13 considerada como padrão ouro para o diagnóstico (Ferreira e cols, 2019). Este trabalho relata um caso de síndrome de Angelman com deleção da região 15q12-q13 identificada por FISH concomitante a uma translocação balanceada entre os cromossomos 8 e 19, e evidencia que a análise citogenética por bandeamento GTG permanece insubstituível, mesmo em casos com quadro clínico característico. A importância fundamental da detecção de alterações cromossômicas

estruturais, muitas vezes não relacionadas ao diagnóstico clínico, está no fato de fornecer informações importantes para um correto aconselhamento genético familiar.

## **METODOLOGIA**

### **Relato de Caso**

Paciente do sexo masculino, nascido a termo, começou a apresentar sinais característicos da síndrome aos sete meses de vida, com convulsões e hipotonia. Ao exame físico apresentava pele e cabelos claros, dentes espaçados, estereotípias em mãos, agitação, risos imotivados e espasticidade nos membros inferiores. Era fruto da segunda gestação de casal não consanguíneo, mãe com 37 e pai com 36 anos ao nascimento, com relato de que a primeira gestação terminou em aborto de 1º trimestre.

O cariótipo foi realizado a partir de amostra de sangue periférico, utilizando técnica padrão por Moorehead e colaboradores (1960), bandeamento GTG segundo SEABRIGHT, 1971, avaliando-se um número mínimo de 20 metáfases com um nível de resolução de 450 bandas e 850 bandas por conjunto haplóide e classificação segundo ISCN,2016. A técnica FISH foi realizada segundo protocolo padrão utilizando a sonda LPU05 (SNRPN/GABRB3).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A etiologia da SA é variada, podendo estar relacionada a deleções relativamente grandes na região 15q11.2-11.3 até alterações no padrão de metilação desta região, sendo necessária a aplicação de diferentes metodologias para determinação da causa genética. Atualmente, a primeira técnica recomendada tem sido a análise do padrão de metilação, que na maioria das vezes, define diagnóstico sem evidenciar a origem deste padrão anormal. Assim, torna-se necessária a utilização da técnica FISH para a investigação de microdeleções que justifiquem o padrão de metilação anormal.

Neste caso, a técnica de hibridização in situ por fluorescência, identificou a microdeleção da região 15q11.2 em todas as metáfases e núcleos avaliados (Figura 1), confirmando o diagnóstico molecular de SA por deleção da região 15q11.2.

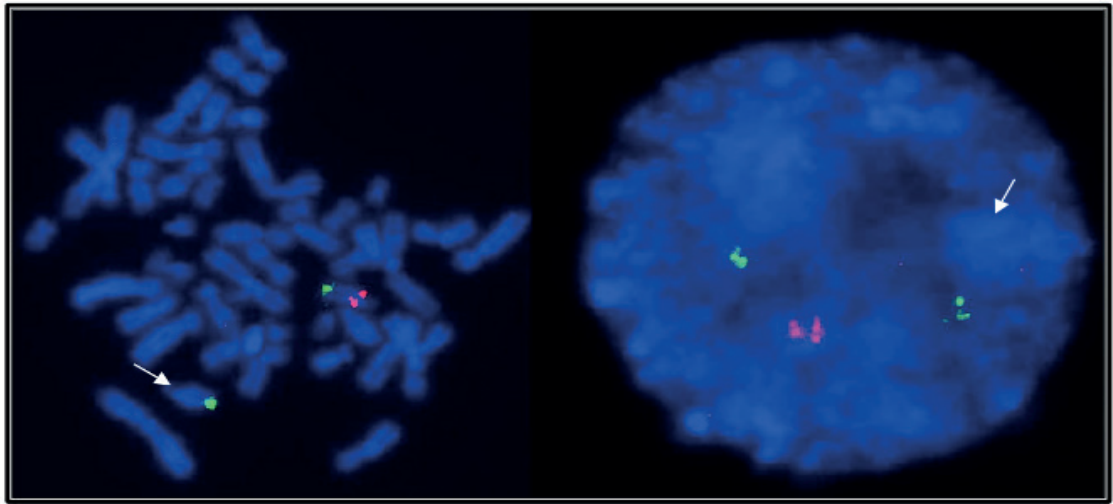


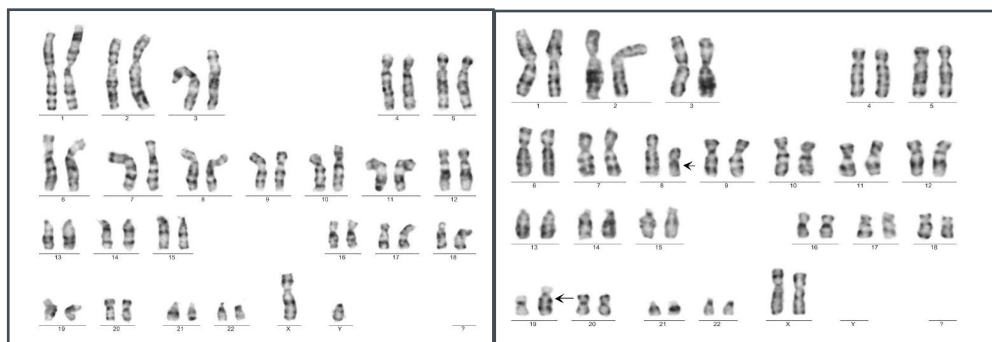
Figura 1 – Técnica FISH na qual podemos observar a ausência do sinal vermelho, correspondente à região 15q11.2-13 e um dos cromossomos homólogos tanto na metáfase (à esquerda,) quanto nos núcleos avaliados (à direita), confirmando a microdeleção.

A técnica de bandeamento GTG, para nossa surpresa, evidenciou a ocorrência de uma alteração extra, uma translocação aparentemente balanceada entre um dos cromossomos do par 8 e um dos cromossomos do par 19 (Figura 2).



Figura 2 – Bandeamento GTG identificando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 8 e 19. Cariótipo: 46, XY, t (8;19) (q12;q13).

A partir do conhecimento atual sobre a etiologia da SA e tendo observado que o paciente não apresentava características clínicas diferentes das conhecidas na SA, consideramos a alteração estrutural como possivelmente balanceada, sem efeito fenotípico para ao paciente. A ocorrência de uma alteração cromossômica estrutural implica na investigação do cariótipo da família. Assim, realizamos o estudo cromossômico dos pais que mostrou cariótipo paterno normal (Figura 3a). e cariótipo materno mostrando a mesma translocação do paciente (Figura 3b).



Figuras: 3a – Cariótipo paterno = 46, XY 3b – Cariótipo materno = 46, XX, t(8;19)(q1.2;q1.3).

Com objetivo de investigar a presença de rearranjo na região 15q11.2 também na mãe, realizamos a técnica FISH que mostrou a região 15q11.2 íntegra, em ambos os cromossomos 15. Este resultado era esperado uma vez que a mãe não possui nenhuma característica clínica da SA. Assim, o cariótipo do paciente ficou definido como: 46, XY, t(8; 19) (q12;q13)mat. ish del (15)(q11.2q11.2) (GABRB3x1) “de novo”.

O fato de encontrarmos uma anomalia cromossômica balanceada na família muda os critérios de aconselhamento genético. Esta alteração acarreta o aumento do risco de recorrência de anormalidades cromossômicas envolvendo os cromossomos 8 e 19, o que pode originar embriões malformados e/ou ocorrências de perdas gestacionais. Consideramos então, a importância, exemplificada neste caso, da realização do cariótipo por bandeamento GTG (citogenética clássica) em todos os casos com indicação clínica para malformações congênitas e/ou retardo mental, mesmo naqueles com definição clínica conhecida e métodos moleculares estabelecidos, uma vez que a maioria dos métodos moleculares não detectam anomalias estruturais balanceadas.

## REFERÊNCIAS

Chang Liu, Xiangzhong Zhang, Jicheng Wang†, Yan Zhang, Anshi Wang, Jian Lu, Yanlin Huang, Shu Liu, Jing Wu, Li Du, Jie Yang, Hongke Ding, Ling Liu, Xin Zhao and Aihua Yin. **Genetic testing for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome in the clinical practice of Guangdong Province, China.** *Molecular Cytogenetics*:12:7; 2019

FERREIRA, I. R.; CUNHA, W. D. S.; GOMES, L. H. F.; CINTRA, H. A.; CABRAL, L. L.; BASTOS, E. F.; LLERENA JR, J. C.; VASCONCELOS, Z. F. M.; GUIDA, L. C. **A rapid and accurate Methylation-Sensitive High-Resolution Melting Analysis assay for the diagnostic of Prader Willi and Angelman patients.** *MOLECULAR GENETICS & GENOMIC MEDICINE*, 2019 (“in press”).

FRYBURG, Julie Shapiro, et al. **Diagnosis of Angelman syndrome in infants.** 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajmg.1320380114>> Acesso em: abril de 2019

MALUF, Sharbel Weidner. ; RIEGEL, Mariluce. - **Citogenética Humana.** 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011;

MOORHEAD, P.S. et al. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.** *Experimental Cell Research*, vol.20, 1960



SEABRIGTH M. **A Rapid banding technique for human chromosomes.**,2:971-972, Lancet: 1971;

SHAFFER, L.G. et al. **ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Basel:Karger, 2013;

SMITH A, Hung D. **The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome.** Transl Pediatr, 6(1):46–56. doi: 10.21037/tp.2016.07.04, 2017

Williams CA, Driscoll DJ, Dagi Al. **Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome.** Genet Med. 2010;12(7):385–95.

## SOBRE OS ORGANIZADORES

**JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR** é doutor em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Mestre em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Graduado em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). É professor Adjunto I da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), lotado no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Orientador nos programas de Pós-Graduação *stricto sensu* em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida (PPGSAQ-UFOPA); Sociedade, Natureza e Desenvolvimento (PPGSND-UFOPA); Biodiversidade (PPGBEES-UFOPA) e Ecologia (PPGECO-UFPA/EMBRAPA). Membro de corpo editorial dos periódicos Enciclopédia Biosfera e Vivências. Tem vasta experiência em ecologia e conservação de ecossistemas aquáticos continentais, integridade ambiental, ecologia geral, avaliação de impactos ambientais (ênfase em insetos aquáticos). Áreas de interesse: ecologia, conservação ambiental, agricultura, pecuária, desmatamento, avaliação de impacto ambiental, insetos aquáticos, bioindicadores, ecossistemas aquáticos continentais, padrões de distribuição.

**LENIZE BATISTA CALVÃO** é pós-doutoranda na Universidade Federal do Pará (UFPA). Doutora em Zoologia (Conservação e Ecologia) pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Mestra em Ecologia e Conservação (Ecologia de Sistemas e Comunidades de Áreas Úmidas) pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT). Graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena) pela Faculdade Araguaia (FARA). Possui experiência com avaliação de impactos antropogênicos em sistemas hídricos do Cerrado mato-grossense, utilizando a ordem Odonata (Insecta) como grupo biológico resposta. Atualmente desenvolve estudos avaliando a integridade de sistemas hídricos de pequeno porte na região amazônica, também utilizando a ordem Odonata como grupo resposta, com o intuito de buscar diretrizes eficazes para a conservação dos ambientes aquáticos.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Aconselhamento genético 94

Adolescentes 12

Alimento 12

Anacardium occidentale 7, 59, 60, 61, 66, 67

Atividade antioxidante 59, 65

### B

Botânica 1, 3, 10

### C

Clorofila 73, 77

Conteúdo fenólico 59

Crianças 12, 19

Crispr/Cas9 45, 46

### D

Dieta 12

### E

Espermatogênese 45

Estratégias de ensino 1

### F

Ferritina 89

Fragilidade osmótica 27

### L

Lagoa marginal 78

### M

Myracrodruon urundeuva 7, 59, 60, 61, 66, 67

### N

Nutrição 11, 14, 20

## **P**

Piptadenia satipulaceae 23

## **S**

Síndrome de Angelman 7, 93, 94

Síndrome de Down 5, 11, 12, 13, 19, 21

## **T**

Toxicidade 23, 29

Translocação balanceada 7, 93, 94

Trauma cranioencefálico 36, 44

## **Z**

Zebrafish 45, 46, 48, 49, 51, 57, 58

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-540-2



9 788572 475402