

**IV SEMINÁRIO
DE CIÊNCIA
EXPERIMENTAL
DA INSTALAÇÃO
DE CIÊNCIA
ANIMAL (ICA)
DO UNIFESO**



ANAIS

IV SEMINÁRIO DE CIÊNCIA
EXPERIMENTAL DA INSTALAÇÃO
DE CIÊNCIA ANIMAL DO UNIFESO

TERESÓPOLIS – RJ
2024

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL SERRA DOS ÓRGÃOS – FESO

Antônio Luiz da Silva Laginestra
Presidente

Jorge Farah
Vice-Presidente

Luiz Fernando da Silva
Secretário

Carlos Alberto Oliveira Ramos da Rocha
José Luiz da Rosa Ponte
Paulo Cezar Wiertz Cordeiro
Wilson José Fernando Vianna Pedrosa
Vogais

Luis Eduardo Possidente Tostes
Direção Geral

Michele Mendes Hiath Silva
Direção de Planejamento

Solange Soares Diaz Horta
Direção Administrativa

Fillipe Ponciano Ferreira
Direção Jurídica

CENTRO UNIVERSITÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS – UNIFESO

Verônica Santos Albuquerque
Reitora

Roberta Montello Amaral
Direção de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Mariana Beatriz Arcuri
Direção Acadêmica de Ciências da Saúde

Vivian Telles Paim
Direção Acadêmica de Ciências e Humanas e Tecnológicas

Marcelo Siqueira Maia Vinagre Mocarzel
Direção de Educação a Distância

HOSPITAL DAS CLÍNICAS COSTANTINO OTTAVIANO – HCTCO

Rosane Rodrigues Costa
Direção Geral

CENTRO EDUCACIONAL SERRA DOS ÓRGÃOS – CESO

Roberta Franco de Moura Monteiro
Direção

CENTRO CULTURAL FESO PROARTE – CCFP

Edenise da Silva Antas
Direção

Copyright© 2024
Direitos adquiridos para esta edição pela Editora UNIFESO

EDITORA UNIFESO

Comitê Executivo

Roberta Montello Amaral (Presidente)
Jucimar André Secchin (Coordenador de Pesquisa)

Conselho Editorial e Deliberativo

Roberta Montello Amaral
Mariana Beatriz Arcuri
Verônica dos Santos Albuquerque
Vivian Telles Paim

Assistente Editorial

Matheus Moreira Nogueira

Formatação

Matheus Moreira Nogueira

Capa

Gerência de Comunicação

C389 Centro Universitário Serra dos Órgãos.
Anais [do] IV Seminário de Ciência Experimental da Instalação de Ciência
Animal do Unifeso / Centro Universitário Serra dos Órgãos. -- Teresópolis:
UNIFESO, 2024.
92 f. : il. color.

ISBN: 978-65-87357-77-5

1. Comunicação e Divulgação Científica. 2. Pesquisa Experimental. 3. Ciência
dos Animais de Laboratório. 4. Biotério. 5. Unifeso. 6. Anais. I. Título.

CDD 616.027

EDITORA UNIFESO

Avenida Alberto Torres, n° 111

Alto - Teresópolis - RJ - CEP: 25.964-004

Telefone: (21) 2641-7184

E-mail: editora@unifeso.edu.br

Endereço Eletrônico: <http://www.unifeso.edu.br/editora/index.php>

IV SEMINÁRIO DE CIÊNCIA EXPERIMENTAL DA INSTALAÇÃO DE CIÊNCIA ANIMAL DO UNIFESO

COMISSÃO ORGANIZADORA

Marcel Vasconcellos
Carlos Alfredo Franco Cardoso
Valéria Cristina Lopes Marques

COMISSÃO CIENTÍFICA

Marcel Vasconcellos
Carlos Alfredo Franco Cardoso
Valéria Cristina Lopes Marques
Maria Eduarda Monteiro da Silva
Alberto Torres Angonese
Sírnia da Fonseca Jorge
Carina Teixeira Ribeiro
Sandro Pinheiro da Costa
Geórgia Rosa Lobato
Leandro Vairo
Leandro Teixeira de Oliveira
Hugo Macedo Ramos
Joelma de Rezende Fernandes

SUMÁRIO

A BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL ASSOCIADA COM A ENDOSCOPIA CONVENCIONAL NA DETECÇÃO DO TUMOR ESOFÁGICO EM RATOS. ESTUDO MULTICÊNTRICO..... 7

Marcel Vasconcellos, Raphaela Valente de Almeida Ito, Pedro Filipe Campos Rampini, Ricardo Maia Cruz Brazuna, Maria Paula Pinheiro Silva, Júlia Gonçalves de Marins, Graziela Cypriano Sereno Diniz, Barbarah Fernandes Wailante, João Carlos Machado

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA CIRÚRGICA PARA PESQUISA E ENSINO COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO..... 22

Pedro Augusto da Costa, Marcel Vasconcellos

AVALIAÇÃO SANITÁRIA DA INSTALAÇÃO DE CIÊNCIA ANIMAL: UMA CONTRIBUIÇÃO PARA A MELHORIA DA QUALIDADE DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO PRODUZIDOS NO UNIFESO..... 33

Marcel Vasconcellos, Ana Beatriz Rocha Câmara, Maria Eduarda Rodrigues Apolinário, Gustavo Kimus Pimentel Nogueira, Sthefany Gravino Pazinato, Michely do Carmo Salomão, Laura de Almeida Ramos, Júlyo Henrique Alves Azevedo, Isabela Marques de Oliveira

EFEITO DA SUPRESSÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES MASCULINOS DE RATOS WISTAR – RESULTADOS PRELIMINARES..... 42

Carina Teixeira Ribeiro, Maria Eduarda Monteiro Silva, Maria Julia Desouzart de Aquino Viana, Bruna Silveira de Oliveira, Juliana Jesus de Monteiro Alves

UTILIZAÇÃO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS) PROCESSADA EM GLUTARALDEÍDO 0,5% OU CLOREXIDINA 2% EM HERNIOPLASTIA ABDOMINAL DE *RATTUS NOVERGICUS*..... 51

Síria da Fonseca Jorge, Pedro Henrique Perrotti dos Santos, Luiza Lobo Caitano, Maria Júlia Ribeiro de Oliveira, Juliana de Jesus Monteiro Alves, Júlia de Oliveira Araújo, Carolina Seabra da Costa, Marcelo Abidu Figueiredo

O MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO PÓS-NATAL DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO E SUA SIMILARIDADE COM A DOENÇA HUMANA..... 64

Lívia Eller Heckert, Marcel Vasconcellos

ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE FILHOTES DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO MATERNA: UM ESTUDO TRANSGERACIONAL..... 74

Geórgia Rosa Lobato, Suzana Maria Bernardino Araújo, Maria Eduarda Cordeiro da Cunha, Bruna Maia Pinheiro, Aline Pacheco Moura da Silva, Valéria Cristina Lopes Marques, Marcel Vasconcellos

FERRAMENTA DE VISÃO COMPUTACIONAL PARA SUPORTE AO TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN FIELD TEST)..... 85

Alberto Torres Angonese, João Pedro Moreira Ferreira, Marcel Vasconcellos, Rafael Soares Areal Costa, Valéria Cristina Lopes Marques, Arthur da Conceição Cunha, Gustavo Mattos Rodrigues, Marco Antônio Araujo de Almeida, Ana Beatriz Rocha Câmara, Pedro Augusto da Costa, Tayna Mendes Maurat

A BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL ASSOCIADA COM A ENDOSCOPIA CONVENCIONAL NA DETECÇÃO DO TUMOR ESOFÁGICO EM RATOS. ESTUDO MULTICÊNTRICO

Marcel Vasconcellos¹, Raphaela Valente de Almeida Ito², Pedro Filipe Campos Rampini², Ricardo Maia Cruz Brazuna², Maria Paula Pinheiro Silva², Júlia Gonçalves de Marins², Graziela Cypriano Sereno Diniz², Barbarah Fernandes Wailante², João Carlos Machado³

1 - Docente do Curso de Graduação em Medicina do UNIFESO; 2 - Discente do Curso de Graduação em Medicina do UNIFESO; 3 - Docente Titular do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da COPPE-UFRJ.

Agência de Fomento: FAPERJ SEI-RJ 260003/019572/2002.

RESUMO

Introdução: Segundo o Instituto Nacional de Câncer, a taxa de sobrevivência global para o câncer esofágico em cinco anos é de apenas 19,9%, e na maioria dos pacientes a doença é assintomática em seus estágios iniciais. Para um tratamento eficaz, torna-se crucial o diagnóstico precoce. A endoscopia convencional, considerada padrão-ouro, apresenta falhas na detecção precoce do câncer esofágico, haja vista a distribuição esparsa das lesões neoplásicas e suas discretas alterações macroscópicas. Apesar dos avanços alcançados com as técnicas diagnósticas do câncer de esôfago, há espaço para o aprimoramento e desenvolvimento de tecnologias/procedimentos e, quanto a isso, os modelos animais são importantes na realização de testes iniciais. **Objetivos:** Detectar tumor esofágico em ratos (*Rattus norvegicus*) por imagens de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe), associada com a endoscopia convencional. **Métodos:** Pretende-se abordar dois modelos de carcinogênese esofágica. O primeiro baseia-se na indução cirúrgica da Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), a qual participa dos complexos eventos fisiopatológicos do câncer de esôfago, e um segundo, na infiltração de uma suspensão contendo células da linhagem tumoral LLC-WRC 256, na camada submucosa do esôfago abdominal. Os achados (presença e tamanhos de tumores, parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos) serão analisados com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste t (Welch) com a correção de Bonferroni, considerando-se um intervalo de confiança de 95% e grau de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados preliminares:** O modelo experimental da DRGE foi desenvolvido com sucesso. Durante o período de 30 dias, verificou-se dilatação gástrica provocada pela vagotomia, além de sinais clínicos de regurgitação. As amostras histológicas foram submetidas ao exame imuno-histoquímico, para a imunexpressão dos biomarcadores p53, E-caderina, e EGFR. No que tange à formação dos discentes, o estudo foi proveitoso, haja vista o desenvolvimento cognitivo e motor obtido durante as cirurgias e os debates suscitados acerca da doença humana.

Palavras-chave: Neoplasias esofágicas; Ultrassom; Diagnóstico por imagem; Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima para cada ano do triênio 2023-2025, o surgimento de 10.990 novos casos de câncer esofágico. Segundo o INCA, a taxa de sobrevida global, em cinco anos, é de apenas 19,9% e na maioria dos pacientes a doença é assintomática em seus estágios iniciais. Portanto, para um tratamento eficaz torna-se crucial o diagnóstico precoce, uma vez que a sobrevida do paciente se relaciona ao grau de invasão tumoral.

Em 96% dos casos diagnosticados, o tipo histológico prevalente é o carcinoma escamocelular, o qual se encontra entre os tipos mais agressivos de câncer e de pior prognóstico, seguido do adenocarcinoma esofágico, cuja incidência aumentou a partir da última década.¹

Embora a endoscopia convencional seja considerada padrão-ouro, ela apresenta falhas na detecção precoce do câncer esofágico, haja vista a distribuição esparsa das lesões neoplásicas e suas discretas alterações macroscópicas². Desta forma, considerando-se que fatores clínicos e endoscópicos não apresentam sensibilidade e especificidade necessárias à estratificação de risco para o câncer esofágico, novos sistemas de imagem passaram a ser investigados, a exemplo da endoscopia com magnificação, cromoendoscopia digital (sistemas FICE®, iSCAN®, Narrow Band Image®), e endomicroscopia confocal a laser³.

Com relação ao emprego da ultrassonografia, Murata *et al.*⁴, aduziram que embora a ultrassonografia endoscópica (UE) de alta frequência pudesse apresentar limitações quanto à precisão em detectar cânceres com invasão da camada submucosa, sua acurácia se mostrou satisfatória em determinar a profundidade da invasão neoplásica. Desta forma, os pesquisadores propugnaram a combinação de diagnósticos endoscópicos e ultrassonográficos no estadiamento do câncer esofágico⁴. Em 2012, Yoshinaga *et al.*⁵ relataram a elevada acurácia da UE, em 20 MHz, na determinação da profundidade de invasão maligna no câncer precoce de esôfago.

Em 2006, Buttar *et al.*⁶, utilizaram a ultrassonografia endoluminal para identificar a presença de tumor no esôfago de ratos submetidos a esofagojejunostomia. No entanto, o estudo apresentou limitações por não associar a endoscopia digestiva, o que impediu a visualização da mucosa esofágica. Ademais, o método aumentou o risco de broncoaspiração, e desse modo, os exames necessitaram ser realizados em tempo exíguo.

Em 2016, Magalhães *et al.*⁷ classificaram e correlacionaram, com sucesso, a gravidade das lesões na esofagite cáustica com achados ultrassonográficos obtidos pelo uso combinado da endoscopia digestiva e o sistema de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe) operando em 40 MHz. Nesse caso, a possibilidade de broncoaspiração durante o exame foi prevenida ao se intubar o animal. Da mesma forma, em estudos que analisaram lesões do cólon em camundongos, a conjugação da endoscopia com a BMUe mostrou-se crucial na obtenção das imagens.^{8,9}

Apesar dos avanços alcançados com as técnicas diagnósticas de câncer de esôfago, há espaço para o aprimoramento e desenvolvimento de tecnologias/procedimentos e quanto a isso, os modelos animais são importantes na realização de testes iniciais. Mesmo considerando que nenhum modelo animal vislumbre a complexidade genética, biológica e molecular do câncer esofágico humano, avanços na ciência básica e translacional se fazem necessários.

Pretende-se, no presente estudo, estabelecer dois modelos de carcinogênese esofágica. O primeiro baseia-se na indução cirúrgica da Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), a qual participa dos complexos eventos fisiopatológicos da doença, e um segundo, na infiltração de uma suspensão contendo células tumorais, na camada mucosa esofágica.

A segunda abordagem irá partir da aquisição da linhagem tumoral LLC-WRC 256 (CCL-38™), da American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, US). Com isso, o desenvolvimento de um modelo murino de câncer esofágico tornar-se-á factível, considerando que tumores espontâneos são extremamente raros nesta espécie.

Vale ressaltar que no tumor de Walker é possível observar os três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão em um período de 12-16 dias. Ademais, o tumor apresenta comportamento biológico agressivo, é localmente invasivo e com alta capacidade metastática. Este tumor tem crescimento acelerado, o que causa caquexia e estresse oxidativo, e ainda apresenta elevada demanda metabólica, a exemplo do que ocorre em pacientes com câncer.¹⁰

O acompanhamento das alterações morfológicas do esôfago, associadas aos dois modelos propostos de carcinogênese esofágica, será realizado por meio de imagens de endoscopia e de BMUe, levando-se em conta a experiência do grupo do Laboratório de Ultrassom (LUS) quanto ao desenvolvimento da instrumentação de BMUe como também na utilização dela, conjugada à endoscopia, para a aquisição de imagens do trato gastrointestinal de ratos (*Rattus norvegicus*) e de camundongos (*Mus musculus*).

JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a grande maioria dos pacientes com câncer esofágico procuram assistência médica em estágios avançados da doença, a validação de um sistema ultrassônico que produza imagens, em tempo real, com resoluções compatíveis com a da microscopia óptica panorâmica, como no caso da BMUe, permitirá ao médico endoscopista diagnosticar com maior precisão a doença, reduzindo o tempo para início do tratamento. Desta forma, é imperativo testar o potencial diagnóstico da BMUe em modelos animais de carcinogênese esofágica, para futuramente realizar-se um trabalho translacional para o emprego da técnica em humanos.

OBJETIVOS

Objetivo primário:

- Detectar a presença de tumor esofágico em ratos por imagens de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe) associada com a endoscopia convencional.

Objetivos secundários:

- Induzir o desenvolvimento tumoral em ratos por meio da infiltração de uma suspensão contendo 10⁶ células da linhagem tumoral LLC-WRC 256, na camada mucosa esofágica;
- Simular a Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) em ratos, com base na técnica operatória da miectomia total associada à vagotomia troncular;
- Realizar um acompanhamento da evolução tumoral esofágica por meio de imagens de BMUe e de endoscopia adquirida *in vivo*;
- Comparar os achados nas imagens com aqueles obtidos por exame das peças de esôfago.
- Comparar a imunexpressão dos biomarcadores oncogênicos e de atividade mitótica: p53, E-caderina, e EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) nos diferentes grupos experimentais.
- Capacitar discentes da Iniciação Científica do Curso de Graduação em Medicina na pesquisa aplicada.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da amostra e desenho do estudo experimental

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Serra dos Órgãos- UNIFESO, em 10 de dezembro de 2021, sob o n.º de protocolo 525/2021 e encontra-se segundo a Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, bem como em conformidade com os princípios adotados internacionalmente, sobre a utilização, manutenção e proteção de animais de laboratório.

Amostra

Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia* – Berkenhout, 1769), machos, com média de idade de três meses e peso de 300 ± 20 g, procedentes da Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis-RJ. Os animais serão mantidos em macro e microambiente adequados, compreendendo gaiolas com ventilação apropriada (15-25 trocas de ar/hora), iluminação em conformidade com o ciclo circadiano (325 lux a 1m do piso), controle de temperatura (22 ± 2 °C), umidade ($55 \pm 5\%$), além de cuidados padronizados de alimentação (ração Nuvilab CR-1 Irradiada, Quimtia®, PR. BR), higiene e água *ad libitum*.

Desenho do estudo experimental

Os animais serão randomizados em cinco grupos:

I) Grupo Controle (GC, n = 12); sem procedimento cirúrgico. Aquisição de imagens *in vivo* do esôfago por BMUe e endoscopia digestiva, em D1. Em seguida, serão realizados exames histológicos e imuno-histoquímicos dos espécimes esofágicos correspondentes.

II) Grupo Simulação (GS, n = 12); simulação do procedimento cirúrgico de miectomia total (por palpação do esôfago), e após 10 dias, aquisição de imagens esofágicas por BMUe e endoscopia digestiva. Em seguida, serão realizados exames histológicos e imuno-histoquímicos dos espécimes esofágicos correspondentes.

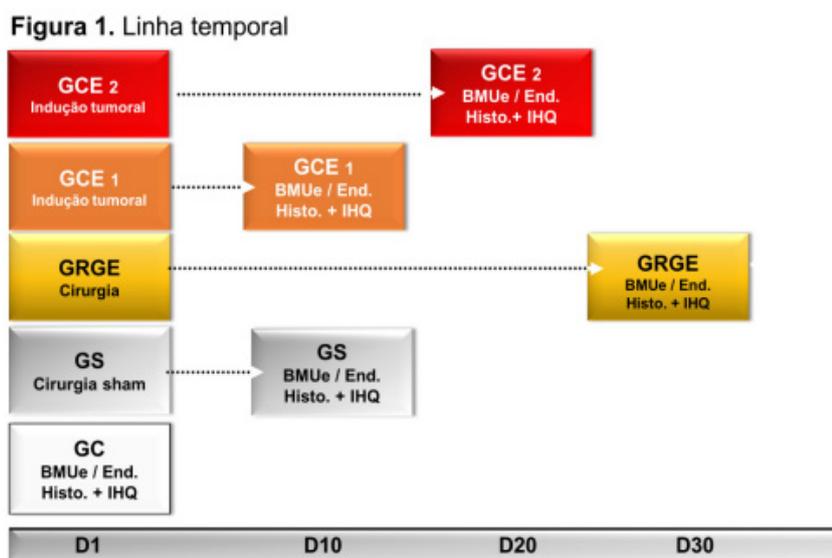
III) Grupo Refluxo Gastroesofágico (GRGE, n = 12); laparotomia mediana, seguida de secção das túnicas adventícia e muscular do esôfago distal, próximo à junção gastroesofágica, estendendo-se longitudinalmente por $\approx 7,5-10$ mm (direção crânio-caudal). As túnicas submucosa e mucosa serão preservadas. Após a cirurgia, os animais serão mantidos em jejum alimentar por três dias, seguida da administração de ração úmida. Aos 7 dias será fornecida ração comercial. Após 30 dias, serão obtidas imagens *in vivo* por BMUe e endoscopia digestiva, além de exame histológico e imuno-histoquímico dos espécimes esofágicos correspondentes.

IV) Câncer Esofágico¹ (GCE1, n = 12); infiltração de uma suspensão contendo 10^6 células da linhagem tumoral LLC-WRC 256 na camada submucosa esofágica. Após a cirurgia, será iniciada uma dieta como proposta para o GRGE e 10 dias após, obtidas imagens por BMUe e endoscopia digestiva do órgão, seguidas de exame histológico e imuno-histoquímico dos espécimes esofágicos correspondentes.

V) Câncer Esofágico² (GCE2, n = 12); procedimento similar ao grupo anterior, porém com as imagens, exames histológicos e imuno-histoquímicos obtidas após 20 dias. A indução cirúrgica da doença esofágica será realizada na Instalação de Ciência Animal do UNIFESO (Centro Universitário Serra dos Órgãos, Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis-RJ), e as imagens de BMUe e de endoscopia convencional adquiridas no Laboratório de Ultrassom (LUS) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PEB/COPPE/UFRJ).

Síntese dos procedimentos em linha do tempo

A figura 1, resume os principais eventos que comporão o delineamento experimental do estudo, sequenciados em linha temporal.



GC = Grupo Controle; GS= Grupo Simulação; GRGE = Grupo Refluxo Gastroesofágico; GCE1 = Grupo Câncer Esofágico 1; GCE2 = Grupo Câncer Esofágico 2; Hist./IHQ = Histologia/Imuno-histoquímica. BMue/End = Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal associada a Endoscopia Convencional. Fonte: Autores, 2024.

Descrição da técnica operatória de miectomia total esofágica com vagotomia troncular

Após cuidados de assepsia e antisepsia, o animal será anestesiado com a associação de 75-100 mg/kg de cloridrato de cetamina a 10% (Cetamin® Syntec, SP, BR) e 5-10 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% (Xilazin® Syntec, SP, BR) ambos na mesma seringa e aplicados por via intraperitoneal (I.P). Em seguida, o animal será posicionado em decúbito dorsal, procedendo-se à laparotomia mediana com 3 cm de extensão a partir do apêndice xifoide até a topografia do umbigo, seguido de ressecção da camada muscular esofágica, próximo à junção gastroesofágica, estendendo-se cranial e longitudinalmente por cerca de 7,5-10 mm.

O passo seguinte consistirá na síntese cirúrgica da parede abdominal e da pele com sutura ancorada de Ford com uso de náilon 2-0 (Ethicon™ Johnson & Johnson MedTech, CA, US). Como analgesia preemptiva, será administrada 1 mg/kg de cloridrato de tramadol (Tramal®, Grünenthal do Brasil Farmacêutica Ltda., SP, BR) por via intramuscular, 30 minutos antes do procedimento operatório. Serão excluídos os animais que apresentarem perfuração e/ou hemorragia no esôfago, estômago e/ou duodeno. Os animais serão monitorados quanto à presença de distúrbios de motilidade esofágica por cerca de 30 dias.

Cuidados pós-operatórios e de suporte nutricionais

Como controle da dor pós-operatória, será utilizado uma vez ao dia, cloridrato de tramadol (Tramal®) 1 mg/kg via IP, seguido da administração de Ibuprofeno (Alivium®, Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A. GO, BR) diluído na água de beber (30 mg/kg) durante 7 dias. Os animais que apresentarem sintomas álgicos graves ou anorexia, serão eutanasiados por motivos humanitários.

Descrição da técnica de cultivo celular e preparo da suspensão de células tumorais

A cultura criopreservada contendo $5,6 \times 10^6$ células (CCL-38™) será adquirida da American Type Culture Collection (ATCC®), por meio de seu representante comercial no Brasil (Pensabio Instrumentos de Biotecnologia Ltda.®, SP, BR). Os seguintes procedimentos serão realizados:

Preparo da suspensão de células tumorais

A recepção e preparo da suspensão serão realizados no Laboratório de Ensaios Pré-Clinicos – LAEPC do Departamento Experimental e Pré-Clínico da Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Após o descongelamento, as células tumorais serão cultivadas em meio de cultura Sigma 199 M4530® contendo 5% de soro de cavalo normal estéril e 1 ml de penicilina e estreptomicina. Frascos de cultura de 150 cm² serão usados para crescimento celular, e uma vez que > 90% de confluência for atingida, as células passarão a ser separadas pela adição de 3,5 mL de tripsina a 1% (Sigma®). As células serão então centrifugadas (5 minutos a 1.500 RPM) e depois ressuspensas em meio de cultura isento de soro. O número de células será calculado com uso de um hemocítmetro e então diluído, de modo que, ao final, haja a concentração de 10^6 células/ml na suspensão.

Período estimado para o surgimento dos tumores esofágicos e tempo de sobrevida global

Estudos indicam que após a infiltração, a sobrevida de ratos Wistar encontra-se em torno de 13 dias quando se faz o procedimento no músculo do membro posterior (10^6 células), 14 dias em rim direito (3×10^5 células), 10 dias no pulmão (5×10^5 células), 13 dias no estômago (10^6 células) e 10 dias no fígado (3×10^5 células).¹¹

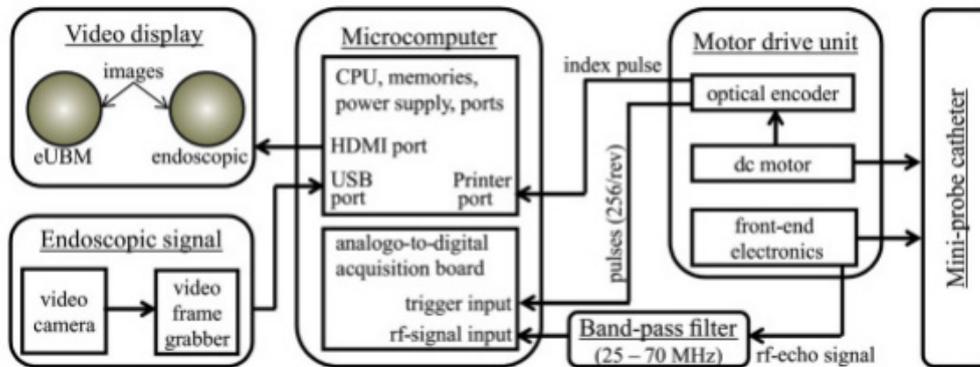
Com relação ao modelo baseado no refluxo gastroesofágico, Matsui *et al.*¹² estimaram que o Esôfago de Barrett (EB) é observado 10 semanas após o início do refluxo. Já a displasia e o adenocarcinoma esofágico surgem a partir de 17 e 24 semanas, respectivamente.

Transporte dos animais

Para a obtenção das imagens de BMUe e de endoscopia convencional, cada animal será transportado individualmente da Instalação de Ciência Animal (Teresópolis–RJ) até o Laboratório de Ultrassom da COPPE/UFRJ (Cidade Universitária–RJ), para que a saúde e o bem-estar seja preservado, mantendo-o acomodado em gaiola sem água e sem alimento. A temperatura do veículo será adequada para a espécie (22 ± 2 °C). Antes da retirada do biotério, o animal será inspecionado pelo responsável técnico (RT), que emitirá o atestado sanitário para ser utilizado na emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) e recolhimento da taxa (DARE) para cada deslocamento realizado.

Exame ultrassonográfico e endoscópico

As imagens ultrassonográficas serão adquiridas por meio do sistema BMUe (resoluções axiais e lateral da ordem de 30 e 100 μ m, respectivamente) desenvolvido no próprio LUS (Fig. 2), o qual utiliza uma minissonda de ultrassom de 40 MHz, na forma de cateter, inserida através do canal de biópsia de um endoscópio flexível (Richard Wolf7 325.152, diâmetro externo: 2,5 mm, Vernon Hilss, IL, US).

Figura 2. Sistema de BMUe e de endoscopia convencional


Principais partes do sistema projetado no Laboratório de Ultrassom (COPPE), para exibir imagens ultrassônicas biomicroscópicas e endoscópicas simultaneamente. Fonte: Magalhães Gomes *et al.* (2016).7

O sistema BMUe de 40 MHz usa um cateter minissonda com 3,6-F de diâmetro (Atlantis SR Pro Coronary Imaging Cateter, Boston Scientific, Natick, MA, US), projetado para imagens IVUS, para transmitir e receber pulsos de ultrassom. A minissonda será inserida no canal de trabalho do endoscópio com a ponta do núcleo de imagem colocada fora extremidade distal do canal acessório, mas ainda o mais próximo possível da extremidade do endoscópio. Assim, as regiões de interesse para BMUe e endoscopia serão coincidentes, tanto BMUe quanto imagens endoscópicas adquiridas à taxa de 3,8 quadros/s e exibidos, simultaneamente, lado a lado em uma tela de vídeo.

Durante o exame para aquisição das imagens, o esôfago será irrigado com solução salina, injetada por meio de um acesso do cateter minissonda, para atuar como meio de acoplamento do ultrassom entre o transdutor e a parede do esôfago. As interconexões entre os componentes do sistema de imagem serão projetadas e implementadas no laboratório onde a presente investigação ocorrerá. O processamento desses sinais para gerar as imagens correspondentes e exibi-las simultaneamente serão controlados por computador pelo LabVIEW (Versão 8.5, National Instruments, Austin, TX, US), rodando em Windows XP. As imagens BMUe serão geradas a uma velocidade do som de 1.500 m/s.

Para a aquisição simultânea das imagens endoscópicas e de BMUe em modo-B a anestesia será brevemente induzida com isoflurano a 1,5% em 1,5 L/min de oxigênio, utilizando um sistema de anestesia para animais de laboratório (EZ-700, Euthanex, Palmer, PA, US), em seguida, será aplicada uma solução composta por cloridrato de cetamina a 10% (75-100 mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (5-10 mg/kg), ambas na mesma seringa, via I.P e depois o animal colocado em posição ortostática, com os incisivos fixados a um elástico em uma plataforma de acrílico (RIS-100, Biotex, Inc. Houston, TX, US), para manter a cavidade oral aberta.

A entrada traqueal poderá ser visualizada utilizando uma óptica Hopkins (II 64301 AA, Karl Storz, Tuttlingen, DE), com diâmetro externo de 1,9 mm e comprimento de 10 cm, revestido por uma bainha (Karl Storz, Tuttlingen, DE), com diâmetro externo de 2,5 mm e canal de trabalho de 1,1 mm de diâmetro, que receberá iluminação a partir de uma fonte de luz de xenônio (Xenolux 180, Confiance Medical, RJ, BR). A ótica será acoplada à microcâmera (H3-Z; Karl Storz, Tuttlingen, DE) conectada à processadora de vídeo (Image I HD; Karl Storz, Tuttlingen, DE). Um fio guia flexível (diâmetro externo de 0,88 mm) será passado pelo canal de trabalho da bainha do sistema ótico e introduzido na traqueia do animal após a visualização das cordas vocais. O sistema ótico, então, será retirado da cavidade oral, permanecendo apenas o fio guia no interior das vias aéreas. Após isto, um cateter intravenoso Jelco 16 G[®] será inserido no interior da traqueia orientado pelo fio guia, que será retirado imediatamente após. O cateter traqueal será conectado a um sistema de suporte de oxigênio.

Com o rato intubado, um endoscópio flexível (coledoscópio Richard Wolf 2,5 mm, IL, US), acoplado a uma microcâmera (Karl Storz, Tuttlingen, DE) conectada à processadora de vídeo (Image I HD; Karl Storz, Tuttlingen, DE), com uma fonte de luz de xênon (Confiance Medical, RJ, BR), será passado através de um bocal pela cavidade oral até o esôfago distal.

Análise das imagens de endoscopia e BMUe

As imagens endoscópicas serão examinadas, sendo emitido um diagnóstico de acordo com a classificação descrita por Zargar *et al.*¹³ (Tabela 1), contendo os escores para os achados endoscópicos. As imagens ultrassonográficas da BMUe também serão examinadas e um diagnóstico será dado baseado nos critérios descritos por Magalhães *et al.*⁷ (Tabela 2).

Tabela 1. Classificação histológica para esofagite

Grau	Achados histológicos
0	Mucosa lisa, cor normal
1	Edema e hiperemia
2a	Friabilidade, hemorragias, erosões, bolhas, membranas esbranquiçadas, exsudatos e ulcerações superficiais
2b	Grau 2a, mais ulcerações profundas e circunferenciais
3a	Pequenas áreas dispersas de necrose
3b	Necrose extensa

Fonte: Zargar *et al.*¹³

Tabela 2. Classificação em relação aos achados de BMUe

Achados de biomicroscopia ultrassônica (BMUe)	
Grau 0	Parede com espessura normal
Grau I	Parede com espessura aumentada
Grau II	Grau I mais alterações na textura da imagem em um segmento circular da parede
Grau III	Alterações na textura da imagem ao longo de toda a circunferência da parede ou grau III mais ulceração

Fonte: Magalhães *et al.*⁷

As imagens de BMUe dos grupos experimentais serão analisadas qualitativamente e comparadas com a histologia post mortem.

As imagens da BMUe também serão analisadas em relação à espessura da parede, utilizando o programa de processamento de imagem ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, US) para a obtenção das medidas.

O valor médio da espessura da parede do esôfago de cada rato examinado será obtido após a realização da medição em dez locais, onde for evidenciado maior espessamento. A distância radial entre o limite interno da mucosa e o limite externo da camada muscular externa será considerada em cada medição. O valor médio será utilizado na análise estatística.

Estudo histológico e imuno-histoquímico

Após a aquisição das imagens, será induzida a morte nos animais por sobredose anestésica, para a excisão do segmento esofágico distal.

As amostras serão enviadas ao Serviço de Anatomia Patológica (SAP), do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Após a fixação durante 24 horas em paraformaldeído a 4%, amostras do segmento distal esofágico serão fragmentadas e emblocadas na posição vertical, em parafina, de modo a se obter cortes no plano transversal. O seccionamento dos blocos será realizado selecionando fatias de 5 µm a cada 50 µm, os quais eram desprezados, de maneira a obter diferentes segmentos para análise.

Em seguida, os cortes serão colocados em lâminas e corados por Hematoxilina e Eosina (H&E). Os parâmetros histológicos (tamanho e número de tumores) de cada animal serão avaliados de modo cego, sem identificar o número e grupo de cada animal para o pesquisador avaliador.

Serão realizadas análises semiquantitativas, para a imunoexpressão dos biomarcadores oncogênicos e de atividade mitótica: p53, E-caderina, e EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Os resultados serão avaliados por cegamento.

Análise estatística dos dados

Os achados (presença e tamanhos de tumores, parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos) serão analisados com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste t (Welch) com a correção de Bonferroni, considerando-se um intervalo de confiança de 95% e grau de significância de 5% ($p < 0,05$). Será usado o software livre Jamovi (Versão 1.1.9), que tem como base a linguagem estatística R.

RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO

As imagens esofágicas de ratos, adquiridas in vivo foram baseadas no uso simultâneo do ultrassom de alta frequência e na endoscopia convencional. Em conjunto, as técnicas permitiram avaliar simultaneamente a superfície da mucosa esofágica, por meio da endoscopia óptica, e as camadas da parede do esôfago, com a ultrassonografia.

Estudos anteriores do nosso grupo, utilizaram técnica semelhante na detecção e seguimento de tumores do cólon de camundongos^{9,25}, na avaliação da inflamação do cólon em ratos⁸, além da classificação endoscópica da esofagite cáustica aliada a medições de espessura parietal do órgão⁷.

Nesse contexto, apesar dos avanços alcançados com as técnicas diagnósticas de imagem e estadiamento do câncer de esôfago, há espaço para o desenvolvimento de novas tecnologias/procedimentos e, quanto a isso, os modelos animais são importantes na realização de testes iniciais.

O estudo desenvolvido na Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis-RJ e no Laboratório de Ultrassom (LUS) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE-UFRJ), utilizou ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia* mammalia – Berkehaout, 1769), machos, da linhagem Wistar, heterogênicos e mantidos sob condições ambientais controladas.

A escolha do rato Wistar baseou-se na sua docilidade, pequeno porte, facilidade de criação, assim como na viabilidade de realizar a técnica operatória e aquisição de imagens endoluminais. Ademais, utilizaram-se animais do mesmo sexo, com peso e idade aproximados, o que proporcionou uma amostra uniforme.

No que tange à anatomia, histologia e fisiologia do esôfago murino e do homem, ambas as espécies possuem camada muscular esofágica composta tanto de músculo esquelético (controle voluntário) quanto liso

(controle involuntário). As partes compostas por músculo liso do corpo do esôfago são inervadas pelo nervo vago, que controla o peristaltismo sob condições fisiológicas.^{14,15}

No homem, assim como no rato, cerca de 5-33% do esôfago proximal é constituído por músculo esquelético. Os 35-40% intermediários são uma mistura de músculo esquelético e liso, e os 50 a 60% distais são compostos de músculo liso.^{11,12} Nos ratos também ocorre a transição gradual do músculo estriado para o liso, com uma zona mista contendo ambos os tipos de fibras musculares (aproximadamente 35% do comprimento total do esôfago) ao redor do nível do arco aórtico. Os dois terços distais são formados por músculo liso, de controle involuntário.^{14,15} Por sua vez, os músculos são organizados em camadas circulares internas e longitudinais externas. Na espécie humana, a inervação neural do esôfago é realizada pelo plexo mioentérico (Auerbach), localizado entre as duas camadas musculares; e pelo plexo submucoso de Meissner. O plexo mioentérico é responsável pelo peristaltismo esofágico, ao passo que o complexo Meissner é o sítio dos impulsos sensoriais aferentes.¹⁴

Embora a interação precisa entre a morfologia e a função dos plexos nervosos não esteja totalmente clara, existem dois neurotransmissores principais no plexo mioentérico. Os neurônios excitatórios liberam acetilcolina (ACh), que medeia a contração tanto da camada muscular circular quanto da longitudinal. Os neurônios inibitórios afetam predominantemente a camada muscular circular através da liberação de óxido nítrico (NO). A estimulação excitatória da ACh tem seu maior efeito nas porções proximais, enquanto o efeito inibitório do NO é observado distalmente.^{14,15}

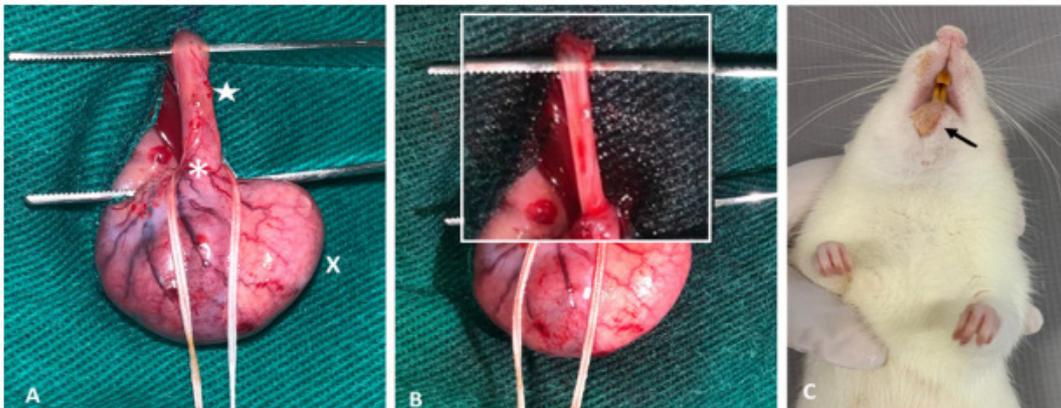
O relaxamento do EEI ocorre em resposta à deglutição, podendo também ocorrer em resposta à distensão do esôfago (peristaltismo secundário), ou até mesmo na ausência de peristalse.^{10,11} Assim, o relaxamento transitório do esfíncter esofágico inferior (RTEEI) desencadeado pela distensão gástrica é um reflexo vagal que compõe a digestão normal. O RTEEI representa o principal mecanismo de refluxo gastroesofágico em indivíduos normais e naqueles com DRGE leve.^{14,15}

Em *anima nobile*, a barreira gastroesofágica (antirrefluxo) é formada pelo esfíncter esofágico, diafragma crural, ligamento frenoesofágico e ângulo de His, que causa uma entrada oblíqua do esôfago no estômago. Nos ratos, a pressão nas duas extremidades da barreira gastroesofágica é muito maior do que o gradiente de pressão encontrado no tórax ou abdome durante qualquer fase do ciclo respiratório. Em condições fisiológicas, a força e pressão desta barreira tornam quase impossível o refluxo em ratos. Vale lembrar que o refluxo é um processo passivo, em que ocorre um fluxo do conteúdo alimentar não digerido do estômago para o esôfago.²⁶

Com base nos modelos experimentais de refluxo gastroesofágico e do Esôfago de Barret encontrados na literatura pesquisada, optou-se pela técnica operatória de miectomia total associada a vagotomia troncular, a qual produz refluxo gastroduodeno-esofágico moderado, sendo capaz de reduzir a probabilidade de óbitos por broncoaspiração.¹⁴⁻¹⁶ O procedimento cirúrgico foi realizado na Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, e dada a rigorosa assepsia e antisepsia pré-operatória, não foram utilizados profilaticamente antibióticos, devido à baixa possibilidade de ocorrerem infecções.

Procedeu-se à ressecção da camada muscular ($\approx 7,5-10$ mm) do esôfago intra-abdominal (Fig. 3), seguida de síntese cirúrgica. O tempo operatório médio foi de 20 minutos, portanto curto. Após o procedimento, os animais foram submetidos aos cuidados pós-operatórios de analgesia e aquecimento, seguido do jejum alimentar por três dias. Em seguida, receberam quantidades crescentes de ração umedecida. Aos 7 dias, os animais voltaram a ingerir ração comercial. Aduz-se que o adiamento do início da dieta sólida se relaciona à mortalidade aumentada nos animais submetidos à miectomia total.¹⁴

Figura 3. Técnica operatória de miectomia total e vagotomia troncular



A) Aspecto normal do esôfago. B) Esôfago após a miectomia total. C) Sinal clínico de regurgitação do conteúdo alimentar. Legenda: Esôfago (estrela); Junção gastroesofágica (Asterisco); Estômago (X). Fonte: Autores, 2024.

No presente estudo, a taxa de mortalidade foi de 20%, portanto quando confrontado aos demais modelos de DRGE citados na literatura, a técnica operatória de miectomia total apresentou menor morbimortalidade, considerando que aqueles que promovem o refluxo gástrico (por ligadura pilórica, constrição pilórica com ligadura pré-estomacal, cardioplastia de Wendel e anastomose esofagogástrica), refluxo misto (anastomose esofagogastroduodenal, esofagoduodenostomia ou esofagojejunostomia), refluxo duodenal (anastomose esofagogastroduodenal com gastrectomia), refluxo de componentes químicos (refluxo bilioso, refluxo pancreático, perfusão esofágica), ou mesmo transplante do órgão, apresentam modificações anatômicas por demais acentuadas, principalmente por meio de anastomoses no sistema digestório, o que aumentam sobremaneira, a mortalidade pós-operatória.¹⁷⁻²⁴

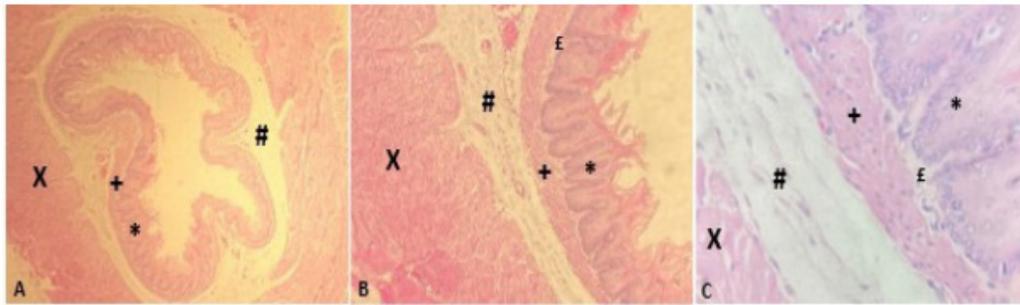
Em nosso estudo, observou-se ao final do período de 30 dias, uma acentuada dilatação gástrica e impactação esofágica nos ratos submetidos à miectomia total, causada pela ressecção da camada muscular do esôfago abdominal, o que diminuiu o tônus muscular, causando o trânsito lento e acumulado dos alimentos no esôfago. Tal fato pode estar associado ao retardo do esvaziamento gástrico decorrente da vagotomia troncular.¹⁴ Os achados de necropsia atestaram o êxito na mimetização da DRGE em ratos.

Por ocasião da colheita de amostras para exames histológicos e imuno-histoquímicos, alguns animais apresentaram aderências envolvendo o fígado e o esôfago. As aderências se localizavam na superfície do esôfago desprovida de camada muscular.

Histologicamente, o epitélio do esôfago no rato consiste em um epitélio escamoso estratificado queratinizado que se estende até o estômago anterior. Em *anima nobile*, o esôfago é revestido por epitélio escamoso estratificado não queratinizado que se estende até a junção gastroesofágica, onde se transforma em epitélio colunar.¹⁷

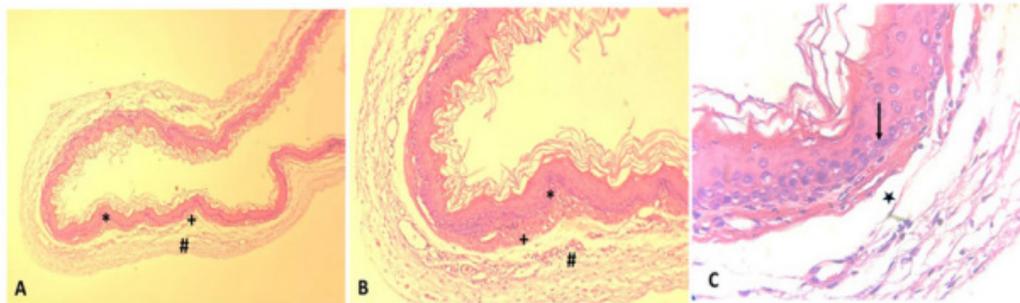
Em D1, os animais do Grupo Controle (GC) e do Grupo Refluxo Gastroesofágico (GRGE) apresentaram achados histológicos compatíveis com a normalidade (Figs. 4 e 5). Aduz-se que após 30 dias, as alterações histológicas no esôfago distal de ratos após o refluxo cirurgicamente induzido são semelhantes àsquelas observadas em humanos. Com exceção da hiperqueratose, o esôfago do rato passa a ter hiperplasia escamosa e hiperplasia das células basais, com inflamação severa de toda a espessura da parede esofágica.¹⁷

Figura 4. Achados histológicos do Grupo Controle



Camada muscular (X), Submucosa (#), Muscular da mucosa (+), Lâmina própria da mucosa (E), Mucosa (*). H&E 40x, 100x, 400x.

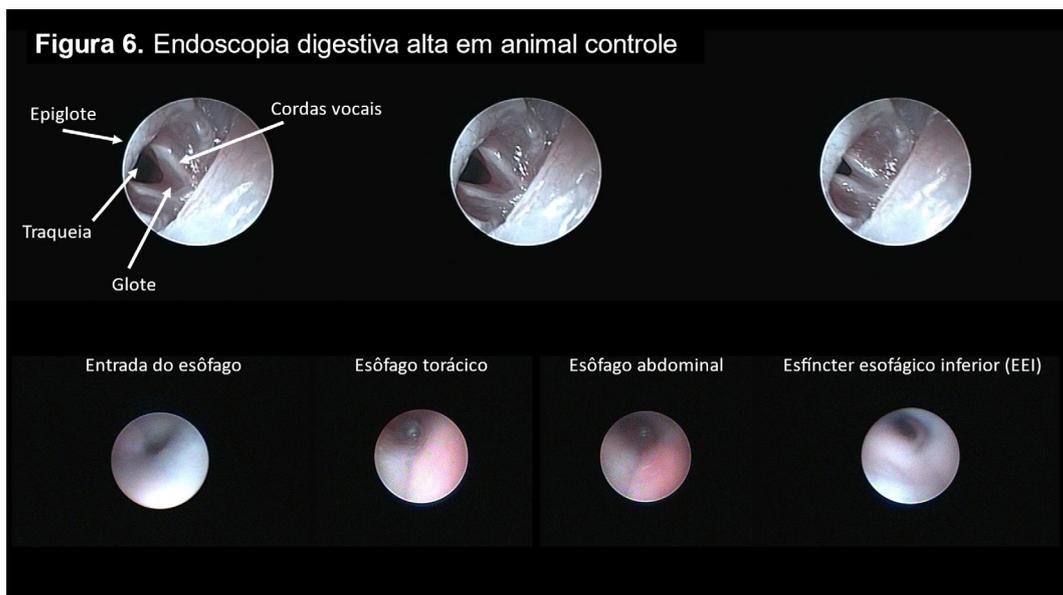
Figura 5. Achados histológicos do Grupo Refluxogastroesofágico



Em C, foi observada camada mucosa (seta) justaposta à lâmina própria (estrela), com porção epitelial íntegra e de espessura uniforme. Não havia alterações vasculares ou presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria (Figs. A - C). Nas amostras não foi observada a presença da camada muscular. Legendas: Camada submucosa (#); Muscular da mucosa (+); Mucosa (*). H&E 4x, 10x, 40x.

Nos animais do Grupo Controle (GC), a endoscopia convencional permitiu a visualização das camadas esofágicas normais, compreendendo a mucosa e a submucosa exibidas como uma única camada além da camada muscular externa (Fig. 6).

Em relação à endoscopia convencional, aduz-se que a ausência de alterações endoscópicas não exclui o diagnóstico de DRGE, uma vez que 25% a 40% dos pacientes com sintomas típicos apresentam endoscopia normal.²⁷



Fonte: Autores, 2024.

Em 2006, um estudo visualizou o esôfago de ratos por meio da ultrassonografia endoscópica (20 MHz). O trabalho avaliou a presença de tumores no órgão. No entanto, os autores não utilizaram a endoscopia, e dessa forma, a camada mucosa não foi avaliada. Ademais, por incompatibilidade de impedância acústica entre o balão utilizado e o tecido, houve a produção de artefatos na imagem ultrassonográfica correspondente ao local da mucosa, o que limitou o estudo.⁶

Num estudo posterior, outros pesquisadores utilizaram a intubação orotraqueal mantendo o rato respirando normalmente, o que permitiu o tempo necessário para o exame e uso combinado da BMUe e endoscopia.⁷

CONCLUSÕES

O modelo experimental da DRGE em ratos foi estabelecido com sucesso. Durante o período de 30 dias, observou-se acentuada dilatação gástrica provocada pela vagotomia troncular, além de sinais clínicos de regurgitação do conteúdo estomacal. As amostras histológicas foram submetidas ao exame imuno-histoquímico, para os imunoproteínas dos biomarcadores oncogênicos e de atividade mitótica: p53, E-caderina, e EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).

No que tange à formação dos discentes em Medicina, o estudo foi proveitoso, haja vista o desenvolvimento cognitivo e motor obtido durante as cirurgias e os debates suscitados acerca da DRGE humana e do modelo experimental.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver quaisquer conflitos de interesses.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este estudo é financiado pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - **FAPERJ**. Programa de Pós-doutorado Nota 10 (PDR10)- 2022. Edital 17/22. **Proc. SEI-RJ 260003/019572/2002**.

O estudo foi contemplado com bolsa da Direção de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão (**DPPE/PICPq/UNIFESO**).

REFERÊNCIAS

1. INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil [Internet]. INCA; 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>
2. Hamamoto Y, Endo T, Noshō K, Arimura Y, Sato M, Imai K. Usefulness of narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of Barrett's esophagus. *J Gastroenterol* 2004;39(1):14–20. doi: 10.1007/s00535-003-1239-z
3. Galloro G. High technology imaging in digestive endoscopy. *World J Gastrointest Endosc* 2012;4(2):22–7. doi: 10.4253/wjge.v4.i2.22
4. Murata Y, Napoleon B, Odegaard S. High-frequency endoscopic ultrasonography in the evaluation of superficial esophageal cancer. *Endoscopy* 2003;35(5):429–36. doi: 10.1055/s-2003-3877
5. Yoshinaga S, Oda I, Nonaka S, Kushima R, Saito Y. Endoscopic ultrasound using ultrasound probes for the diagnosis of early esophageal and gastric cancers. *World J Gastrointest Endosc* 2012;4(6):218–26. doi: 10.4253/wjge.v4.i6.218

6. Buttar NS, Wiersema MJ, Wang KK, DeMars CJ, Prasad GA, Lutzke LS. Rodent endosonography to monitor esophageal cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2006;37(2–3):84–90. doi: 10.1007/s12029-007-0006-4
7. Magalhães Gomes R, Soletti RC, Soldan M, Madi K, Foster FS, Machado JC. In Vivo Endoluminal Ultrasound Biomicroscopy and Endoscopy of Inflamed Rat Esophagus. *Ultrasound Med Biol* 2016;42(11):2687–96. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.07.001
8. Britto MAP, Soletti RC, Schanaider A, Madi K, de Souza HSP, Machado JC. Endoluminal ultrasound biomicroscopy as a reliable tool for in vivo assessment of colonic inflammation in rats. *Int J Colorectal Dis* 2013;28(12):1613–20. doi: 10.1007/s00384-013-1755-0
9. Soletti RC, Alves KZ, de Britto MAP, de Matos DG, Soldan M, Borges HL, et al. Simultaneous follow-up of mouse colon lesions by colonoscopy and endoluminal ultrasound biomicroscopy. *World J Gastroenterol* 2013;19(44):8056–64. doi: 10.3748/wjg.v19.i44.8056
10. Do Amaral LA, de Souza GHO, Santos MR, Said YLV, de Souza BB, Oliveira RJ, dos Santos EF. Walker-256 Tumor: Experimental Model, Implantation Sites and Number of Cells for Ascitic and Solid Tumor Development. *Braz. Arch. of Biol Technol* 2019;62: e19180284. doi: 0.1590/1678-4324-2019180284
11. Dornelas CA, Almeida PRC de, Nascimento GL do, Lima ÉB, Moraes MO de. Modelo experimental do carcinossarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. *Acta Cir Bras* 2006;21(1):38–42. doi: 10.1590/S0102-86502006000100009
12. Matsui D, Omstead AN, Kosovec JE, Komatsu Y, Lloyd EJ, Raphael H, et al. High yield reproducible rat model recapitulating human Barrett’s carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2017;23(33):6077–87. doi: 10.3748/wjg.v23.i33.6077
13. Zargar SA, Kochhar R, Mehta S, Mehta SK. The role of fiberoptic endoscopy in the management of corrosive ingestion and modified endoscopic classification of burns. *Gastrointest Endosc* 1991; 37:165–169. doi: 10.1016/s0016-5107(91)70678-0
14. Gaia Filho EV, Goldenberg A, Costa HO. Experimental model of gastroesophageal reflux in rats. *Acta Cir Bras* 2005;20(6):437–44. doi: 10.1590/s0102-86502005000600008
15. Castro Jr. MMA, Krueel CDP, Meurer L, de Castro AP, Zimmermann BS. Modelo experimental de carcinogênese esofágica. *Rev Col Bras Cir* 2007;34(3):153–6. doi: 10.1590/S0100-69912007000300004
16. Oberg S, Lord RV, Peters JH, Chandrasoma P, Theisen J, Hagen JA, et al. Is adenocarcinoma following esophagoduodenostomy without carcinogen in the rat reflux-induced? *J Surg Res* 2000;91(2):111–7. doi: 10.1006/jsre.2000.5908
17. Dornelas CA, Almeida PRC de, Nascimento GL do, Lima ÉB, Moraes MO de. Modelo experimental do carcinossarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. *Acta Cir Bras* 2006;21(1):38–42. doi: 10.1590/S0102-86502006000100009
18. Helsingen N. Oesophageal lesions following total gastrectomy in rats. I. Development and nature. *Acta Chir Scand* 1960; 118:202–16. PMID 14400939.
19. Helsingen N. Oesophagitis following total gastrectomy in rats. II. Development of oesophagitis in relation to type of reconstruction. *Acta Chir Scand* 1960; 119:230–45. PMID: 14400940
20. Levrat M, Lambert R, Kirshbaum G. Esophagitis produced by reflux of duodenal contents in rats. *Am J Dig Dis* 1962; 7:564–73. doi: 10.1007/BF02236137
21. Lambert R. Relative importance of biliary and pancreatic secretions in the genesis of esophagitis in rats. *Am J Dig Dis* 1962; 7:1026–33. doi: 10.1007/BF02231905
22. Salmon R, Hem B. Bile reflux esophagitis. A critical study of two models in the rat. *Digestion* 1981;22(2):73–9. doi: 10.1159/000198598

23. Ishii Y, Fujii Y, Yamashita T. Effect of sodium polyacrylate on chronic reflux esophagitis in rats. *Arzneimittelforschung* 1981;31(12):2112–5. PMID: 7199308.
24. Mud HJ, Kranendonk SE, Obertop H, Van Houten H, Westbroek DL. Active trypsin and reflux oesophagitis: an experimental study in rats. *Br J Surg* 1982;69(5):269–72. doi: 10.1002/bjs.1800690513
25. Alves KZ, Soletti RC, de Britto MA, de Matos DG, Soldan M, Borges HL, Machado JC. In vivo endoluminal ultrasound biomicroscopic imaging in a mouse model of colorectal cancer. *Acad Radiol* 2013; 20:90–98. doi: 10.1016/j.acra.2012.07.013
26. Montedonico S, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Gastroesophageal reflux after combined lower esophageal sphincter and diaphragmatic crural sling inactivation in the rat. *Dig Dis Sci* 1999;44(11):2283-9. doi: 10.1023/a:1026665022685
27. Katzka DA. Digestive system disorders: gastroesophageal reflux disease. *West J Med* 2000;173(1):48-53. doi: 10.1136/ewjm.173.1.48

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA CIRÚRGICA PARA PESQUISA E ENSINO COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Pedro Augusto da Costa¹, Marcel Vasconcellos²

1 - Discente do Curso de Graduação em Biomedicina do UNIFESO; 2 - Docente do Curso de Graduação em Biomedicina e Medicina do UNIFESO

RESUMO

Com a criação da Rede Nacional de Biotérios (REBIOTÉRIO) pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a indústria direcionada ao setor encontra-se em expansão. Dados do CNPq, estimam que 70% do total de animais utilizados em pesquisas científicas, são roedores, o que gera uma demanda da ordem de 5 milhões/ano desses animais. Procedimentos cirúrgicos na espécie, exigem, além de boa iluminação, ampliação visual do campo cirúrgico, aquecimento do animal, contenção adequada, assepsia e possibilidade do registro de imagens. Plataformas cirúrgicas inadequadas podem promover irreprodutibilidade experimental, obrigando a repetição de procedimentos invasivos e subsequente maior uso de animais. Considerando que em sua grande maioria as instituições de pesquisa do país utilizam plataformas improvisadas, o desenvolvimento de um produto nacional que atenda requisitos técnicos e se traduza em refinamento do procedimento cirúrgico, mostra-se oportuno e adequado. Quanto aos produtos importados, o trâmite moroso, custo elevado e dificuldade na reposição de seus componentes, desestimulam sua aquisição. Assim, o desenvolvimento de um protótipo de baixo custo e exequível, pode de fato, agregar ganho tecnológico ao setor. A base da plataforma, será prototipada em material PLA (biopolímero ácido polilático) não tóxico e biodegradável, além de ser manufaturado utilizando a tecnologia de impressão em 3D. Sendo como principal objetivo desenvolver um produto diferenciado, exequível, de baixo custo e comercialmente competitivo em relação aos importados, auxiliando e reduzindo os custos de pesquisas realizadas na Instalação de Ciência Animal do UNIFESO.

INTRODUÇÃO

A necessidade de integrar tecnologias digitais aos recursos educacionais e repensar abordagens tradicionais de ensino traz luz ao fato de que a demonstração de técnicas operatórias necessita ser reformulada. A tecnologia de impressão 3D tem um potencial significativo no desenvolvimento de protótipos de baixo custo, com maior precisão e adaptabilidade, aprimorando a qualidade do ensino e da pesquisa biomédica. Em um estudo do INCA, o uso de impressoras 3D para reconstruções mandibulares demonstrou a eficácia dessa tecnologia na personalização e precisão cirúrgica.¹ De maneira semelhante, no campo da Cirurgia Experimental, técnicas microcirúrgicas podem se beneficiar dessas inovações, otimizando a visualização e a execução operatória, sem depender de produtos caros e importados.

Desse modo, a manufatura de uma plataforma cirúrgica para animais de laboratório, que atenda ao registro da técnica cirúrgica e amplie o campo operatório, entre outros, tem o potencial de incentivar o processo de ensino-aprendizagem. Em relação ao mercado para produtos utilizados em biotérios, dados do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) estimam que cerca de 70% do total de animais utilizados em pesquisas científicas são roedores, o que gera uma demanda atual por parte das instituições de pesquisa públicas e privadas da produção de 5 milhões/ano desses animais.²

Vale ressaltar que grande parte das pesquisas utiliza procedimentos operatórios os quais exigem, além de boa iluminação, ampliação visual do campo cirúrgico, aquecimento do animal a 37 °C, contenção adequada, assepsia e possibilidade do registro de imagens.^{3,4,5}

Plataformas cirúrgicas inadequadas podem promover maus resultados experimentais, obrigando a repetição de procedimentos invasivos e o uso contraproducente de animais.⁶ Dada a carência de um produto que atenda com qualidade instituições de pesquisa do país, estas se utilizam, em sua grande maioria, de plataformas improvisadas. Em relação aos produtos importados, o trâmite moroso, custo elevado (cerca de 500 a 1.000 USD), e dificuldade na reposição de seus componentes, desestimulam sua aquisição.⁷

Desse modo, o desenvolvimento de um protótipo de baixo custo, exequível, que atenda às necessidades da pesquisa e ensino em animais de laboratório tem o potencial de agregar avanço tecnológico à indústria nacional.

OBJETIVOS

Objetivo primário

- Desenvolver uma plataforma cirúrgica, na área de concentração de Propriedade Intelectual, linha de pesquisa de Inovação & Tecnologia, que atenda a critérios especificados a seguir.

Objetivos secundários

- Comparar a plataforma produzida com as principais existentes no mercado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição dos Laboratórios a serem utilizados no projeto

O projeto foi desenvolvido no laboratório do UNIFESO (Instalação de Ciência Animal– ICA) e contará com a ajuda da empresa ImpGeek®, localizada em Teresópolis, RJ. A empresa será responsável pela manufatura da plataforma e a ICA pelos testes de campo, por meio de procedimentos cirúrgicos envolvendo o uso de animais de laboratório (protocolo CEUA/UNIFESO n.º 525/2021).

Descrição do *Software de Design gráfico*

Desenvolvida pela *Autodesk* o *Fusion 360* é um software de CAD, CAM, CAE e PCB baseado na nuvem que oferece uma ampla gama de funções para projetar, criar e fabricar produtos. Ele apresenta modelagem de superfície, simulação de engenharia, usinagem e fabricação aditiva.⁸

Recursos do *Fusion 360*:

- Modelagem 3D (CAD): Modelagem de superfície com ferramentas paramétricas e histórico de ações.
- Simulação de Engenharia (CAE): Ferramentas de simulação para análise de tensões, deformação, vibração e temperatura de variados materiais.
- Usinagem (CAM): Usinagem integrada para fresamento, torneamento, furação e outras operações.
- Fabricação Aditiva (AM): Suporte para impressão 3D FDM e SLA.
- Colaboração em Nuvem: Baseado em nuvem, permite que uma equipe trabalhe no mesmo projeto ao mesmo tempo.⁸

Descrição do equipamento de impressão 3D

A impressora 3D *Creality K™* (Figura 1) que usa a tecnologia de modelagem por fusão e deposição (*Fused Deposition Modeling*, FDM). Esse recurso é amplamente utilizado em pesquisa e desenvolvimento devido à sua capacidade de criar protótipos funcionais e modelos complexos com alta precisão e eficiência. A área de impressão da *Creality K1* é de 220 x 220 x 250 mm, o que permite a manufatura de projetos de tamanho médio em uma única execução, além disso sua velocidade de impressão é de até 600 mm/s.⁹

Especificações Técnicas

- Tecnologia de Impressão: FDM (*Fused Deposition Modeling*)
- Área de Impressão: 220 x 220 x 250 mm
- Velocidade de Impressão: Até 600 mm/s
- Precisão de Impressão: $\pm 0,1$ mm
- Diâmetro do Filamento: 1,75 mm
- Tipos de Filamento Compatíveis: PLA, PETG, ABS, TPU, entre outros
- Diâmetro do Bico (Nozzle): 0,4 mm (padrão), compatível com 0,2 e 0,6 mm
- Temperatura Máxima do Bico: Até 300°C
- Temperatura Máxima da Mesa Aquecida: Até 100°C
- Nível de Ruído: < 50 dB
- Conectividade: USB, cartão microSD, Wi-Fi
- Tela de Controle: Tela de toque de 4,3 polegadas
- Software: Compatível com *Creality Slicer*, *Cura*, *Simplify3D*, entre outros
- Tensão de Entrada: 100-240V, 50/60Hz
- Dimensões da Impressora: 355 x 355 x 480 mm
- Peso da Impressora: 14,7 kg.⁹

Figura 1. Impressora 3D Creality K1™

Fonte: Autores, 2024.

Funcionamento

As impressoras 3D funcionam por meio de uma tecnologia chamada *Fused Deposition Modeling* (FDM) e isso permite a criação de objetos tridimensionais através da adição de camadas do material, geralmente plástico fundido, a partir de um arquivo digital (CAD). O filamento do plástico é aquecido a uma temperatura de até 300 °C e é extrudido em camadas para que se forme o objeto desejado.

Principais componentes

Extrusora: é composta por um motor de passo, engrenagem *hobbed* e um *hotend*. A engrenagem empurra do filamento até o local onde esta o *hotend* que aquece o material a uma temperatura específica derretendo o mesmo que é extrudido pelo *nozzle* (bico de extrusão).

Cama de impressão (*build plate*): É onde o material fundido é depositado, algumas impressoras possuem *build plate* aquecida melhorando a aderência do plástico e evitando deformações na peça.

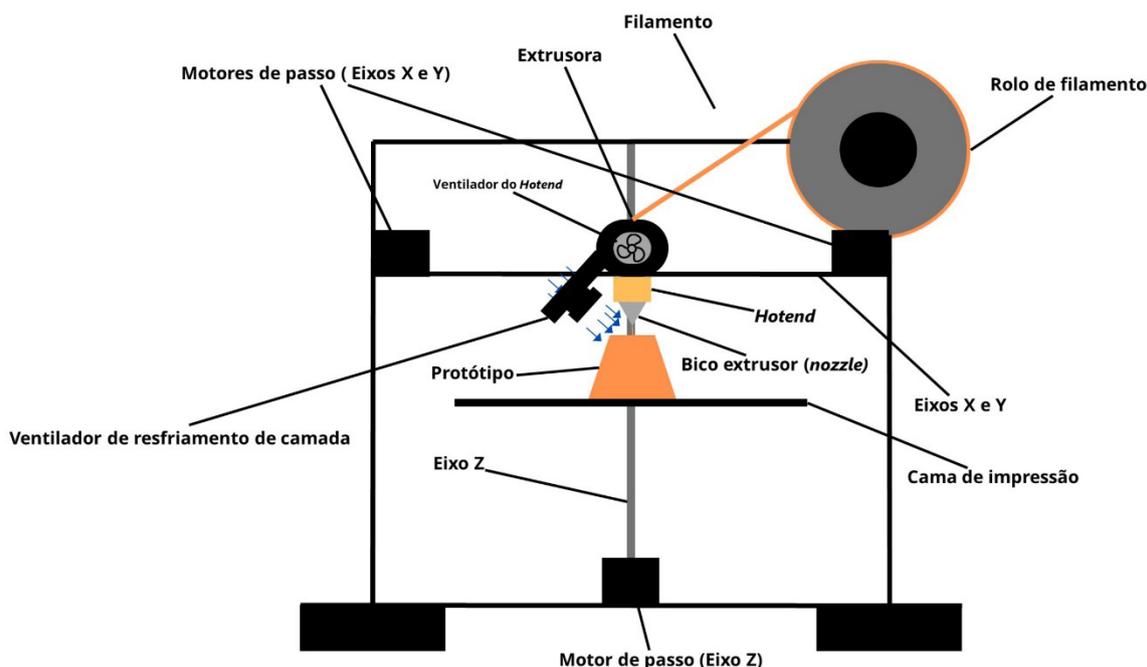
Motores de passo: Controlam os movimentos X, Y e Z. os motores que controlam X e Y movimentam a extrusora de forma bidimensional e o motor do eixo Z controla a altura da cama de impressão.

Ventiladores: Uma impressora pode apresentar dois tipos de ventiladores: Ventilador de resfriamento de camada, que resfria o material que é extrudido para solidificação evitando deformidades e o Ventilador do *hotend* que mantém o mesmo em uma temperatura constante.

Fim de curso (*end stops*): Sensores que delimitam os movimentos da impressora nos eixos, garantindo a precisão da impressão.^{10, 11}

Na figura abaixo está um diagrama do funcionamento de uma impressora 3D:

Figura 2. Diagrama de impressora 3D



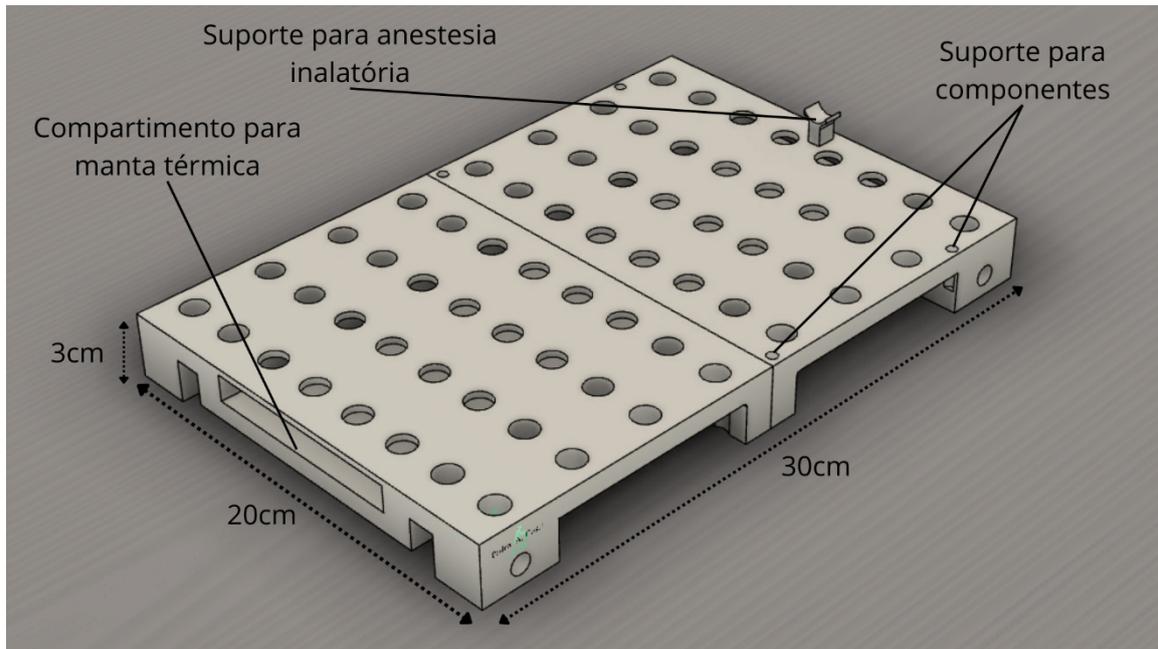
Fonte: Autores, 2024.

Descrição da matéria-prima da plataforma cirúrgica

O PLA (Ácido poliláctico) é um biopolímero termoplástico derivado de fontes renováveis, como amido de milho, mandioca e beterraba, através de um processo de fermentação. Apresenta diversas características vantajosas que o tornam uma alternativa promissora aos plásticos tradicionais à base de petróleo, além de ser considerado um importante polímero para aplicações biomédicas em razão de suas características, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica e processabilidade.¹²

Na figura abaixo há uma representação esquemática da plataforma manufaturada em PLA:

Figura 3. Representação esquemática do protótipo



Fonte: Autores, 2024.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação com as plataformas disponíveis no mercado

Durante o processo de desenvolvimento do projeto, foi realizada uma análise comparativa com as plataformas das principais empresas do mercado em pesquisa experimental, a fim de averiguar sua competitividade em termos de custos e funcionalidades.

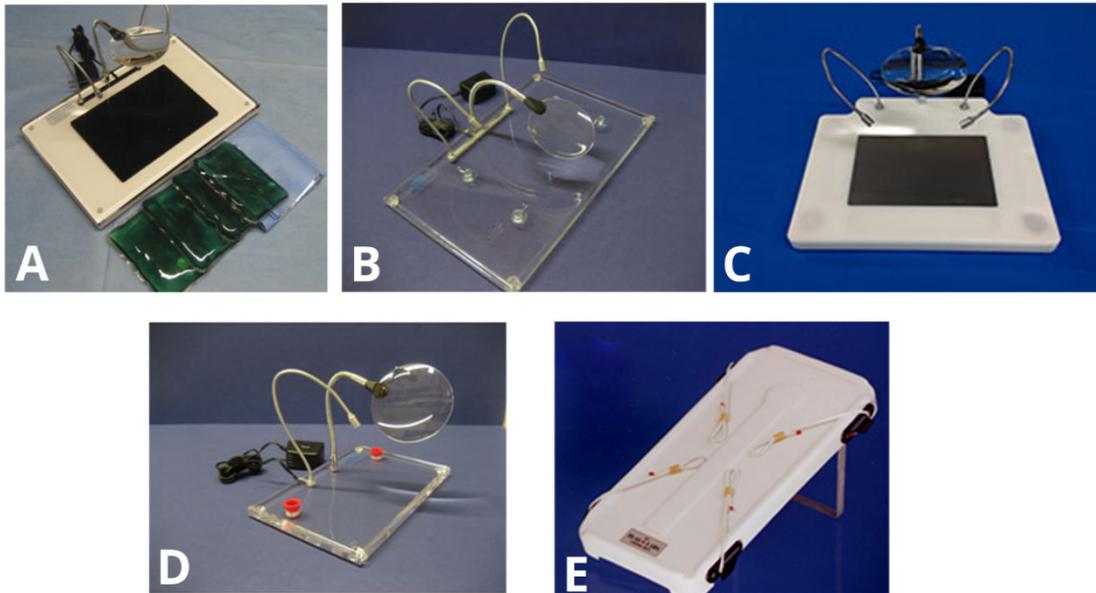
A tabela 1 apresenta uma comparação entre as plataformas e o protótipo:

Tabela 1. Comparação de preços e funcionalidades das plataformas cirúrgicas comerciais

Plataforma	Preço (USD)	Preço (BRL aprox.)	Características principais	Obs:
<i>Thermo Controlled Surgery Platform w/ Deltaphase Pads (ASS7T)</i>	USD 875	R\$ 4.768,93 (30 de Set 2024)	Controle térmico com pads Deltaphase	Importado
<i>Surgery Platform with 2 flexible LED lights</i>	USD 625	R\$ 3.406,38 (30 de Set 2024)	Iluminação flexível com LEDs	Importado
<i>Grace Surgical Warming Board</i>	USD 625-875	R\$ 3.406,38 - R\$ 4.768,93 (30 de Set 2024)	Tábua aquecida para cirurgia	Importado
<i>MicroTattooing Platform</i>	USD 525	R\$ 2.861,36 (30 de Set 2024)	Plataforma para tatuagem micro-cirúrgica	Importado
<i>Surgical Board 8-125 x 16 Animal Range: up to 12"</i>	USD 265	R\$ 1.444,30 (30 de Set 2024)	Tábua cirúrgica básica para pequenos animais	Importado
Protótipo de plataforma cirúrgica	USD 36,66	R\$ 200,00 - R\$ 700,00 aprox.	Plataforma com suporte para os componentes e aquecimento	Nacional, em desenvolvimento

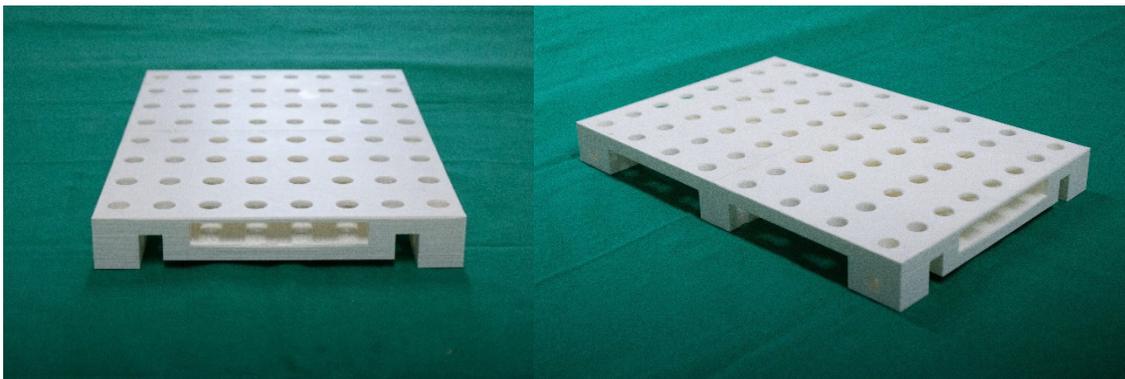
Fonte: Autores, 2024.

Figura 4. Principais plataformas cirúrgicas presentes no mercado



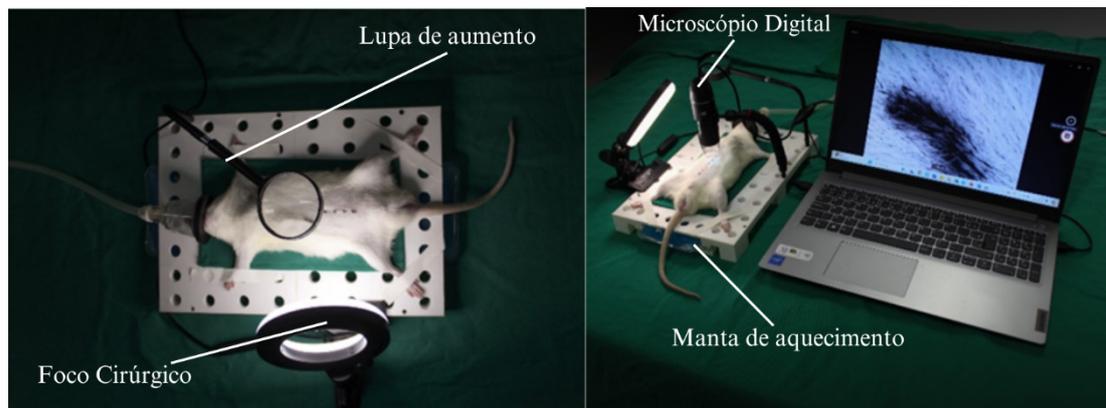
A) *Surgery Platform with 2 flexible LED lights*; B) *Thermo Controlled Surgery Platform wDeltaphase Pads (ASS7T)*; C) *Surgical Board 8-125 x 16 Animal Range: up to 12 long*; D) *MicroTattooing Platform*; E) *Grace Surgical Warming Board*; Fonte: Braintree Scientific, 2024.

Figura 5. Plataforma Cirúrgica em PLA



Fonte: Autores, 2024.

Figuras 6. Plataforma com os componentes



Fonte: Autores, 2024.

A necessidade de assistentes para manusear instrumentos essenciais aos procedimentos cirúrgicos, como afastadores, iluminação, ampliação do campo operatório e contenção do animal, muitas vezes, torna complexa a execução de cirurgias em animais de laboratório.

Atualmente, com a regulamentação das Comissões de Ética em Pesquisa Experimental, é necessário dar prioridade não apenas aos procedimentos cirúrgicos, mas também ao conforto e à segurança dos animais, evitando a manipulação excessiva. Portanto, experimentos que causam sofrimento e morte desnecessários aos animais devem ser evitados.¹³

Alguns modelos de plataformas cirúrgicas têm sido propostos e disponibilizados comercialmente, oferecendo uma série de benefícios e recursos que visam diminuir o tempo cirúrgico, proporcionando conforto e segurança para o operador e o animal.

Costa Filho *et al.* (2012) mencionaram diversas opções de mesas cirúrgicas, com diferentes indicações, aplicações e formatos. Como, por exemplo, a patente US 6467112, intitulada “*Operating Table for Animal*”, que apresenta uma mesa com uma grade destacável, composta por furos circulares de tamanhos variados, onde as excretas e fluidos corporais passam e são coletados por uma câmara interna, como uma pia inferior, ligada à rede de esgoto. Ao redor dessa grade estão acoplados um microscópio ou lupas e um sistema de exaustão para coletar o ar da câmara coletora. A mesa possui pés ajustáveis e pode ser equipada com conexões para entrada de água e iluminação. A patente RU 2 246 283 C2 da Federação Russa refere-se a uma mesa portátil ajustável em diferentes alturas e inclinações, cuja compactação facilita o armazenamento e transporte sem exigir muito espaço. Já a patente US2009/126113, intitulada “*Rotatable Surgery Table*”, descreve uma mesa auxiliar acoplável a uma mesa cirúrgica convencional, apresentando uma estrutura de “cama” com base dupla desmontável, que permite sua movimentação e ajuste tanto na horizontal quanto na vertical. O modelo é indicado para procedimentos em animais de pequeno e médio porte. A rotatividade da plataforma proporciona a redução do tempo necessário para o operador se deslocar ao redor do paciente durante o procedimento cirúrgico.¹

Testes realizados com a plataforma demonstraram que, com o uso de uma manta de aquecimento, a superfície da mesa atinge uma temperatura de aproximadamente 38-40 °C, proporcionando um ambiente térmico adequado para o animal e mantendo sua homeostase durante a cirurgia. Além das patentes mencionadas, diversos produtos têm sido disponibilizados comercialmente no mercado internacional, com cada fornecedor apresentando sua própria lista de benefícios e vantagens para a manipulação cirúrgica de animais de laboratório.

A plataforma desenvolvida teve um custo aproximado de R\$ 200,00 apenas para a estrutura em PLA. Com a inclusão de componentes adicionais, o custo total chegou a aproximadamente 50% do valor da plataforma comercial E (Figura 4), que representa uma variação de R\$ 600,00 até R\$ 800,00.

Dessa forma, o presente estudo apresenta um modelo inovador de mesa cirúrgica, definido pela sua combinação de recursos e funcionalidades voltadas para a cirurgia experimental. O dispositivo inclui uma mesa projetada para procedimentos cirúrgicos em animais de laboratório, otimizando a execução de maneira padronizada e rápida, eliminando a necessidade de assistentes.

Como mostra a figura 7, a plataforma foi utilizada com em uma cirurgia de tireoidectomia total, contando com manta térmica, lupa de aumento, foco cirúrgico e microscópio digital (aumento de 1000x).

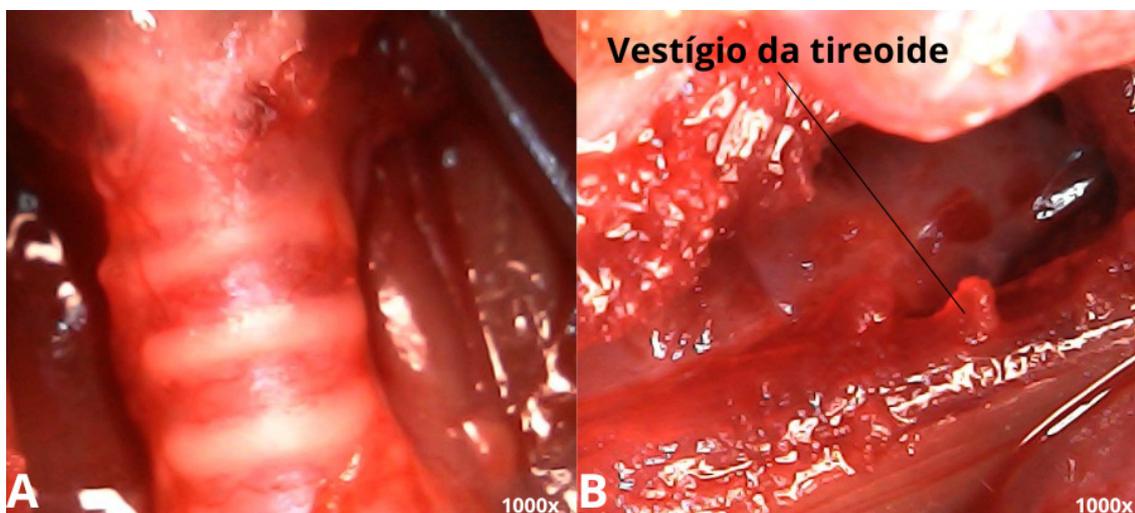
Figura 7. Plataforma usada durante cirurgia de tireoidectomia total



Fonte: Autores, 2024.

O uso do microscópio foi essencial para o registro de imagens e para a localização precisa da tireoide do rato, além de ajudar na verificação da remoção completa da glândula (Figura 8).

Figura 8. Técnica operatória de tireoidectomia total



A) Triângulo cervical ventral aumento de 1000x; B) Vestígio de remoção da glândula tireoide; Fonte: Autores, 2024.

CONCLUSÕES

O protótipo foi definido pela combinação de recursos e funcionalidades resultando em um produto diferenciado, executável, de baixo custo e comercialmente competitivo em relação aos importados. A plataforma foi desenvolvida para atender às necessidades de pesquisas experimentais e procedimentos cirúrgicos em animais de pequeno porte, oferecendo praticidade e facilitando a execução de cirurgias com precisão e eficiência. Além disso, a plataforma desenvolvida no UNIFESO permite a integração de componentes opcionais, como manta de aquecimento, fonte de iluminação LED, máscara para anestesia inalatória, lupa de aumento, microscópio digital e afastadores cirúrgicos. Esses componentes contribuem para a criação de um ambiente cirúrgico completo e personalizado, que atende aos requisitos de diferentes tipos de procedimentos. O uso de diferentes componentes, tais como a manta de aquecimento, por exemplo, assegura a manutenção da temperatura corporal do animal, reduzindo a perda de animais por complicações causadas por hipotermia.

O *design* modular da plataforma, construído em PLA (ácido polilático), um material resistente e de fácil modificação, traz viabilidade para adaptações e alterações futuros, permitindo ajustes na plataforma para atender a diferentes protocolos experimentais. Essa versatilidade é vantajosa em ambientes de pesquisa, onde é essencial para lidar com a variabilidade entre estudos. Além disso, o uso do PLA contribui para a redução de custos de produção, tornando o protótipo acessível e competitivo em comparação com plataformas importadas, cujo custo é significativamente maior. Por ser um material biodegradável, o PLA contribui para a sustentabilidade das instalações de ciência animal, reduzindo o impacto ambiental associado ao descarte de materiais e promovendo práticas mais ecologicamente conscientes.

Assim, o modelo desenvolvido não apenas preenche uma lacuna no mercado nacional, mas também promove o avanço da ciência experimental ao possibilitar que instituições com recursos limitados possam realizar procedimentos com segurança e conforto para os animais. Ao proporcionar uma plataforma de qualidade a um custo acessível, a iniciativa contribui para a disseminação de boas práticas em experimentação animal, alinhando-se aos princípios de ética e bem-estar animal.

REFERÊNCIAS

1. Moraes ARL, Farias TP, Vital JMA, Dias FL, Oliveira JF, Paixão JGM, et al. Avanço na reconstrução de mandíbula: uso de prótese customizada em titânio com auxílio da impressora 3D. Repositório Institucional do INCA. 2018. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/handle/123456789/12147>. Acesso em: 6 set. 2024.
2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Biotérios Associados [Internet]. Disponível em: <http://memoria2.cnpq.br/web/guest/bioterios-associados/>. Acesso em: 29 ago. 2024.
3. Brown MJ, Pearson PT, Tomson FN. Guidelines for animal surgery in research and teaching. AVMA Panel on Animal Surgery in Research and Teaching, and the ASLAP (American Society of Laboratory Animal Practitioners). *Am J Vet Res* 1993;54:1544–59.
4. Duke University & Medical Center. Guidelines for Rodent Analgesia. Available in: <http://vetmed.duhs.duke.edu/GuidelinesforRodentAnalgesia.html>. Acesso em: 15 mai. 2024.
5. Pritchett-Corning KR, Mulder GB, Luo Y, White WJ. Principles of Rodent Surgery for the New Surgeon. *JoVE* 2011;(47):2586.
6. Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959. Available in: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc. Acesso em: 15 mai. 2024.
7. Braintree Scientific Inc. [Braintree Scientific]. Disponível em: <https://www.braintreesci.com/>. Acesso em: 28 ago. 2024.

8. Autodesk. Fusion 360. Autodesk, Inc; 2023. Disponível em: <https://www.autodesk.com/products/fusion-360/overview>. Acesso em: 15 mai. 2024.
9. Creality. Especificações técnicas da impressora 3D [Internet]. Shenzhen: Creality; 2023 [citado em 2024 Set 20]. Disponível em: <https://www.creality.com>
10. Skylar-Scott MA, Mueller J, Visser CW, Lewis JA. Voxelated soft matter via multimaterial multinozzle 3D printing. *Nature*. 2019;575(7782):330-335. doi:10.1038/s41586-019-1783-1.
11. Wadman M. The printed organs coming to a body near you. *Nature*. 2020;578(7794):196-199. doi:10.1038/d41586-020-00271-6.
12. Alsaheb RA, Aladdin A, Othman NZ, Malek RA, Leng OM, Aziz R, et al. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2019 Jun 127(6):1612-26. Available from: <https://academic.oup.com/jambio/articleabstract/127/6/1612/6714800?login=false>
13. Costa Filho LB, Silva GAB, Abreu FAM, Assis MHS, Reis IDG, Pertence AEM, Dutra PA. Desenvolvimento de uma mesa cirúrgica para cirurgias gerais e odontológicas em animais de pequeno porte. ABCM, 2012. VII Congresso Nacional de Engenharia Mecânica (CONEM). São Luís do Maranhão. Disponível em: <https://www.abcm.org.br/anais/conem/2012/PDF/CONEM2012-0056.pdf>. Acesso em: 6 set. 2024.
14. Bonther. Bonther Equipamentos para Laboratório [Internet]. Disponível em: <https://www.bonther.com.br/>. Acesso em: 6 set. 2024.
15. Marques RG, Miranda ML, Caetano CER, Biondo-Simões MLP. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cir Bras* 2005; 20(3):262-67.
16. Frank SM, Fleisher LA, Breslow MJ, Higgins MS, Olson KF, Kelly S, et al. Perioperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events. *JAMA*. 1997;277(14):1127-34.

AVALIAÇÃO SANITÁRIA DA INSTALAÇÃO DE CIÊNCIA ANIMAL: UMA CONTRIBUIÇÃO PARA A MELHORIA DA QUALIDADE DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO PRODUZIDOS NO UNIFESO

Marcel Vasconcellos¹, Ana Beatriz Rocha Câmara², Maria Eduarda Rodrigues Apolinário², Gustavo Kimus Pimentel Nogueira², Sthefany Gravino Pazinato², Michely do Carmo Salomão², Laura de Almeida Ramos², Júlyo Henrique Alves Azevedo², Isabela Marques de Oliveira²

1 - Docente do Curso de Graduação em Medicina e Biomedicina do UNIFESO; 2 - Discente do Curso de Graduação em Biomedicina do UNIFESO.

RESUMO

Introdução: Segundo a FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), a ocorrência de agentes infecciosos em bioérios reforça a necessidade de se considerar a qualidade microbiológica dos animais, uma vez que esta influencia diretamente no bem-estar dos animais, na validade e reprodutibilidade da pesquisa. **Objetivos:** Realizar o monitoramento sanitário, visando contribuir na melhoria na qualidade dos animais produzidos na Instalação de Ciência Animal do UNIFESO. **Métodos:** CEUA n.º 573/24. Para o estudo, um rato Wistar (*Rattus norvegicus*), macho, com 21 dias de idade, foi utilizado como animal sentinela durante três semanas. Em seguida, o animal foi encaminhado ao Serviço de Controle de Qualidade Animal (SCQA) da Fiocruz- RJ, onde procedeu-se exames imunológicos, bacteriológicos, parasitológicos e anatomopatológicos. A partir dos resultados, discentes do curso de Biomedicina, elaboraram um Procedimento Operacional Padrão, visando implantar a vigilância laboratorial, tendo por objetivo identificar patógenos prejudiciais aos animais e com potencial zoonótico. Em relação ao microambiente dos animais, foi realizada a cultura de microrganismos em Ágar Müller-Hinton nas gaiolas, bebedouros, grade e ração. Ademais, o processo de esterilização por autoclave e seu protocolo operacional foram revistos. **Resultados:** Em relação à autoclave, conclui-se que o equipamento está operando adequadamente e os instrumentos esterilizados são seguros para uso. A análise microbiológica dos fômites mostraram que o processo de esterilização foi eficiente. O exame parasitológico do animal sentinela, revelou uma carga parasitária baixa de *Entamoeba sp.*, a qual não apresenta significado clínico ou mesmo interferência nas pesquisas, assim como no exame bacteriológico, no qual foram encontrados *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, patógenos que fazem parte da microbiota intestinal de ratos. O exame imunológico não detectou a presença de vírus murino. **Conclusão:** A implantação de um programa de monitoramento sanitário periódico representa um passo importante para a melhoria da qualidade dos animais produzidos no UNIFESO.

Palavras-chave: Controle de Qualidade; Animais de laboratório; Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

Localizada no Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis- RJ, a Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, possui *status* sanitário convencional, ou seja, produz e utiliza animais que possuem microbiota indefinida, uma vez que estes são mantidos em um ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

Na pesquisa básica, ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), são amplamente empregados como modelo animal na pesquisa biomédica. Eles apresentam um custo relativamente menor para se produzir e manter, sendo usados praticamente em todo tipo de pesquisa, desde a genética até a cirúrgica.¹

No entanto, para que se possa ter confiança nos resultados experimentais e reprodutibilidade, o estado sanitário desses animais precisa ser conhecido, a fim de se evitar possíveis vieses causados por contaminação da colônia.

São inúmeros os patógenos que acometem roedores, tais como vírus (Vírus Sendai, Vírus Toolan's H-1, Parvovírus, etc.), bactérias (*Mycoplasma pulmonis*, *Salmonella spp*, *Car Bacillus*, etc.), fungos (*Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, etc.) e parasitos (*Myobia musculi*, *Staphylococcus aureus*, etc.), e nesse ponto, a caracterização do estado sanitário de uma colônia permite conhecer as particularidades do modelo biológico utilizado e compor base de dados para auxiliar no desenho e na interpretação experimental dos pesquisadores.²

Segundo a FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), a ocorrência de agentes infecciosos em instalações de criação e experimentação de animais, reforça a necessidade de se considerar a qualidade microbiológica dos animais, uma vez que esta influencia diretamente no bem-estar dos animais, na validade e reprodutibilidade dos dados da pesquisa³.

Assim, torna-se relevante o estabelecimento de um programa de vigilância laboratorial da saúde animal como parte integrante do sistema de garantia de qualidade.

OBJETIVOS

Realizar o monitoramento sanitário da colônia, visando contribuir na melhoria na qualidade dos animais produzidos na Instalação de Ciência Animal do Centro Universitário Serra dos Órgãos- UNIFESO, Teresópolis- RJ.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela CEUA, sob o protocolo n.º 573/2024. Para o monitoramento sanitário da colônia, um rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), macho, com 21 dias de idade, foi isolado e utilizado como animal sentinela por três semanas.

O uso de animal “sentinela” compreende sua exposição diária à uma parte da cama utilizada por cada caixa do biotério. Desse modo, uma grande parte dos patógenos presentes na colônia, será transmitida ao animal.

Após o período de 21 dias, o animal foi encaminhado ao Serviço de Controle de Qualidade Animal (SECQA) do Centro de Criação Animal (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- RJ), onde após a eutanásia, procedeu-se a pesquisa de anticorpos ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detecção de vírus, além de exames bacteriológicos, parasitológicos e anatomopatológicos.

Obtidos os resultados, discentes da Iniciação Científica do Curso de Graduação em Biomedicina elaboraram um Procedimento Operacional Padrão (POP) relacionado a implantação do monitoramento sanitário regular e periódico do biotério, tendo por objetivo identificar patógenos prejudiciais aos animais e com potencial zoonótico.

Em relação ao microambiente dos animais, foi realizada a colheita e cultura em Ágar Müller-Hinton de microrganismos nas gaiolas, bebedouros, grade e ração e comparada com seus respectivos controles.

Da mesma forma, o processo de esterilização por autoclave e seu protocolo operacional foram revistos.

A seguir, os eventos que compuseram o delineamento experimental do estudo (Figura 1), sequenciados em linha temporal.

Figura 1. Linha temporal



O monitoramento sanitário completo encontra-se descrito no quadro 1.

Fonte: Autores, 2024.

Vale mencionar, que o monitoramento sanitário completo realizado pelo Serviço de Controle de Qualidade Animal (SECQA) da Fiocruz- RJ, atende biotérios de todo o país, firmando parcerias com instituições públicas e privadas para esse controle periódico.

O quadro 1, descreve os exames realizados:

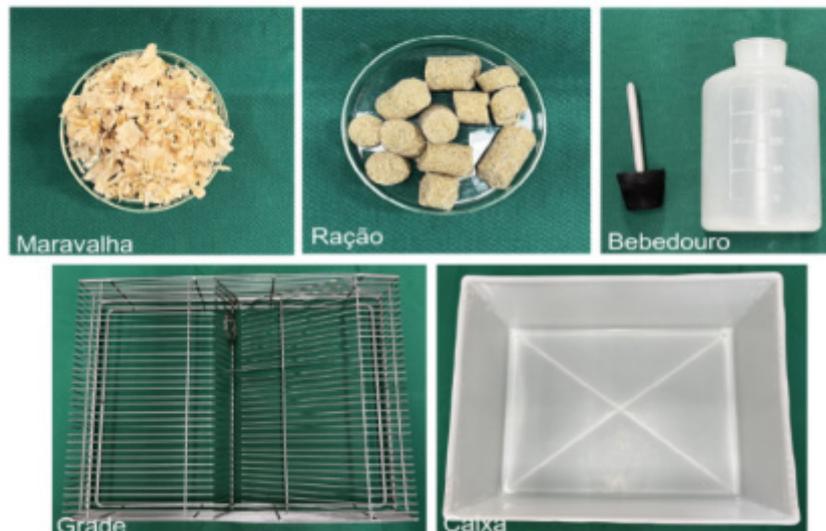
Quadro 1. Monitoramento sanitário completo em ratos

Vírus	
Vírus K (Kjham)	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Vírus Diminuto de Rato	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Parvovirus de Ratos	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Vírus Toolan's H-1	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Pneumovirus	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Coronavirus (Sialodacrioadenite)	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Theilovirus	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Hantavirus	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Adenovirus	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Reovirus tipo 3 (REO 3)	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Sendai Virus	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
Bactérias	
<i>Clostridium piliforme</i>	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
<i>Helicobacter sp</i>	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
<i>Car Bacillus</i>	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Pesquisa de anticorpos por ELISA*
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Cultura/métodos automatizados
<i>Streptococcus beta hemolítico (exeto grupo D)</i>	Cultura/métodos automatizados
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cultura/métodos automatizados
<i>Salmonella spp.</i>	Cultura/métodos automatizados
Parasitas	
Ectoparasitas: pulgas, ácaros e piolhos	Leitura através de estereoscópio
<i>Syphacia spp.</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Balantidium sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Aspicularis sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Rodentolepis sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Tricomonoideos</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Spiroplasma sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Giardia sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Cyathodium sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
<i>Entamoeba sp</i>	Leitura através de microscopia óptica
Anatomopatologia	
Anatomopatologia	Necropsia

Lista de patógenos pesquisados. Fonte: SECQA (Fiocruz- RJ), 2024.

Na figura 2, encontram-se os fômites do microambiente submetidos à análise microbiológica.

Figura 2. Componentes da análise microbiológica do microambiente



Fonte: Autores, 2024.

Monitoramento biológico da autoclave

A autoclavagem refere-se à descontaminação com utilização de vapor em altas temperaturas e pressões. O termo descontaminação ao invés de esterilização é mais correto, por considerar que a eficiência do tratamento se dá com 99,9% de inativação de microrganismos, o que se opõe ao conceito de esterilização, que seria a morte de 100% dos seres vivos.

Ademais, o processo de autoclavagem inclui ciclos de compressão e de decompressão de forma a facilitar o contato entre o vapor e os resíduos. O aquecimento dos resíduos em autoclave acontece em regime transiente não-isotérmico, ou seja, desde o início até o fim do processo a temperatura e pressão não se mantêm constantes. Durante o procedimento, o vapor é introduzido na autoclave e o aumento gradual da pressão favorece o contato entre o vapor e os resíduos.⁴

Indicadores biológicos para autoclave são dispositivos que contêm esporos de bactérias resistentes ao calor, como o *Bacillus stearothermophilus*. Esses esporos são extremamente resistentes e servem como “testes vivos” para verificar se o ciclo de esterilização da autoclave foi eficaz em eliminar todos os microrganismos presentes.

No monitoramento biológico, o frasco teste é colocado dentro de um pacote, e passa pelo ciclo de esterilização da autoclave. Terminado o ciclo, o tubo plástico é retirado, aguardando-se por 15 min. para seu resfriamento e perda de pressão. A ampola plástica é pressionada (ativada) e conseqüentemente ocorre a quebra da ampola de vidro interna, expondo os endósporos ao meio de cultura. O indicador teste é incubado, junto com outro indicador controle.⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise microbiológica dos fômites do microambiente

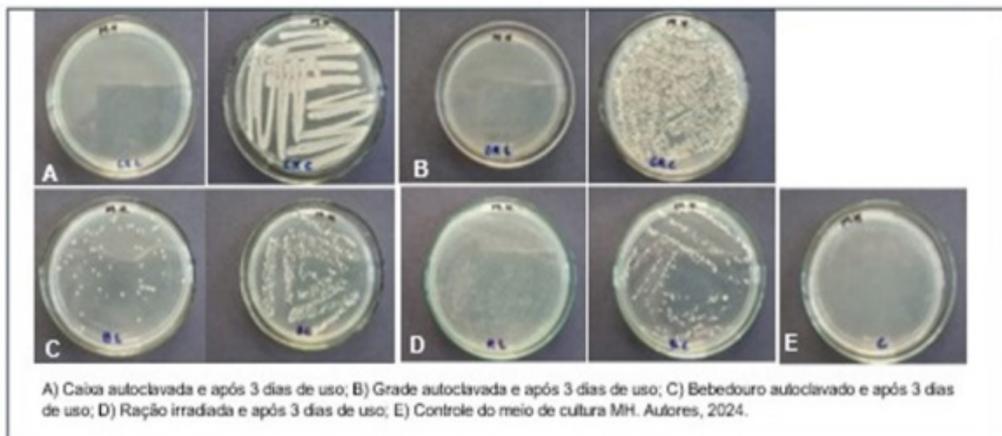
A análise microbiológica dos fômites do microambiente foi realizada após a esterilização e depois de 72h de uso (de acordo com o procedimento de limpeza e troca de caixas preconizado para o biotério).

Após a colheita por meio de swab estéril, foi realizada a semeadura em meio de cultura Müller-Hinton e incubação em estufa a 37 °C por 24h.

Os resultados mostraram intensa contaminação da caixa e da grade após 72h de uso (Figura 3a, 3b). Em relação ao bebedouro, observou-se que a esterilização não foi totalmente eficiente (Figura 3c), demonstrando algum crescimento bacteriano após sua autoclavação. Acredita-se que tal fato esteja relacionado ao formato do bebedouro.

Já a ração irradiada, não apresentou nenhum tipo de contaminação logo após sua abertura. E finalmente, o controle do meio de cultura não demonstrou, como esperado, crescimento de microrganismos (Figura 3d).

Figura 3. Cultura em Ágar Müller-Hinton

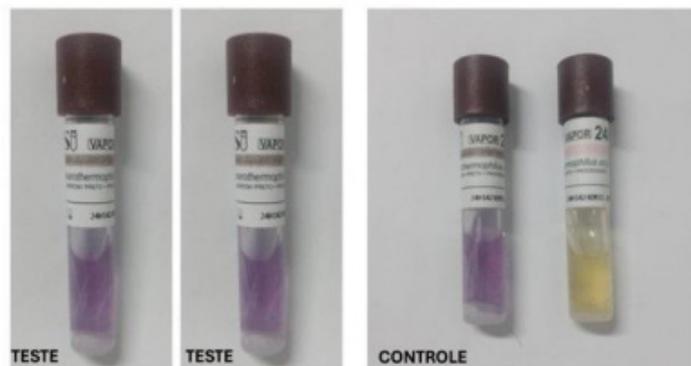


Teste biológico da autoclave

Quanto ao teste biológico da autoclave, o indicador-teste não apresentou crescimento bacteriano após a incubação (sem mudança de cor), indicando que o ciclo de esterilização foi bem-sucedido. Já o indicador-controle (que não passou pela autoclave) mostrou crescimento bacteriano esperado (mudança de cor), confirmando que o teste foi realizado corretamente (Figura 4).

Conclui-se que a autoclave da Instalação de Ciência Animal está funcionando adequadamente e os instrumentos esterilizados estão seguros para uso.

Figura 4. Teste da autoclave com indicador biológico (*Bacillus Stearotherophilus*)



Cultura teste: sem mudança de cor. Observou-se mudança de cor do meio de cultura controle, indicativo de alteração do pH da solução que resulta da atividade microbiana. Fonte: Autores, 2024.

Monitoramento sanitário

Na tabela 1 abaixo, encontram-se os resultados dos exames imunológicos, bacteriológicos, parasitológicos e anatomopatológicos.

Tabela 1. Monitoramento sanitário completo em ratos

A

Ministério da Saúde PROCRUZ Fundação Oswaldo Cruz		ICTB Instituto de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia	
Identificação da Amostra			
Identificação Interna (IDI): 1928/24	Data da Solicitação: 15/05/2024		
Requisitante: Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO)	Responsável pela Requisição: Marcel Vasconcelos		
Animal: Rato	Linhagem: Wistar		
Idade: 42 dias	Sexo: Macho		
Origem: Não informado	Identificação Externa (IDE): Não informado		
Laudo de Exames			
Exames Parasitológicos			
Pesquisa de Endoparasitas			
Presença		Carga Parasitária	Forma Parasitária
	Entamoeba sp.	1 - 100 (Baixa)	Cistos
Metodologia: Método direto da mucosa intestinal			
Laudo de Exames			
Exames Parasitológicos			
Pesquisa de Ectoparasitas			
Ausência			

B

Ministério da Saúde PROCRUZ Fundação Oswaldo Cruz		ICTB Instituto de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia	
Identificação da Amostra			
Identificação Interna (IDI): 1928/24	Data da Solicitação: 15/05/2024		
Requisitante: CENTRO UNIVERSITÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS	Responsável pela Requisição: Marcel Vasconcelos		
Animal: Rato	Linhagem: Wistar		
Idade: 42 DIAS	Sexo: Macho		
Sala/Gaiola: N/A	Identificação externa: n/a		
Amostra: traquéia, fezes			
Laudo de Exames			
Bacteriologia			
Crescimento	Enterococcus faecalis/ Escherichia coli A/C		
Metodologia: Cultura bacteriana e identificação automatizada (Vitek 2)			

C



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biotecnologia

Identificação da Amostra

Identificação Interna (IDI): 1928/24 Requisitante: Centro Universitário Serra dos Órgãos - UNIFESO Animal: Rato Idade: 42 dias Sala/Gaiola: -	Data da Solicitação: 15/05/2024 Responsável pela Requisição: Marcel Vasconcelos Linhagem: Wistar Sexo: Macho Identificação Externa (IDE): 1
--	--

Laudo de Exames

Exames Anatopatológicos

Sem Alterações

Metodologia: NECROPSIA

D



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biotecnologia

Identificação da Amostra

Identificação Interna (IDI): 1928/24 Requisitante: CENTRO UNIVERSITÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS Animal: Rato Idade: 42 dias Sala/Gaiola: -	Data da Solicitação: 15/05/2024 Responsável pela Requisição: Marcel Vasconcelos Linhagem: Wistar Sexo: Macho Localização: -
--	--

Laudo de Exames

Exames Imunológicos

Não Reagente

Metodologia: Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) - Detecção de anticorpos para os patógenos relacionados

Patógenos pesquisados: Adenovirus, Clostridium piliforme- Tyzzer, Virus K (Kilham), Mycoplasma pulmonis, Pneumovirus, Coronavírus (Sialodactriodermite), Parvovirus de ratos, Reovirus tipo 3 (RED 3), Sendai virus, Helicobacter sp. Bacillus associatede aos colitis respiratórios (CARB), Theilovirus de rato, Virus Toxoin-1/1-L, Virus Diminuto de Rato, Hantavirus, Streptobacillus molliformis e Mycoplasma arthritidis.

Fonte: Serviço de Controle de Qualidade Animal (SECQA) da Fiocruz- RJ, 2024.

O monitoramento sanitário completo efetuado pela Fiocruz, efetuou a pesquisa de endoparasitos mediante dois procedimentos, nomeadamente: 1- Método direto para pesquisa de exemplares de parasitos e ovos em amostras de mucosa intestinal, obtidas durante a necropsia. 2- Método direto com fita adesiva para pesquisa de oxiurídeos na região perianal (Método de Graham). O exame direto na mucosa intestinal, encontrou uma carga parasitária baixa (1-100) de cistos de *Entamoeba sp.* (Tabela 1a)

Na pesquisa de ectoparasitas foi utilizado o método da fita adesiva (Método de Graham), no qual consiste no uso de uma fita adesiva (Durex®), colocada ao fundo de um tubo de ensaio com a parte colante voltada para fora. Em seguida, a prega anal do animal é aberta e assim é encostado diversas vezes a parte colante na região perianal. A fita adesiva é então colocada em lâmina e observada em microscópio óptico. A pesquisa não demonstrou a presença de ectoparasitas. (Tabela 1a)

No exame parasitológico de endoparasitas, foi encontrada *Entamoeba sp.*, a qual é a única ameba presente em animais de laboratório, sendo considerada comensal do ceco e cólon dos animais. Sua infecção ocorre por via fecal-oral. Não se tem conhecimento de que possa provocar doença em animais, nem interferência nas pesquisas, no entanto, é um bom indicador das condições higiênico-sanitárias do biotério.⁵

O exame bacteriológico utilizou cultura bacteriana e identificação automatizada (VITEK® 2, BioMérieux Brasil, Rio de Janeiro, BR).

O exame demonstrou a presença de *Enterococcus faecalis*, uma espécie de bactéria enterococos que normalmente vive no trato gastrointestinal de mamíferos e também pode ser encontrada na cavidade oral e trato vaginal.⁵ (Tabela 1b)

Embora *E. faecalis* geralmente não seja prejudicial ao corpo humano e murino, ela pode se tornar um patógeno oportunista – causando doenças quando as defesas imunológicas estão baixas. Por esta razão, *E. faecalis* é considerada um patógeno oportunista. De todas as espécies de enterococos, é a causa mais comum de infecções do trato urinário, e um importante agente causador de sepse.^{6,7,8}

Ainda no exame bacteriológico foi observada a presença de *Escherichia coli*. (Tabela 1b)

Vale lembrar, que *E. coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa que se encontra normalmente no trato gastrointestinal inferior dos mamíferos. As estirpes inofensivas de *E. coli* constituem parte da microbiota intestinal humana normal, e podem ser benéficas para os seus hospedeiros ao produzirem vitamina K2, e impedirem que ali se estabeleçam bactérias patogênicas.⁹ *E. coli* e as bactérias relacionadas constituem cerca de 0,1% da microbiota intestinal, e a transmissão fecal-oral é a principal via utilizada pelas cepas patogênicas que causam doenças.¹⁰

O exame imunológico para detecção de vírus murinos, utilizou o Ensaio imunoenzimático indireto ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), sendo “não reagente” para os seguintes patógenos: Adenovírus, *Clostridium piliformis*– Tyzzer, Vírus K (Kilham), *Mycoplasma pulmonis*, Pneumovírus, Coronavírus (Sialodacrioadenite), Parvovírus de ratos, Reovirus tipo 3 (REO 3), Sendai vírus, *Helicobacter sp.*, Bacillus associados aos cílios respiratórios (CARB), Theilovírus de rato, Vírus Toolan’s H-1, Vírus Diminuto de Rato, Hantavírus, *Streptobacillus moliniformis* e *Mycoplasma arthritis*. (Tabela 1d)

O exame anatomopatológico realizado por ocasião da necropsia, não evidenciou nenhum achado digna de nota. (Tabela 1c)

Ao final do estudo, discentes da Iniciação Científica do Curso de Graduação em Biomedicina elaboraram o seguinte Procedimento Operacional Padrão (POP) (Tabela 2).

Tabela 2. Procedimento Operacional Padrão

POP N.º: 11	Versão: 1
OBJETIVO	
Implantar um programa de monitoramento sanitário regular e periódico da colônia tendo por objetivo identificar patógenos prejudiciais aos animais e com potencial zoonótico.	
DESCRIÇÃO	
O monitoramento sanitário visa o uso de animal “sentinela”. O uso de animal sentinela compreende sua exposição diária à uma parte da cama utilizada por cada gaiola do biotério. Desse modo, uma grande parte dos patógenos presentes na colônia, será transmitida ao animal. Em seguida, o mesmo será encaminhado ao Serviço de Controle de Qualidade Animal (SCQA) da FIOCRUZ, onde serão realizados exames imunológicos, bacteriológicos parasitológicos e anatomopatológicos.	
MATERIAIS UTILIZADOS	
01 caixa de polipropileno autoclavável (41x33,5x18 cm), com bebedouro e grade.	
OBSERVAÇÕES	
O presente POP preconiza a vigilância laboratorial regular e periódica a cada 12 meses.	

Fonte: Autores, 2024.

Como limitação do estudo, cita-se a ausência de controle microbiológico do macroambiente quanto à formação de bioaerossóis. Este controle verifica se os mecanismos de desinfecção e limpeza do sistema de ventilação se encontram eficientes.

CONCLUSÕES

A implantação de um programa de monitoramento sanitário periódico representa um passo importante para a melhoria da qualidade dos animais produzidos no UNIFESO.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver quaisquer conflitos de interesses.

AGRADECIMENTOS

Ao Serviço de Controle da Qualidade Animal – SCQA do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e sua responsável Prof.^a Dr.^a Márcia Soraya Carreteiro de Oliveira.

REFERÊNCIAS

1. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books: <http://books.scielo.org>
2. Paiva VLG da S. Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2015. doi:10.11606/D.10.2016.tde-23032016-164918.
3. Mäller M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, et al. FELASA Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 2014;48(3):178-92. doi: 10.1177/0023677213516312.
4. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Saúde. Manual de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Tecnologia em Serviços de Saúde. Brasília, 2006. 185 p
5. Neves DP. Parasitologia humana. São Paulo; Ed. Atheneu; 13^a ed.; 2016. 428 p. Disponível em: https://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer_public/31/76/3176ffaa-16bb-4615-b066-a81a5344d823/neves_-_parasitologia_humana_-_13ed_-_2016.pdf
6. Anderson AC, Jonas D, Huber I, et al. Enterococcus faecalis from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol.* 2016;6(1):1-14. doi:10.3389/fmicb.2015.01534
7. Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype-genotype correlations and distribution of key virulence factors in Enterococcus faecalis isolated from patients with urinary tract infections. *Infect Drug Resist.* 2021;2021(1):1713-1723. doi:10.2147/IDR.S3051673.
8. Olawale AK, David OM, Oluyeye AO Osuntoyinbo RT, Laleye SA, Famurewa O. Histopathological changes induced in an animal model by potentially pathogenic Enterococcus faecalis strains recovered from ready-to-eat food outlets in Osun State, Nigeria. *Infect Drug Resist.* 2015;26; 8:181-7. doi: 10.2147/IDR.S61381
9. Hudault S, Guignot J, Servin AL. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germ-free mice against Salmonella typhimurium infection. *Gut.* 2001;49(1):47-55. doi: 10.1136/gut.49.1.47
10. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308 (5728):1635–8. doi:10.1126/science.1110591

EFEITO DA SUPRESSÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES MASCULINOS DE RATOS WISTAR – RESULTADOS PRELIMINARES

Carina Teixeira Ribeiro¹, Maria Eduarda Monteiro Silva¹, Maria Julia Desouzart de Aquino Viana², Bruna Silveira de Oliveira², Juliana Jesus de Monteiro Alves²

1 - Docente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do UNIFESO; 2 - Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do UNIFESO

RESUMO

Os hormônios tireoidianos controlam o metabolismo orgânico e são essenciais para a função reprodutiva. Os cães têm como principal endocrinopatia o hipotireoidismo e cursam com problemas reprodutivos. Estudar os efeitos da supressão hormonal sobre os órgãos reprodutores masculinos e sobre os parâmetros dos espermatozoides, fornecerá dados importantes sobre distúrbios reprodutivos em animais acometidos por hipotireoidismo. Para a realização deste estudo, os animais serão submetidos à cirurgia de tireoidectomia, utilizando como modelo animal experimental, 20 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), de três meses de idade, distribuídos em 10 animais para o grupo controle e 10 animais para o grupo cirúrgico. Três meses após o procedimento cirúrgico, os animais serão mortos com sobredose anestésica e serão coletados os testículos, próstata, glândula vesicular e pênis para análise histomorfométrica, coleta dos espermatozoides via cauda do epidídimo e coleta de sangue para análise hormonal. Os dados serão tabulados para fins comparativos entre os grupos controle e cirúrgico, usando o teste T de Student e os resultados serão considerados significativos quando $p < 0,05$. São esperados encontrar alterações histomorfométricas, hormonais e de parâmetros dos espermatozoides condizentes com diminuição da função reprodutiva decorrente da supressão dos hormônios T3 e T4.

Palavras-chave: Tireoidectomia; T3 e T4; Função reprodutiva.

INTRODUÇÃO

Os hormônios da tireoide, T3 e T4, estão envolvidos com a regulação do metabolismo corpóreo. Também são responsáveis pelo desenvolvimento, crescimento e funcionamento de muitos órgãos¹. Isto se deve ao fato da maioria das células do organismo expressarem receptores tireoidianos¹. Estudos mostraram que os hormônios tireoidianos têm um papel fundamental na regulação da reprodução, tanto feminina quanto masculina²⁻⁴. No sistema reprodutor masculino há relatos que a supressão destes hormônios, hipotireoidismo, ocasiona diminuição espermatogênica levando a quadros de infertilidade². Em ratos, foram relatados receptores de T3 no epidídimo, local onde ocorre a maturação dos espermatozoides e onde adquirem motilidade⁵.

Buzzard et al., (2000)¹ mostraram que as células de Sertoli expressam receptores de hormônios tireoidianos, e sua ação nelas células está relacionada com a duração da fase proliferativa. As células de Sertoli são as responsáveis por sustentar, nutrir e garantir a passagem de hormônios androgênicos para as células germinativas. Outros estudos mostraram que em neonatos com hipotireoidismo possuíam um período prolongado da proliferação das células de Sertoli e das germinativas, enquanto animais com hipertireoidismo mostravam o efeito inverso, com redução do período de proliferação das mesmas células⁴. No entanto, há estudos que sugerem que em ratos adultos não são responsivos aos hormônios tireoidianos.

Em Medicina Veterinária, a principal endocrinopatia em cães é o hipotireoidismo. Estudar os efeitos que mimetizam a redução dos hormônios tireoidianos, sabendo da sua atuação na reprodução, fornecerá dados importantes sobre distúrbios reprodutivos em animais que sofrem de hipotireoidismo.

JUSTIFICATIVA

O estudo científico dos efeitos da supressão tireoidiana em ratos machos Wistar é indispensável para adquirir informações acerca da fisiopatologia orgânica e metabólica da disfunção endócrina e, em particular, analisar seus impactos no sistema reprodutivo.

O principal enfoque dessa abordagem é obter a compreensão das consequências fisiológicas e metabólicas do déficit hormonal tireoidiano para o manejo assertivo das endocrinopatias e seu tratamento em outras espécies, especialmente em cães machos. O hipotireoidismo é a patologia endócrina mais frequente em cães e é caracterizado pela produção expressivamente reduzida dos parâmetros hormonais da glândula tireóide, relevantes para a regulação do metabolismo, crescimento e desenvolvimento. A semelhança entre os mecanismos fisiológicos da função tireoidiana em ratos e cães machos torna o modelo animal uma ferramenta de pesquisa viável para investigação das bases moleculares e celulares da doença. Estudos preliminares apontam que as desordens tireoidianas podem impactar significativamente a fertilidade e saúde reprodutiva. O estudo pormenorizado desses efeitos em ratos pode fornecer informações críticas sobre como o hipotireoidismo pode prejudicar o sistema reprodutivo canino. A saúde reprodutiva é primordial para a manutenção das populações da espécie e para a viabilidade de programas de reprodução, principalmente em determinadas raças caninas, que podem geneticamente predispor à endocrinopatia. Esta análise, pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias que visam mitigar as problemáticas e melhorar o bem estar de cães afetados pela doença. A manutenção das populações da espécie e para a viabilidade de programas de reprodução, principalmente em determinadas raças caninas, que podem geneticamente predispor à endocrinopatia. Esta análise, pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias que visam mitigar as problemáticas e melhorar o bem estar de cães afetados pela doença.

OBJETIVOS

Objetivo primário

Estudar e analisar os efeitos da supressão dos hormônios tireoidianos sobre os órgãos do sistema reprodutor masculino em modelo animal, utilizando ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).

Objetivos secundários

- Estudar e analisar histologicamente os efeitos da supressão dos hormônios tireoidianos em testículos, próstata, glândula vesicular e pênis;
- Estudar e analisar os efeitos da supressão dos hormônios tireoidianos sobre os parâmetros dos espermatozoides, tais como: motilidade, viabilidade e concentração;
- Estudar e analisar os efeitos da supressão dos hormônios tireoidianos sobre os níveis dos hormônios androgênicos e sobre o nível de cálcio séricos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As patologias endocrinológicas são desequilíbrios hormonais que impactam diretamente na fisiologia corporal. Suas complicações costumam estar relacionadas a distúrbios metabólicos severos e quando não tratadas corretamente são capazes de proporcionar graves pioras ao quadro de saúde do animal (HERRTAGE, 2001).

A glândula tireoide desempenha no metabolismo dos animais, armazenamento e liberação dos hormônios tireoidianos na circulação, sanguínea sendo eles: triiodotironina (T3), responsável pelas ações da tireoide e a tiroxina (T4), um reservatório na circulação sanguínea para conversão em triiodotironina conforme a necessidade metabólica (MARTINS, 2018).

Os hormônios tireoidianos foram designados T3 e T4 conforme a quantidade de átomos de iodo presentes na molécula de hormônio, isto é, a triiodotironina contém três átomos de iodo em sua molécula enquanto a tiroxina contém quatro átomos de iodo. A glândula tireoide secreta o T4 em maiores quantidades, porém, o T3 é considerado mais relevante, pois, por vezes o T4 é transformado em T3 para que seja possível provocar uma ação metabólica nas células-alvo (NUSSEY, 2001).

A produção de T3 e T4 ocorre por meio da tireoglobulina, advinda das células foliculares da glândula tireoide. Os hormônios tireoidianos estimulam a síntese de proteínas, impulsionam a absorção de oxigênio, aumentam a produção de calor, moderam o processo metabólico dos lipídios e intensificam a absorção de carboidratos pelo intestino (REECE, 2006).

Os hormônios tireoidianos são considerados termogênicos visto que conseguem elevar o metabolismo basal, o que proporciona ao animal a possibilidade de aquecer o organismo. Animais submetidos a temperaturas mais baixas demandam maior ingestão calórica em comparação com animais mantidos em ambientes com temperatura superior, isso ocorre em decorrência da acentuada e ágil degradação dos nutrientes, o que provoca uma perda corporal significativa e demonstra como a sintetização dos hormônios tireoidianos amplia com temperaturas baixas, elevando sua taxa metabólica (MULLUR et al., 2014).

A tireoide é uma glândula bilateral presente em todos os vertebrados, localiza-se lateralmente sobre a traqueia, abaixo da laringe. A função da tireoide envolve a concentração de iodo e a síntese, armazenamento e secreção do hormônio tireoide. Os hormônios da tireoide elevam a produção a partir de um estímulo sobre o hipotálamo e a hipófise da diminuição de TRH e TSH na corrente sanguínea (SILVA, 2017).

Em conformidade com o descrito por REECE (2006), a síntese e secreção dos hormônios tireoidianos ocorre via eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de tireotropina (TRH), que incentiva a produção do hormônio tireoestimulante (TSH) secretado pela hipófise anterior, este que, induz a glândula tireoide a sintetizar e secretar os hormônios T3 e T4. Os hormônios tireoidianos contêm um sistema de feedback negativo que sinaliza ao hipotálamo e a hipófise, a necessidade de reduzir a síntese e liberação de TRH e TSH no organismo.

A deficiência de hormônios tireoidianos afeta múltiplos processos metabólicos de todo sistema corporal, os sinais clínicos são variáveis e muitas vezes inespecíficos. A produção deficiente dos hormônios tireoidianos pode levar a anormalidades estruturais ou funcionais da glândula tireoide (DIXON, 2002).

De acordo com BACHLER (2022), o hipotireoidismo é uma disfunção endócrina comum na espécie canina, que se manifesta devido à incapacidade das glândulas tireóides de produzir tiroxina e triiodotironina em níveis adequados. Sendo a disfunção endócrina mais frequente na espécie canina, o hipotireoidismo pode ser congênito ou adquirido; a forma adquirida pode ser classificada em primária ou secundária (NELSON, 2020).

O hipotireoidismo é associado a diversos sinais clínicos como letargia, ganho de peso, hipersensibilidade ao frio, bradicardia, anemia e alterações dermatológicas. (NELSON et al., 2013)

Incidências de alopecia simétrica, hiperqueratose, piodermite superficial e infecções cutâneas são comumente encontrados como manifestações dermatológicas em animais com hipotireoidismo (RAMSEY et al., 1997)

A glândula tireoide produz hormônios com diversas funções fisiológicas, atuam aumentando a transcrição de grande número de genes, estimulando praticamente todas as células do organismo a sintetizar enzimas, proteínas estruturais e transportadoras, entre outras substâncias. Com esse estímulo às células, há o aumento difuso da atividade funcional em todo o organismo do animal (GUYTON & HALL, 2002).

Hormônios tireoidianos são essenciais para o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo de diversos tecidos e órgãos. Estes hormônios possuem importante atividade na função testicular em diversas espécies por meio de receptores, principalmente nas células de Sertoli. Além de alterações morfológicas no testículo, a inóxia destes hormônios pode alterar a fertilidade e o comportamento sexual. (BUZZARD et al., 2000).

Baixos níveis dos hormônios tireoidianos podem interferir na proliferação das células de Sertoli e Leydig, pois exerce ação propriamente no epidídimo e na próstata afetando o desempenho reprodutivo de várias espécies. O hipotireoidismo é uma alteração endócrina caracterizada por baixos níveis séricos dos hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Rocha & Papa, 2012).

O hipotireoidismo, afeta a esteroidogênese e a espermatogênese testicular podendo levar à infertilidade. Podemos ressaltar que de acordo com estudos a produção dos hormônios têm sido relacionadas ao volume do ejaculado, motilidade espermática e morfologia dos testículos de ratos e humanos (NELSON, 2006; MARTINS, 2018).

O procedimento de estimulação do hipotireoidismo nos roedores através da tireoidectomia completa mostrou-se simples, exequível e de custo financeiramente reduzido (CÉSAR-MOREIRA et al., 2020).

No que se refere às principais adversidades associadas à tireoidectomia completa, em ratos (*Rattus norvegicus*) estas podem abranger hemorragias de segmento venoso ou arterial, infecções, seromas e/ou hematomas, hipocalcemia resultante de lesão iatrogênica das glândulas paratireóides e danos bilaterais aos nervos laríngeos frequentes (Waynforth & Flecknell, 1992).

Conforme descrito por Pritchett-Corning et al. (2011), a destreza no manuseio de pequenos instrumentos e a cautela ao manipular os tecidos são vitais para minimização de traumas e melhorar os resultados cirúrgicos em ratos.

Conforme relatado por Anbalagan et al. (2010) ratos maduros com hipotireoidismo transitório induzido durante o desenvolvimento fetal demonstraram queda na motilidade progressiva dos espermatozoides, perda de peso do epidídimo e significativo decréscimo na concentração de receptores nucleares de andrógenos na zona terminal epididimária. Esse impacto na maturação espermática pós-testicular, decorrente da baixa na concentração acessível de andrógenos e na expressão de RA no epidídimo, causou infertilidade.

Conforme os estudos de WAJNER et al. (2007) os hormônios da tireoide exercem uma função significativa no desempenho testicular dos roedores, particularmente na especificação de células de Sertoli e na espermatogênese na fase pré-pubertária (*apud* Holsberger & Cooke, 2005).

Apesar disso, a influência desses hormônios tireoidianos em animais maduros ainda não está esclarecida completamente. (WAJNER et al., 2007).

Encontra-se uma diversificada literatura acerca dos impactos dos parâmetros hormonais tireoidianos na multiplicação, diferenciação e atuação das células de Sertoli. No entanto, sabe-se, em comparativo pouco a respeito da influência do hipotireoidismo e hipertireoidismo neonatal na formação aglomerado de células de Leydig do tipo adulto (TEERDS et al., 1998).

De acordo com HARDY et al. (1993) o hipotireoidismo durante a fase neonatal é relacionado ao desencadeamento de hiperplasia das células de Leydig em ratos maduros. Já relacionado as células de Sertoli, o declínio no parâmetro dos hormônios tireoidianos desencadeia um retardo na passagem da fase proliferativa para a fase amadurecida das células, extensão da fase mitogênica e aumento do grupo adulto dessas células (COOKE et al., 1991).

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações Éticas

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Serra dos Órgãos (CEUA-UNIFESO), protocolado sob o número 2802.2141.011/2024.

Amostra

A pesquisa será desenvolvida a partir da utilização de 20 ratos adultos da raça Wistar, machos, com 3 meses de idade, que serão mantidos no Laboratório de Ciências Animais do Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO, seguindo o ciclo circadiano que consiste em deixar o animal doze horas em total escuridão e doze horas exposto a claridade. Os ratos serão repartidos em dois grupos, o Grupo I (n=10) – animais que passarão pela Tireoidectomia total e o Grupo II (n=10), designado como grupo controle, que será submetido a cirurgia de placebo. Ao início e término da pesquisa serão coletadas amostras sanguíneas dos referentes grupos.

Técnica Cirúrgica

Tireoidectomia

Para auxílio da manipulação, supressão do estresse, maior segurança e analgesia no preparo cirúrgico, será administrada nos 30 minutos antecedentes e 30 minutos após o término da cirurgia uma associação de morfina (2,5mg/Kg) e dipirona (160mg/Kg) via subcutânea. A primeira etapa de indução ocorrerá através do método *open drop*, utilizando na base da câmara de indução anestésica, um infiltrado de 0,5 ml de isoflurano 10 % com equipo de inalatório. Após redução dos reflexos e início do sono artificial, os animais serão pesados e por via intraperitoneal, na região abdominal caudal direita, será administrado como anestésico geral a associação dos fármacos cloridrato de cetamina a 10% (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (10 mg/kg). Em sequência, após realização da tricotomia, assepsia e antisepsia da região infrahióidea com a utilização do

degermante digluconato de clorexidina a 2%, será injetado na área de incisão por via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína a 1%, diluído em 0,5% (0,4ml/kg) (Xie et al., 2022).

A cirurgia ocorrerá a partir da incisão na pele e submucosa da região cervical ventral na linha média do pescoço, será realizada a dissecação dos tecidos circundantes e sutil afastamento dos músculos para que haja exposição da tireoide. Após a exposição, será feita a dissecação da glândula e sua total retirada, finalizando o procedimento através da síntese da ferida cirúrgica com sutura contínua da musculatura em fio vicryl 2.0 e dos tecidos adjacentes e subcutâneo com fio mononylon 3.0 (Xie et al., 2022; Yan Cesar-Moreira et al., 2020).

Cirurgia placebo (Cirurgia Sham)

Consiste na simulação do procedimento cirúrgico, tireoidectomia, sem a remoção da glândula, onde será realizada apenas a manipulação do órgão. O protocolo pré, trans e pós-anestésico será igual ao utilizado no Grupo I (Xie et al., 2022; Yan Cesar-Moreira et al., 2020).

Análises histomorfométricas

Imediatamente após constatada a morte dos animais, serão realizados o exame histopatológico dos testículos, próstata, glândula vesicular e pênis. Os testículos serão clivados na sua porção proximal e fixado por imersão em solução de Bouin por 12 horas. Após este período o órgão será clivado para pós-fixação em formalina 4% (Ribeiro et al., 2018).

Os fragmentos fixados em formalina serão processados para inclusão em parafina e secções de 5µm obtidas em micrótomo. Tais cortes serão corados pela hematoxilina e eosina e fotografados digitalmente em microscópio óptico sob diferentes magnificações para as seguintes análises (Ribeiro et al., 2018).

Diâmetro do túbulo seminífero

Com auxílio do software ImageJ, o diâmetro de 125 túbulos seminíferos será mensurado em cada testículo (5 túbulos em 5 campos de 5 cortes).

Altura do epitélio do túbulo seminífero

Nos mesmos túbulos em que foram medidos o diâmetro dos túbulos, será também medido a altura do epitélio seminífero.

A próstata, glândula vesicular e pênis serão fixados diretamente em formalina a 4%. A próstata e glândula vesicular serão mensuradas a altura no epitélio (Procopio et al., 2023). Já no pênis serão mensurados a altura do epitélio da uretra e a circunferência dos corpos cavernoso e esponjoso (Ribeiro et al., 2019). Também serão analisados com o auxílio do software ImageJ,

Exames laboratoriais

Também será realizada a dosagem sérica hormonal de T3 total e T4 livre, TSH, testosterona e estradiol com kits específicos. Também serão avaliados os parâmetros dos espermatozoides: motilidade e concentração em câmara de Neubauer e a viabilidade através de teste hipoosmótico. Os espermatozoides serão coletados da cauda do epidídimo e submersos em solução salina nutritiva aquecida para análise dos parâmetros supracitados.

Eutanásia

A eutanásia será realizada de acordo com as práticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Os animais envolvidos no presente estudo serão eutanasiados com uma sobredose de propofol de três vezes a dose recomendada dos anestésicos gerais utilizados no procedimento cirúrgico, por via intraperitoneal. Os animais serão submetidos à morte três meses após o procedimento cirúrgico para a coleta das amostras. Após a realização da eutanásia e confirmado o óbito dos animais, suas carcaças serão descartadas em sacos ou caixas hermeticamente fechados.

Análise dos dados

Os resultados obtidos serão tabulados e analisados de acordo com os objetivos propostos pelo estudo. Desta forma, para alcançar o objetivo de estudar a morfometria dos órgãos analisados, da função reprodutiva (mediante análise dos parâmetros dos espermatozoides) e das análises hormonais, serão feitas comparações dos resultados dos grupos submetidos à cirurgia simulada (sham) e dos grupos submetidos à tireodectomia. As médias de cada parâmetro serão comparadas pelo teste t de Student não pareado, não paramétricos. Todas as análises serão realizadas no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os resultados serão expressos como média e desvio padrão.

RESULTADOS ESPERADOS

O estudo ainda não foi iniciado, pois os animais ainda não atingiram a idade para a execução do trabalho. Com este estudo espera-se encontrar alterações na morfometria dos órgãos reprodutores masculinos e dos parâmetros dos espermatozoides, que sejam condizentes com distúrbios reprodutivos decorrentes da supressão hormonal dos hormônios T3 e T4.

REFERÊNCIAS

1. ANBALAGAN, J.; SASHI, A. M.; VENGATESH, G.; STANLEY, J. A.; NEELAMOHAN, R.; ARULDHAS, M. M. Mechanism underlying transient gestational-onset hypothyroidism-induced impairment of post-testicular sperm maturation in adult rats. *Fertility and Sterility*, v. 93, n. 8, p. 2491-2497, 2010.
2. BUZZARD, J. J.; MORRISON, J. R.; O'BRYAN, M. K.; SONG, Q.; WREFORD, N. G. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 3, p. 664-669, 2000.
3. CARANI, C.; ISIDORI, A. M.; GRANATA, A.; CAROSA, E.; MAGGI, M.; LENZI, A.; et al. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo and hyperthyroid patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 90, p. 6472, 2005.
4. CESAR-MOREIRA, Y.; ARAÚJO, D. G.; SILVA, M. E. M.; VASCONCELLOS, M. Avaliação clínica da técnica operatória de tireoidectomia total em ratos da linhagem Wistar. *PUBVET*, v. 14, n.11, p.1-11, Novembro 2020
5. COOKE, P. S.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*, v. 129, p. 237-243, 1991.

6. DE PAUL, A. L.; MUKDSI, J. H.; PELLIZAS, C. G.; MONTESINOS, M.; GUTIERREZ, S.; SUSPERREGUY, S.; et al. Thyroid hormone receptor alpha 1-beta 1 expression in epididymal epithelium from euthyroid and hypothyroid rats. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 129, n. 5, p. 631-642, 2008.
7. DIXON, R. M.; REID, S. W. J.; MOONEY, C. T. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *The Veterinary Record*, n. 145, p. 481-487, 1999.
8. DIXON, R. M.; REID, W. J. Treatment and therapeutic monitoring of canine hypothyroidism. *Journal of Small Animal Practice*, v. 43, p. 334-340, 2002.
9. HARDY, M. P.; KIRBY, R. A.; HESS, R. A.; COOKE, P. S. Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*, v. 132, p. 2417-2420, 1993.
11. HERRTAGE, M. E. Doenças do Sistema Endócrino. Em: Dunn, J. K. et al. *Tratado de Medicina Interna de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca, 2001. p. 531-537.
12. HOLSBERGER, D. R.; COOKE, P. S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and Tissue Research*, v. 322, p. 133-140, 2005.
13. IWEN, K. A.; OELKRUG, R.; BRABANT, G. Effects of thyroid hormones on thermogenesis and energy partitioning. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 60, n. 3, p. R157-R170, 2018.
14. MARTINS, D. J. R.; LEAL, D. R. Hipotireoidismo em cães. *Anais do 14º Simpósio de TCC e 7º Seminário de IC da Faculdade ICESP*, 2018.
15. MULLUR, R.; LIU, Y.-Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 2, p. 355-382, 2014.
16. NELSON, R. W. Distúrbios da glândula tireóide. Em: Couto, G.; Nelson, R. W. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 557-579.
17. NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Small Animal Internal Medicine*. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2013. p. 743-748.
18. NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Small Animal Internal Medicine*. 6. ed. Elsevier, 2020.
19. NELSON, R. W.; COUTO, G. C. Distúrbios da glândula tireóide. Em: Couto, G.; Nelson, R. W. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 557-579.
20. NUSSEY, S.; WHITEHEAD, S. *Endocrinology: an integrated approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001. Capítulo 3, The thyroid gland. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28/>.
21. PANCIERA, D. C.; CHASTIAN, C. B. Afecções hipotireóideas. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 2054-2071.
22. PRITCHETT-CORNING, K. R.; MULDER, G. B.; LUO, Y.; WHITE, W. J. Principles of rodent surgery for the new surgeon. *Journal of Visualized Experiments*, v. 47, p. e2586, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3791/2586>.
23. PROCOPIO, I. M.; RIBEIRO, C. T.; MARCHON, R. G.; COSTA, W. S.; BUYS-GONCALVES, G. F.; SAMPAIO, F. J. B.; et al. Effects of chronic restraint stress in the prostate of prepubertal and adult rats.
24. RAMSEY, I. Diagnosing canine hypothyroidism. *In Practice*, v. 19, n. 7, p. 378-383, 1997.
25. REECE, W. O. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12. ed. Rio de Janeiro, 2006.
26. RIBEIRO, C. T.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B.; PEREIRA-SAMPAIO, M. A.; DE SOUZA, D. B. Evaluation of the effects of chronic stress applied from the prepubertal to the adult stages or only during adulthood on penile morphology in rats. *Stress*, v. 22, n. 2, p. 248-255, 2019.

27. RIBEIRO, C. T.; DE SOUZA, D. B.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B.; PEREIRA-SAMPAIO, M. A. Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats. *Asian Journal of Andrology*, v. 20, n. 4, p. 385-390, 2018.
28. ROCHA, A. S.; PAPA, F. O. Efeitos do hipotireoidismo no sistema reprodutor masculino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 19, n. 3, p. 294-302, setembro 2012.
29. SILVA, T. D. S. E. Hipotireoidismo em cães: relato de caso. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas – BA, 2017.
30. TEERDS, K. J.; DE ROOIJ, D. G.; DE JONG, F. H.; VAN HAASTER, L. H. Development of the adult type Leydig cells cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 344–350, 1998.
31. TRUMMER, H.; RAMSCHAK-SCHWARZER, S.; HAAS, J.; HABERMANN, H.; PUMMER, K.; LEB, G. Thyroid hormones and thyroid antibodies in infertile males. *Fertility and Sterility*, v. 76, n. 2, p. 254-257, 2001.
32. WAJNER, S. M.; WAGNER, M. S.; MELO, R. C.; PARREIRA, G. G.; CHIARINI-GARCIA, H.; BIANCO, A. C.; et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in germ cells of adult rat testis. *Journal of Endocrinology*, v. 194, p. 47-54, 2007.
33. WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. Thyroidectomy (thyroparathyroidectomy). Em: Jones, W. J. (Ed.). *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press, Inc., 1992. p. 310–312.
34. XIE, L. J.; YOU, Q.; ZHOU, S. Z.; WU, F.; HAI, R.; ZHOU, X. Y. Hypothyroidism modeling in Wistar rats: Comparison of two surgical methods. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 173, n. 6, p. 794-800, 2022.

UTILIZAÇÃO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) PROCESSADA EM GLUTARALDEÍDO 0,5% OU CLOREXIDINA 2% EM HERNIOPLASTIA ABDOMINAL DE *RATTUS NOVERGICUS*

Síria da Fonseca Jorge¹, Pedro Henrique Perrotti dos Santos², Luiza Lobo Caitano²,
Maria Júlia Ribeiro de Oliveira², Juliana de Jesus Monteiro Alves², Júlia de Oliveira Araújo²,
Carolina Seabra da Costa³, Marcelo Abidu Figueiredo⁴

1 - Docente, Medicina veterinária UNIFESO; 2 - Discente, Medicina Veterinária UNIFESO; 3 - Médica Veterinária Autônoma; 4 - Docente, Medicina Veterinária UFRRJ.

RESUMO

A perda tecidual em animais é algo rotineiro na Medicina Veterinária, podendo ser ocasionada por defeitos congênitos, herniações, traumas ou de cirurgias oncológicas. Sendo assim, torna-se necessária a implementação de técnicas que busquem a correção tecidual. As hérnias são caracterizadas pela má formação ou pelo enfraquecimento das camadas de tecido em uma cavidade corpórea, levando assim a protusão total ou parcial de um ou mais órgãos através da mesma. As hernioplastias, embora realizadas frequentemente, ainda possuem altos índices de complicações, impelindo assim o desenvolvimento de novos biomateriais e técnicas. A pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um biomaterial futuroso que segundo estudos, possui as características necessárias para a utilização como material alternativo em correções teciduais. Este trabalho tem como propósito testar o uso da pele da tilápia do Nilo, conservada em glicerina 98%, como um biomaterial para hernioplastia de parede abdominal de ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar. Serão utilizados 21 ratos separados aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com o material utilizado para realização da hernioplastia. Serão testados dois meios de esterilização, um grupo de 10 animais receberão a prótese tratada com glutaraldeído 0,5% (grupo G) e outro grupo de 10 animais receberá a prótese tratada com clorexidina 2% (grupo C) e ambas sendo conservadas em glicerina. Os animais serão avaliados através de análise clínica, termográfica, macroscópica *pós-mortem*. Até o presente momento, já foram confeccionadas as peles tanto em clorexidina quanto em glutaraldeído e já foi implantada a pele preparada com Clorexidina em 5 animais do grupo que foi eutanasiado com 7 dias de pós-operatório. A pele de tilápia processada em clorexidina demonstrou resultados satisfatórios após implantação não apresentando alterações clínicas em até 7 dias de pós-cirúrgico.

Palavras-chave: Glutaraldeído; Clorexidina; Malhas cirúrgicas biológicas; Hérnias abdominais; Cirurgia veterinária.

INTRODUÇÃO

As hérnias abdominais representam uma das principais condições médicas que frequentemente requerem intervenção cirúrgica, e nos últimos anos a busca por materiais biológicos que possam substituir as telas sintéticas tradicionalmente utilizadas no reparo de hérnias veio crescendo. Nesse contexto, a pele de Tilápia do Nilo tem surgido como uma alternativa promissora devido às suas propriedades absorvíveis e elevada proporção de fibras de colágeno, possibilitando assim a infiltração celular, estugando o processo cicatricial.

A reparação cirúrgica das hérnias frequentemente envolve o uso de telas sintéticas para reforçar a parede abdominal enfraquecida, reduzindo assim a taxa de recorrência, sendo a tela de polipropileno a mais utilizada. No entanto, o uso desses materiais sintéticos pode estar associado a complicações, como erosão de órgãos intra-abdominais, sepse, volvo, fistulas enterocutâneas e aderências que podem ocasionar obstrução intestinal. Além disso, outro fator importante a ser considerado é o alto custo monetário das telas de polipropileno, se tornando um obstáculo, principalmente na medicina veterinária.

A busca por alternativas naturais e compatíveis levou à investigação de diversos biomateriais derivados de fontes animais e vegetais. A pele de Tilápia do Nilo, um subproduto da indústria de processamento de peixe, apresenta características que a tornam atraente para aplicações biomédicas.

A eficácia das malhas cirúrgicas tem sido extensivamente estudada com o objetivo de desenvolver próteses ideais que minimizem os efeitos cicatriciais adversos, sejam biocompatíveis, reduzam a formação de aderências peritoneais, possuam textura e flexibilidade adequadas, além de alta resistência. Esses dispositivos visam proteger as vísceras e promover a mobilidade natural do abdome. As malhas de origem biológica requerem técnicas de processamento específicas para preservar ou melhorar suas propriedades, além de garantir uma esterilização eficaz para evitar riscos de infecção durante procedimentos cirúrgicos.

A clorexidina se destaca por seu forte potencial antimicrobiano e suas propriedades antissépticas notáveis, além de apresentar baixa toxicidade local ou sistêmica quando utilizada em concentrações de até 2%, já a glicerina 98% é frequentemente empregada para a preservação e esterilização de biomateriais orgânicos, destacando-se sua utilidade na conservação de membranas biológicas de diferentes espécies e o glutaraldeído é um agente bactericida amplamente empregado para desinfecção de membranas biológicas desde a década de 1960, devido à sua disponibilidade, custo e histórico em estudos científicos. Até hoje, é continuamente utilizado e pesquisado como um método de pré-conservação para xenoinxertos, graças à sua eficácia na estabilização celular.

A pele de tilápia pode ser uma alternativa economicamente viável em comparação com outras opções disponíveis no mercado. A tilápia é uma espécie de peixe amplamente criada em várias partes do mundo, o que contribui para uma oferta consistente e potencialmente acessível desse biomaterial, no entanto, sua pele continua sendo um subproduto no contexto do processamento comercial, sendo considerado material de descarte.

Essas considerações ressaltam a importância de buscar biomateriais que atendam os requisitos clínicos, mecânicos e econômicos fundamentais para o uso na rotina cirúrgica da Medicina Veterinária. Encontrar materiais que possam ser eficazes e ao mesmo tempo viáveis economicamente é crucial para melhorar os resultados dos procedimentos veterinários e garantir o bem-estar dos animais atendidos.

JUSTIFICATIVA

A Tilápia do Nilo é uma espécie de amplo consumo mundial, com sua criação comercial disseminada por todo território brasileiro, e a sua pele ainda sendo um produto de descarte no processamento comercial, a acessibilidade ao xenoinxertos proposto neste experimento é vasta. Enquadrada a realidade deste estudo, com criação acadêmica para disciplinas de biotecnologia do pescado através do Curso de Medicina Veterinária do UNIFESO, as peles antigamente descartadas após o abate são destinadas ao estudo desta linha de pesquisa.

Conjunto a fácil acessibilidade, os materiais de preparo são de baixo custo, tornando a confecção dos implantes cirúrgicos também financeiramente acessíveis. Frente as diversas vantagens demonstradas nos estudos atuais utilizando a pele de tilápia do Nilo como enxerto em tratamento para queimaduras ou implantes cirúrgicos, é notória a importância do teste em animais de experimentação antecedendo a aplicabilidade clínica.

Este estudo se justifica pela grande demanda de correções de hérnias na rotina cirúrgica, a inacessibilidade a implantes modernos na medicina veterinária, a dificuldade de aceitação do organismo frente a implantes sintéticos, ainda considerando pacientes de difícil repouso e as vantagens dos implantes de origem biológica em quadros cirúrgicos de hernioplastia na medicina veterinária.

OBJETIVOS

Objetivo primário

O presente estudo tem como principal objetivo testar a pele de Tilápia do Nilo, sob diferentes métodos de esterilização (clorexidina 2% e glutaraldeído 0,5%), como implante cirúrgico biológico em hernioplastias de parede abdominal em *Rattus norvegicus*.

Objetivos secundários

- Avaliar clinicamente os animais quanto a movimentação corpórea e abdominal, locomoção, assim como reações de tipo corpo estranho e infecções, nos períodos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15 e 30 dias pós-operatório.
- Avaliar o processo inflamatório e tamanho dos implantes por de termografia infravermelha nos períodos pós-operatórios 0, 3, 7, 15 e 30 dias.
- Avaliar morfológicamente fragmentos de parede abdominal, contendo interface implante-hospedeiro, nos períodos pós-operatórios de eutanásia pré-estabelecidos 7 e 30 dias.
- Avaliar as características físicas da pele de Tilápia do Nilo sob os dois diferentes métodos de esterilização propostos, como maleabilidade e resistência à tração ou passagem da agulha de sutura.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As hérnias abdominais abrangem uma das mais importantes patologias que requerem tratamento cirúrgico da rotina médica (RICCIARDI et al., 2012; EVERLING et al., 2020). A técnica cirúrgica para correções herniárias varia conforme a proporção do defeito (SMEAK, 2018).

A estratégia do cirurgião quanto a melhor técnica e material de implantação se correlaciona ao sucesso do procedimento (TANG; EATON, 1995). À vista disso, a busca pela diminuição das reações pós-operatórias em procedimentos de hernioplastias ainda é um desafio para a cirurgia moderna (UTRABO, 2021).

Vários métodos de reparação dos defeitos herniários podem ser utilizados. A tela de polipropileno é o implante de maior usabilidade em cirurgias herniárias, contudo, também pode demonstrar complicações, como erosão de órgãos intra-abdominais, sepse, volvo e fístulas enterocutâneas e aderências que podem ocasionar obstrução intestinal. (KISTI et al, 2012).

As malhas cirúrgicas biológicas são geralmente oriundas de tecidos de cadáveres ou animais, processados para descontaminação, conservação e posteriormente implantação (MONTGOMERY, 2013). O elevado percentual de colágeno presente na matriz extracelular de diferentes espécies proporciona uma menor reatividade

aos implantes biológicos, assim como resistência e tração. A relação destas fibras de colágeno ao processo cicatricial dos animais mamíferos estabelece um vínculo de similaridade celular, possibilitando menores efeitos cicatriciais, e podendo vir a se assentar como um arcabouço colagenoso estimulante para as células do organismo do próprio paciente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MONTGOMERY, 2013).

A utilização de malhas cirúrgicas tem sido exaustivamente testada com a finalidade de conseguir uma prótese ideal, apresentando poucos efeitos cicatriciais, biocompatibilidade, menor ou nenhuma formação de aderências peritoneais, textura e flexibilidade compatíveis e elevada resistência. Viabilizando proteção as vísceras e uma normal movimentação do abdome (BELLÓN, 2014; LIU et al., 2011; JORGE et al., 2023).

O emprego de materiais biológicos como a pele de peixes e anfíbios tem tido um amplo crescimento na área da medicina regenerativa (JORGE, 2016; LIMA-JÚNIOR et al., 2017; MOURA, 2019; SOUSA-FILHO, 2019; COSTA, 2021; COUTINHO, 2021; RABELLO, 2022; NEVES, 2023; JORGE et al., 2023; COSTA et al., 2024). Por sua propriedade absorvível e elevada proporção de fibras de colágeno, a pele de diversos peixes possibilita a infiltração celular, estugando o processo cicatricial (ELANGO, 2017).

A clorexidina é um composto com significativo potencial antimicrobiano e elevado poder antisséptico, principalmente pela alta afinidade entre a substância e o tecido cutâneo, e a baixa toxicidade local ou sistêmica em concentrações até 2% (ALMEIDA; DUQUE; MARION, 2014).

O glutaraldeído é um agente desinfetante bactericida, utilizado no processamento de membranas biológicas desde a década de 1960 por sua acessibilidade, custo, e presença em diversas pesquisas (BAUCIA et al., 2006).

Com o desenvolvimento de pesquisas, este meio continua sendo utilizado e testado como tratamento pré-conservação de xenoinxertos, por sua capacidade de estabilização celular (COSTA, ANDRADE; SILVA 206; VIVAS et al., 2021; COSTA et al., 2024).

A glicerina 98% é amplamente utilizada como meio de conservação e esterilização, principalmente de biomateriais orgânicos, cita-se sua aplicabilidade para a conservação de membranas biológicas proveniente de diversas espécies (ALVARENGA, 1992).

A pele de Tilápia do Nilo apresenta destaque na medicina regenerativa como curativo ou implante biológico, tendo suas características promissoras evidenciadas na atual literatura, principalmente no tratamento de queimaduras, mas também é observada sua usualidade como implante cirúrgico em procedimentos de neovaginoplastia (JORGE et al., 2021; STONE et al., 2021; TORRES et al., 2022).

A aplicabilidade do omento extraperitoneal é observada com resultados experimentais promissores na oclusão de feridas sem anastomose em gatos, mantendo sua viabilidade e com influência positiva no processo de reparo, sem sinais deletérios ao processo de cicatrização, com maior resistência da ferida por ausência de espaço morto subcutâneo (TEIXEIRA et al., 2020). Assim como, em estudo macro e microscópico do omento maior e sua funcionalidade, em ratos, a indicação principal de sua aplicabilidade extraperitoneal está como estrutura carreadora de vascularização, com aplicabilidade positiva no tratamento e áreas isquêmicas e no desenvolvimento de novos órgãos (CLARO JUNIOR et al., 2014). A utilização do omento como enxerto livre autólogo é pouco relatada e ainda necessita estudos mais profundos, porém seus resultados experimentais demonstram resultados promissores (MOTTA; LUNARDI 2023).

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto estima a utilização de quarenta e dois animais, previamente divididos em dois períodos de execução. Neste primeiro período (2024/2025) serão avaliados os primeiros 21 animais, com os dias 7 e 30 pós-operatórios de período final do experimento, onde serão analisados os processos inflamatórios agudo e crônico, com um roedor correspondendo ao controle, com implante de tela sintética de polipropileno. No

segundo período (2025/2026) de pesquisa acontecerá o estudo de mais 21 animais, com avaliação nos períodos de 15 e 90 dias de pós-operatórios dos processos inflamatórios intermediário, agudo/crônico e a incorporação total do implante.

Considerações éticas

Este experimento está sendo conduzido de acordo com as diretrizes ARRIVE (LANCOME, 2017). Foi submetido a Comissão de Ética do Uso de Animais de Experimentação (CEUA/UNIFESO) do Centro Universitário Serra dos Órgãos-UNIFESO, e aprovado sob registro nº564/2023. Os animais deste estudo são provenientes e permanecerão alojados na Instalação de Ciência do UNIFESO. Em caixas de polipropileno (43 cm x 23 cm x 16 cm) forradas de maravalha autoclavada e enriquecidas com brinquedos, sob condições de ciclo circadiano, temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, umidade relativa do ar entre 45% e 60% e exaustão de ar de 10 – 15 trocas de ar/hora, tendo total acesso a ração comercial Nuvilab® alimento completo (Fabricante: Quimtia) e água potável ad libitum, trocadas a cada 24 horas.

Divisão dos grupos

Neste trabalho serão utilizados 21 ratos, variedade Wistar, machos, jovens, com peso aproximado de 350 ± 50 gr. Estes serão divididos em dois grupos de 10 animais, determinados conforme o agente utilizado no processamento dos implantes de pele de Tilápia, sendo um grupo com implantes tratados com Clorexidina 2% (Grupo C), e um segundo grupo com implantes tratados com Glutaraldeído 2% (Grupo G). Estes grupos de animais ainda serão subdivididos, em mais quatro grupos de cinco animais, determinados conforme o período pós-operatório de eutanásia, em 7 e 30 dias. O animal restante será parte do grupo controle, que receberá implante de prótese sintética de polipropileno.

Preparação das peles e confecção dos implantes

As peles de Tilápia do Nilo foram oriundas do tanque escavado do campus Quinta do Paraíso, da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO. Os peixes foram transportados ao Laboratório da POA (Produtos de Origem Animal), do mesmo curso, no mesmo campus, imersos em gelo, imediatamente após despesca, em trajeto de cinco minutos.

Após dessensibilizados, os peixes foram abatidos para consumo de carne, sendo este processo realizado conforme as normativas legais vigentes, e realizada através da disciplina de Produção Animal 2 no curso de Medicina veterinária do UNIFESO, onde as peles seriam descartadas após processamento para consumo dos peixes, e foram então obtidas por doação para realização desta pesquisa.

A partir, os fragmentos de pele foram divididos em dois grupos e seguiram para processamento. O primeiro grupo de peles de Tilapia foram imersas em solução comercializada de Clorexidina degermante 2%, por 60 minutos, seguidas de lavagem abundante com NaCl 0,9% estéril (JORGE, 2016; JORGE et al., 2021).

O segundo grupo de peles de Tilápia seguiu para imersão em Glutaraldeído 0,5%. O agente em questão foi adquirido na concentração de 2%, e diluído com água destilada proporcionalmente até concentração desejada, também tamponada com PBS (pH 7.4) (NOVAES, 2015; COSTA et al., 2024). Então, os fragmentos de pele de tilápia foram imersos na solução de Glutaraldeído 0,5% por 18 dias, seguindo posteriormente para lavagem com NaCl 0,9% estéril e processo de conservação (GOISSIS, 1999; NOVAES, 2015; COSTA, ANDRADE, SILVA 2016; NEVES, 2023; COSTA et al., 2024).

Após o processo de desinfecção, as peles foram processadas de forma idêntica, sendo encaminhadas para conservação em recipiente de vidro vedável e autoclavado contendo solução comercial de Glicerina 98%, em quantidade suficiente a imergir os implantes, permanecendo sob conservação por um período mínimo de 30 dias (PIGOSSI et al., 1971; JORGE et al., 2021).

No momento de sua utilização foi necessário a reidratação destes implantes por imersão em NaCl 0,9%, por período mínimo de 20 minutos (JORGE, 2016; JORGE et al., 2021).

Procedimento cirúrgico

Técnica anestésica

A técnica anestésica foi realizada evitando o estresse dos animais. Com contenção química individual em câmara anestésica, com Isoflurano [Isoforine[®]] e Oxigênio 100%, em seguida, administração de Cetamina (75mg/kg) [Cetamin[®] 10%] e Xilazina (8mg/Kg) [Xilazin[®] 2%], via intraperitoneal (FLECKNELL; THOMAS, 2017).

A manutenção anestésica foi realizada através de máscara facial, em circuito Baraka neonatal, com mesmos gases em vaporizador universal, conforme parâmetros trans anestésicos. Durante o trans anestésico os animais e o ambiente foram submetidos a controle térmico, a fim de reduzir a hipotermia ocasionada pelo procedimento anestésico e cirúrgico (SARTORI; MELLO, 2018). A analgesia foi realizada com a administração de Cloridrato de Tramadol (12,5 mg/Kg) [Cloridrato de Tramadol[®] 50mg/ml], via subcutânea, em pós-operatório imediato e durante os cinco dias seguintes, a cada 24 horas. A dor foi avaliada em escala Grimace, para resgate analgésico se necessário. Foi realizada contenção química para as capturas termográficas, com câmara anestésica, seguida de máscara facial, com Isoflurano e O₂ (FLECKNELL; THOMAS, 2017).

Técnica Cirúrgica

A técnica cirúrgica se descreve conforme Jorge (2016), Jorge e colaboradores (2021) e Costa e colaboradores (2024) por incisão xifo-pubiana de pele na linha média com conseguinte dissecação de tecido subcutâneo, posicionamento de dois reparos em pele na região abdominal direita, seguindo da criação de uma falha em toda a espessura da parede abdominal direita, incluindo aponeuroses musculares, músculos e peritônio de 1,5 cm no eixo transversal por 3,0 cm no eixo longitudinal. Durante a exposição visceral, foi retirado pequeno fragmento de omento maior, de aproximadamente 1 cm, para posterior utilização em espaço subcutâneo. A partir, o respectivo implante foi posicionado sobre a ferida, de acordo com o grupo em questão, e fixado em suas bordas conjunto a musculatura através de sutura contínua simples, interrompida em cada bordo da ferida, com fio de Nylon 4.0 [PROCARE[®]], a partir, foi realizado o posicionamento do fragmento de omento acima do implante, ocupando região subcutânea (TEIXEIRA et al., 2020), e por fim a síntese de pele ocorreu com pontos em padrão “Wolf”, em fio Nylon 4.0 [PROCARE[®]].

Pós-operatório

Os animais receberam antibioticoterapia com Enrofloxacina durante 7 dias na dose de 100mg para cada litro de água ingerido (VIANA, 2007, JORGE, 2016; JORGE et al, 2021; JORGE et al, 2023).

Coleta de dados pós-operatórios

Análise Clínica

As análises clínicas aconteceram conforme descrito em Jorge (2016), Jorge e colaboradores (2021) e Jorge e colaboradores (2023), diariamente até o dia 7 de pós-operatório, posteriormente nos dias 15 e 30, objetivando avaliar processos inflamatórios agudo e crônico. Primeiramente, os animais foram pesados para posterior análise ponderal. Em seguida, a avaliação clínica consistiu no exame da região abdominal quanto a presença de edemas, seromas, infecções, hematomas, abscessos, fistulas, deiscência de sutura e necroses, caso ocorrentes estas alterações foram mensuradas em escores de gravidade, sendo: ausente; leve (+); moderado (++); grave (+++); muito grave (++++). Os animais também foram observados quanto ao comportamento e mobilidade.

Análise Termográfica

A análise termográfica ocorreu com a captura das imagens nos dias dos procedimentos cirúrgicos (dia 0) e nos dias 3, 7, 15, 30 de pós-operatório. A análise termográfica foi realizada primeiramente com a captura das imagens termográficas através de um termógrafo, da marca Flir®, modelo T420, Danderyd Suécia, resolução 320 x 240, com sensibilidade terminal de 0.045 °C e emissividade 0.99 a temperatura e umidade ambiental. Para realização da captura destas imagens os animais foram rapidamente sedados com Isoflurano e oxigênio (FLECKNELL; THOMAS, 2017). Após sedados e em decúbito dorsal, foi realizada a tricotomia completa da região abdominal, e a captura da imagem termográfica, a cerca de 1 metro dos ratos (JORGE, 2016, JORGE et al., 2021).

A análise termográfica será realizada a partir do tratamento das imagens capturadas, no aplicativo Flir Tools®. Através deste processamento objetiva-se a mensuração e comparação as temperaturas cutâneas do lado abdominal direito (com o implante de Tilápia) e esquerdo (considerado região controle). Através da criação de duas elipses, medindo 0,001m² de área, posicionadas uma na região direita e outra na região esquerda do abdômen, paralelas entre si (SOUSA FILHO, 2019; COSTA, 2021; JORGE et al, 2021, COSTA et al., 2024). O aplicativo então, fornecerá a média de temperatura presente em cada uma destas elipses, que quando enquadradas, por lado abdominal, conjunto as temperaturas dos demais roedores, pode vir a proporcionar a temperatura média cutânea de cada uma das regiões abdominais, direita (com implante), e esquerda (controle), por período pós-operatório, a partir, também, a variação e a diferença destas temperaturas, por período pós-operatório.

Análise macroscópica

Esta etapa avaliativa acontece após a eutanásia dos animais, realizada nos períodos pós-operatórios de 7 e 30 dias de pós-operatório, e seguindo as preconizações da Resolução Normativa n° 37 do CONCEA, item 9.1.2.3 de 27 de julho de 2017, promulgada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, cuja atribuição lhe foi conferida pelo art. 5 da Lei n° 11.794, de 8 de Outubro de 2008. O procedimento será iniciado com a contenção química dos animais em caixa de acrílico, semelhante ao realizado nos procedimentos anestésicos, com Isoflurano e Oxigênio, após sedados profundamente será realizada a administração intraperitoneal da sobredosagem da associação de Cetamina (100mg/kg) e Xilazina (40mg/kg). Os animais, então, foram submetidos a uma necropsia, através de grande incisão em forma de “U” (crânio/caudal), compreendendo as margens laterais das regiões direita e esquerda abdominal, se unindo através de uma incisão transversa em extremidade caudal do abdômen, incluindo pele, tecido subcutâneo e musculatura, possibilitando, a observa-

ção da musculatura abdominal completa com implante, e as vísceras abdominais e aderências formadas, sem alterações no posicionamento anatômico (JORGE, 2016; JORGE et al, 2021, COSTA et al., 2024).

Com isso, foi observada a presença da formação de aderências, os órgãos envolvidos e a taxa de adesão, formulando uma escala gravitacional, sendo (JORGE, 2016, COSTA et al., 2024): Grau 0 ou ausente – ausência de aderências; Grau 1 ou leve (+) – número de aderências menor ou igual a 3, de caráter fibrinoso, que se desfazem facilmente através de manipulação; Grau 2 ou moderado (++) – número de aderências maior que 3, de caráter firmes e/ou resistentes a manipulação, entre alças intestinais, sem envolver parede abdominal; Grau 3 ou grave (+++) – aderências firmes, resistentes a manipulação, envolvendo parede abdominal e órgão ou estrutura; Grau 4 ou muito grave (++++) – aderências firmes, resistentes a manipulação, entre alças intestinais e parede abdominal, com ocorrência de fistula entérica;

Análise estatística dos dados

Será realizada, a partir da normalidade dos dados, a comparação do peso dos animais ao dia do procedimento cirúrgico e ao dia da eutanásia, por grupos através do teste “t” de Student pareado. Haverá a verificação se houve diferença entre as medidas de escores de processo inflamatório, deiscência de sutura e presença e grau de aderências aplicando o Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre grupos (C e G), relativos aos períodos pós-operatório estabelecidos nas análises. Quando encontrada diferença significativa entre os grupos com o teste anterior, será aplicado o Teste Mann-Whitney entre os dois grupos, considerando o mesmo período pós-operatório estudado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo ainda se encontra em andamento, sendo realizado o preparo e confecção dos implantes de ambos os grupos, tendo estes atingido 30 dias em conservação, conforme preconizado na metodologia. Os materiais necessários para os procedimentos foram adquiridos, assim como o levantamento bibliográfico e a familiarização dos estudantes com a pesquisa. Até o presente momento foram realizados procedimentos cirúrgicos em cinco animais, estes correspondentes ao Grupo C, com eutanásia aos 7 dias. Assim como, seus dados de análises pós-operatórias foram colhidos e as imagens termográficas capturadas, estas ainda em processamento. Os demais dados colhidos neste estudo, como as análises clínicas e macroscópicas serão previamente expostos, apesar de ainda em processamento e refinamento individual e, com o avançar da pesquisa, em correlação aos demais grupos.

O aspecto visual dos implantes de pele de tilápia tratados tanto em glutaraldeído quanto em clorexidina, e de seus respectivos meios de conservação se encontram dentro da normalidade, com coloração habitual ao processamento e conservação, com as peles em estado translucido de desidratação, com líquido conservante sem presença de fragmentos, com coloração normal e odor característico. O bom aspecto visual é comparado aos demais estudos realizados em mesma linha de pesquisa, diferindo no processamento e composição do material biológico, assim como com suas descrições observadas em Jorge e colaboradores (2021) e Costa (2021).

Os resultados preliminares correspondentes ao Grupo C 7 dias demonstram-se promissores, não sendo observadas reações exacerbadas aos dias seguintes a cirurgia, com alterações clínicas brandas e poucas formações de aderências.

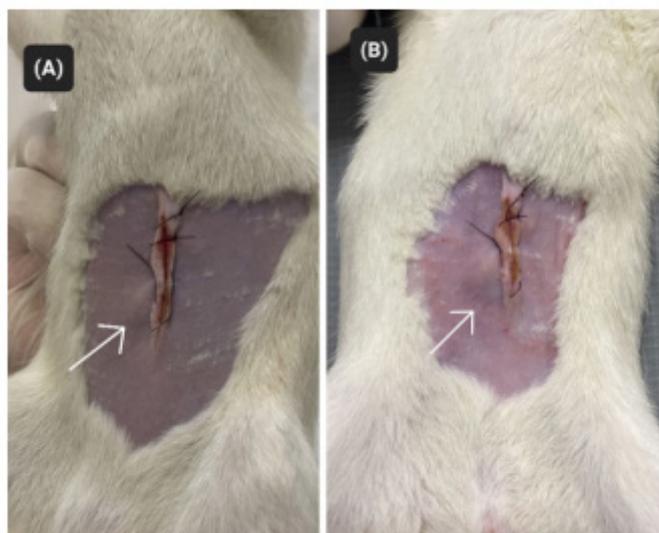
Aos dias seguintes ao experimento, em análise clínica, os animais foram avaliados rápida e visualmente quanto a mobilidade e comportamento, assim como observados em região abdominal, onde não foram observadas presença de seroma, hematoma, abscessos, infecções, fistulas ou necroses. Em contraponto ao observado em Jorge e colaboradores (2021), onde com implante de mesma composição, pele de tilápia, em processamen-

to com clorexidina e glicerina foram observadas presença de edema em 33% dos animais, seroma em 25% e abscesso em 8%, de um total de 12 animais. Neves e colaboradores (2023) observaram edema e abaulamento abdominal secundário a recidiva herniária em todos os animais que receberam implantes de pele de truta com processamento em clorexidina e glicerina.

Neste estudo foi observado edema em grau leve em dois roedores ao dia 1 (rato 4 e 5), permanecendo ao dia 2 e tendo melhora com ausência aos demais períodos pós-operatórios, assim como os demais roedores não apresentaram alteração clínica em pós-operatório, concluindo a presença de edema como única alteração observada em 40% dos animais, ou dois dos cinco ratos operados. Este edema foi observado em região correspondente ao omento (Figura 1). Teixeira e colaboradores (2020) relatam fato importante como alteração pós-operatória o edema em até 72 horas após o procedimento de implante de omento como enxerto autólogo livre em espaço subcutâneo em gatos, sendo considerado pelos autores tal edema como “omento ativado”, quando supostamente esta cria suas aderências e libera fatores de crescimento endotelial.

É de importância ressaltar que em demais estudos onde não houve emprego de omento em região subcutânea diretamente acima do implante, foram observadas alterações clínicas com maior exorbitância até o sétimo dia, como formação de grande quantidade de seroma em Jorge e colaboradores (2021), onde relata-se drenagem de até 2,5 mL, o que pode vir a estar correlacionado a ausência de espaço morto com a aplicação de omento, e as suas propriedades celulares, como observou Teixeira e colaboradores (2020), com o emprego do omento em subcutâneos acima de implantes ósseos em regiões de pouco tecido em pacientes caninos miniatura.

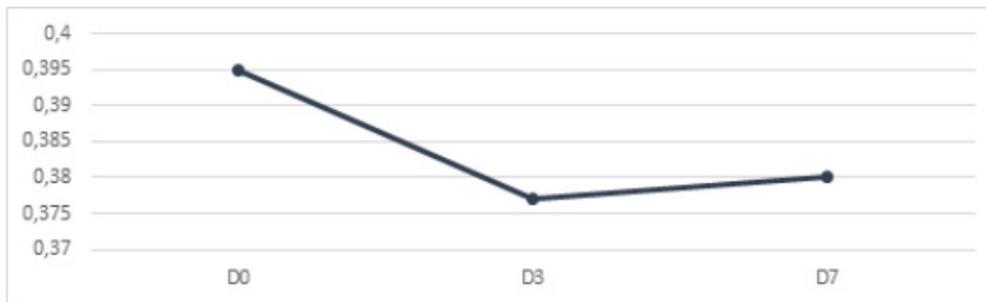
Figura 1: Edema em região abdominal. (A) Rato 5, dia 1. (B) Rato 5, dia 2.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

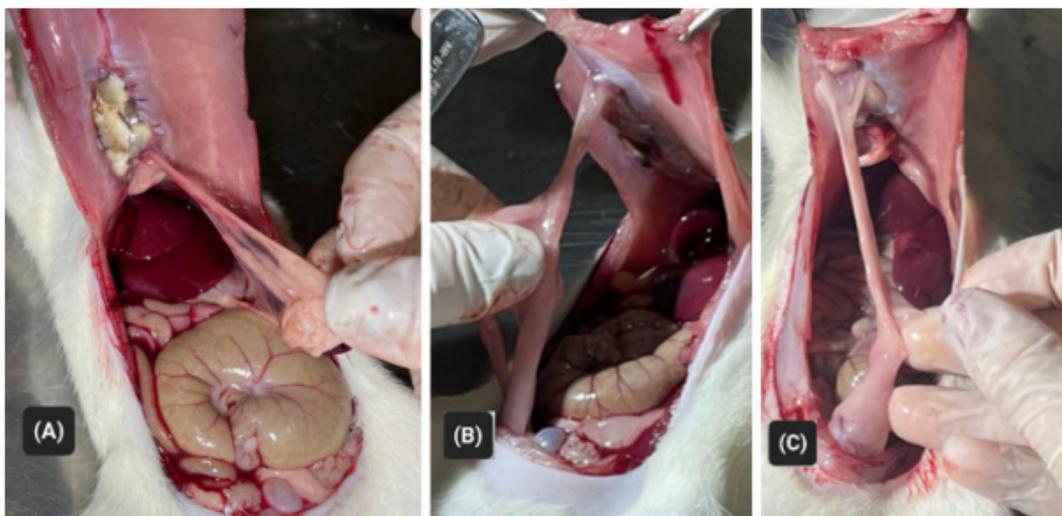
Em análise ponderal foi observada peso média ao dia do procedimento cirúrgico (Dia 0) de 0,395 g, ao dia 3 de 0,377 g, e ao Dia 7, dia da eutanásia de 0,380 g, concluindo na perda média de 0,15 g, ou 3.8% do peso corpóreo em comparação ao dia do procedimento cirúrgico e ao dia 7 (Figura 2). Conforme foi observado em Jorge e colaboradores (2021), Jorge e colaboradores (2023) e Costa e colaboradores (2024), com maior perda de peso até o terceiro dia de pós-operatório e a partir o início de sua recuperação, em hernioplastias em ratos com implantes biológicos e/ou sintéticos, correlaciona-se a perda ápic de peso as alterações metabólicas acarretadas pelo procedimento anestésico e a hipotermia decorrente deste e do procedimento cirúrgico, como Sartori e Mello (2018) descrevem em grande ocorrência em ratos de mesma espécie.

Figura 2: Exemplificação gráfica da perda de peso dos roedores desde o dia do procedimento cirúrgico até o sétimo dia de pós-operatório.



Em análise macroscópica foram observadas formações de aderências peritoneais em todos os animais, diferindo ao grau de adesão e as estruturas aderidas. A formação de aderências em procedimento de hernioplastias abdominais é observada com frequência, sendo de importância e estrutura aderida e as complicações decorrentes desta aderência. Em estudos experimentais com materiais biológicos de processamento similar Jorge e colaboradores (2021) e Costa e colaboradores (2024) observaram formações de aderências em todos os animais, variando em omento, ligamentos testiculares, mesentério e intestino, apesar, não foram observadas complicações sistêmicas ou locais. Assim como, em Jorge e colaboradores (2023) foram observadas formações de aderências peritoneais ao implante sintético empregado em hernioplastias abdominais de ratos.

Figura 3: Fotomicroscopia das formações de aderências. (A) Aderência em omento; (B) Aderência em ligamento testicular direito; (C) Aderência em ligamento testicular esquerdo.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Em maioria, foram observadas aderências envolvendo ligamento testicular (80%), em 10% dos animais em ligamento testicular direito, em 40 % dos animais em ligamento testicular esquerdo e em 10% dos animais envolvendo ambos os ligamentos testiculares. Também, em um animal (10%) foi observada aderência em omento (Tabela 1).

Tabela 1: Demonstração das formações de aderências nos ratos do Grupo C 7 dias.

Rato	Nº	Estrutura aderida	Adesão	Grau
Rato 1	2	Lig Testicular direito e esquerdo	Facilmente desfeita	Grau 1 (+) ou leve
Rato 2	1	Lig Testicular esquerdo	Facilmente desfeita	Grau 1 (+) ou leve
Rato 3	1	Omento	Facilmente desfeita	Grau 1 (+) ou leve
Rato 4	1	Lig Testicular direito	Facilmente desfeita	Grau 1 (+) ou leve
Rato 5	1	Lig testicular esquerdo	Facilmente desfeita	Grau 1 (+) ou leve

As aderências envolvendo os ligamentos testiculares em ratos se correlacionam principalmente ao mecanismo de termorregulação dos roedores, onde estes translocam o testículo para região abdominal em situações de frio, como foi observado também em estudos de hernioplastias, com aderências similares, como em Jorge e colaboradores (2021) e Costa e colaboradores (2024). A aderência em omento é observada principalmente pelo mecanismo fisiológico da estrutura intracavitária, onde é observada em diversas situações como vantajosas, já que o omento auxilia na formação da neovascularização, sendo de recomendação sua pexia cirúrgica com objetivo de angiogênese e auxílio no carreamento celular para o processo cicatricial, como observa Jorge (2016), Jorge e colaboradores (2021) e Costa e colaboradores (2024), Motta e Lunardi (2023).

Por fim, os implantes de pele de tilápia foram observados íntegros em todos os animais, sem presença de absorção precoce ou fistula, que levaria a recidiva herniária, em contraponto ao que foi observado em Costa e colaboradores (2024), onde com implantes de pele de truta com mesmo processamento foi observado absorção precoce e recidiva herniária a partir do terceiro dia de pós-operatório.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa ainda está em andamento, apesar, até o presente momento a pele de tilápia do Nilo processada em clorexidina 2% e conservada em glicerina 100% demonstrou resultado promissor em até 7 dias de aplicação cirúrgica, assim como a aplicabilidade de enxerto de omento em região subcutânea, acima do implante demonstrou-se positiva em até 7 dias, com brandas alterações pós-operatórias e poucas formações de aderências.

Com a execução dos demais grupos e processamento dos resultados será possível melhor observar os efeitos dos implantes de pele de Tilápia do Nilo processada em clorexidina 2% ou glutaraldeído 0,5% e conservadas em glicerina, como implante cirúrgico de parede abdominal, em até 30 dias.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, A.P.; DUQUE, T.M.; MARION, J.J.C. O uso da clorexidina na endodontia. *Uningá Review Journal*, v. 20, n. 2, 2014.
2. ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. *Tópicos em cirurgia de cães e gatos*. 3. ed. Jaboticabal, SP: FUNEP-UNESP, 1992. p. 33-42.
3. BALTZER, W.I. et al. Augmentation of diaphyseal fractures of the radius and ulna in toy breed dogs using a free autogenous omental graft and bone plating. *Veterinary and Comparative Orthopedics and Traumatology*, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2015.

4. BAUCIA, J.Á.; LEAL NETO, R.M.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.*, v. 21, n. 2, p. 180-187, 2006.
5. BELLÓN, J.M. Revisión de una clasificación de materiales protésicos destinados a la reparación herniaria: correlación entre estructura y comportamiento en los tejidos receptores. *Revista Hispanoamericana de Hernia*, v. 2, n. 2, p. 49-57, 2014.
6. CLARO JÚNIOR, F. et al. Retalho autólogo de grande omento como estrutura cirúrgica de reparo extra-peritoneal. Estudo experimental comparativo, pareado e controlado de suas propriedades adaptativas. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 29, n. 1, p. 128-135, 2014.
7. COSTA, C.B.; ANDRADE, G.B.; SILVA, M.F.A. Aspectos patológicos do implante de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído e pela glicerina em parede abdominal de camundongos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 1-7, 2016.
8. COSTA, C.S. Utilização da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na hernioplastia abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar: estudo experimental. Teresópolis, 2021. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO.
9. COSTA, C.S.D. et al. Use of rainbow trout skin treated with glutaraldehyde as a mesh for abdominal hernioplasty in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 39, e393024, 2024.
10. COUTINHO, J.S. New proposals for dressing treatments for burns: an integrative review. *Brazilian Journal of Health Review*, 12 nov. 2021.
11. ELANGO, J.; BU, Y.; BIN, B.; GEEVARETNAM, J.; ROBINSON, J.S.; WU, W. Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films. *Food Bioscience*, v. 17, p. 42-51, 2017.
12. EVERLING, E.M.; BANDEIRA, D.S.; GALLOTTI, F.M.; BOSSARDI, P.; TONATTO-FILHO, A.J.; GREZZANA-FILHO, T.J.M. Open vs laparoscopic hernia repair in the brazilian public health system an 11-year nationwide population-based study. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 57, n. 4, p. 484-490, 2020.
13. FLECKNELL, P.A.; THOMAS, A.A. Anestesia e analgesia comparada em animais de laboratório. In: LUMB & JONES. *Anestesia e analgesia em veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2017. p. 2199-2202.
14. GOISSIS, G.; BRAILE, D.M.; GIGLIOTTI, A.F. Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, p. 92-97, 1999.
15. JORGE, S.F. Avaliação clínica, termográfica e morfológica da utilização da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e do polietileno de baixa densidade laminar bolhoso (plástico bolha) na hernioplastia da parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar. Rio de Janeiro, 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
16. JORGE, S.F. et al. Utilização de pele de tilápia do Nilo e rã-touro em hernioplastia de parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar. *Revista Jopic*, v. 6, n. 10, 2021.
17. JORGE, S.F.; COSTA, C.S.; GITIRANA, L.B.; FIGUEIREDO, M.A. Bubble plastic use in rats hernioplasty: uso do plástico bolha em hernioplastias de ratos. *Heliyon*, v. 28, n. 9, e19483, 2023.
18. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2013.
19. KIST, C.; MANNA, B.B.; MONTES, J.H.M.; BIGOLIN, A.V.; GROSSI, J.V.M.; CAVAZZOLA, L.T. Estudo comparativo de aderências intraperitoneais associadas ao uso das telas de polipropileno e de malha leve de polipropileno revestida com ácido graxo ômega-3. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 39, n. 3, 2012.

20. LIMA-JUNIOR, E.M. et al. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. Rev. Bras. Queimaduras, v. 16, p. 1-8, 2017.
21. MONTGOMERY, A. The battle between biological and synthetic meshes in ventral hernia repair. Hernia, v. 17, p. 3-11, 2013.
22. MOTTA, D.G.; LUNARDI, V.B. Propriedades e aplicabilidade do omento na cirurgia veterinária. Ciência Animal, v. 33, n. 2, p. 102-117, 2023.
23. MOURA, L.C. Avaliação microbiológica de biomateriais para utilização em cirurgia. Teresópolis, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO.
24. NEVES, D.R. Utilização de pele de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) sob dois métodos de esterilização, na hernioplastia abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar: estudo experimental. Teresópolis, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO.
25. NOVAES, A.S.M. Efeitos sistêmicos da implantação de pericárdio ovino tratado pelo glutaraldeído 1% e conservado em glicerina 98% na vesícula urinária de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Rio de Janeiro, 2015. 37 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
26. PIGOSSI, N. et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego como implante da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 17, n. 8, p. 263-278, 1971.
27. RICCIARDI, B.F. et al. Correção de hérnia abdominal com tela envolta por tecido fibroso - estudo em ratos Wistar. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 39, n. 3, p. 195-200, 2012.
28. SARTORI, A.S.; MELLO, J.R.B. Anestesia em animais de laboratório: revisão bibliográfica. Veterinária em Foco, v. 15, n. 2, p. 19-28, 2018.
29. SMEAK, D.D. Abdominal Wall Reconstruction and Hernias. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. Veterinary surgery small animal. 2.ed. St. Louis: Elsevier, 2018. p. 1564-1591.
30. SOUSA FILHO, J.C.D. Utilização da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) na hernioplastia da parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar. Teresópolis, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO.
31. STONE, R. et al. Accelerated wound closure of deep partial thickness burns with acellular fish skin graft. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 4, p. 1590, 2021.
32. TANG, L.; EATON, J.W. Inflammatory responses to biomaterials. American Journal of Clinical Pathology, v. 103, n. 4, p. 466-471, 1995.
33. TEIXEIRA, J.G.C. et al. Behavior of free omental grafts without vascular anastomosis implanted in cat's experimental wounds. Ciência Rural, v. 50, n. 9, e20190284, 2020.
34. TORRES, A.T.S. et al. Neovaginoplasty with tilapia fish skin: a series of eleven cases. International Urogynecology Journal, v. 33, n. 8, p. 2185-2193, 2022.
35. UTRABO, C.A.L. et al. Dentre as telas Prolene®, Ultrapro® e Ebard soft® qual apresenta melhor desempenho no reparo da parede abdominal?. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, v. 34, n. 1, 2021.
36. VIANA, F.A.B. Guia terapêutico veterinário. 2. ed. Lagoa Santa: Gráfica e Editora CEM Ltda, 2007.
37. VIVAS, D.G. et al. Avaliação morfológica e tensiométrica de pericárdio bovinos pré-tratados em glutaraldeído e conservados em glicerina. Medicina Veterinária (UFRPE), v. 15, n. 2, p. 130-137, 2021.

O MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO PÓS-NATAL DA SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO E SUA SIMILARIDADE COM A DOENÇA HUMANA

THE EXPERIMENTAL MODEL OF POSTNATAL INDUCTION OF POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME AND ITS SIMILARITY WITH THE HUMAN DISEASE

Livia Eller Heckert¹, Marcel Vasconcellos²

1 - Discente do Curso de Biomedicina do UNIFESOI; 2 - Docente do Curso de Medicina e Biomedicina do UNIFESO

RESUMO

Embora a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) seja um dos distúrbios endócrinos mais comuns que afeta mulheres em idade reprodutiva, sua etiopatogenia ainda não se encontra totalmente elucidada. Estudos demonstram que a exposição de ratas a hormônios esteroides sexuais, na fase pós-natal, apresenta inúmeras características similares à SOP humana, tais como excesso de andrógenos, interrupção do ciclo estral, oligo/anovulação, hipersecreção do hormônio luteinizante, desenvolvimento de cistos ovarianos e resistência insulínica. Considerando que uma grande parte dos pesquisadores justificam o uso da metodologia de exposição pós-natal com base na morfologia do sistema reprodutivo da idade adulta, o presente estudo objetiva investigar a similaridade do método com o observado em mulheres. Trata-se de um estudo aprovado pela CEUA sob n.º 580/2024. Foram utilizadas 12 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 3 meses e peso de 250 ± 20 g, procedentes da Instalação de Ciência Animal. Os animais foram randomizados em Grupo Controle ($n = 6$), fêmeas híginas; Grupo Pós-natal ($n = 6$), fêmeas com 9 dias de idade induzidas à SOP por meio da administração única de 5 mg de propionato de testosterona por via subcutânea. Aos 90 dias, procedeu-se à avaliação morfológica dos ovários e exames hormonais de todos os animais. Em relação aos exames hormonais, o nível sérico de testosterona diminuiu, enquanto a progesterona aumentou significativamente nos ratos induzidos à SOP, em comparação aos animais controle. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de estrogênio nos dois grupos. O método de indução pós-natal reproduziu parcialmente aspectos fisiopatológicos encontrados na doença humana.

Palavras-chave: andrógenos; síndrome de Stein-Leventhal; ratos Wistar.

ABSTRACT

Although Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders affecting women of reproductive age, its etiopathogenesis is not yet fully understood. Studies have shown that exposure of rats to sex steroid hormones in the postnatal phase presents numerous characteristics similar to human PCOS, such as excess androgens, interruption of the estrous cycle, oligo/anovulation, hypersecretion of luteinizing hormone, development of ovarian cysts, and insulin resistance. Considering that many researchers justify the use of the postnatal exposure methodology based on the morphology of the adult reproductive system, the present study aims to investigate the similarity of the method with that observed in women. This is a study approved by CEUA under No. 580/2024. Twelve female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged 3 months and weighing 250 ± 20 g, from the Animal Science Facility, were used. The animals were randomized into a Control Group ($n = 6$), healthy females; and a Postnatal Group ($n = 6$), 9-day-old females induced with PCOS by a single subcutaneous administration of 5 mg of testosterone propionate. At 90 days, morphological evaluation of the ovaries and hormonal tests were performed on all animals. Regarding hormonal tests, serum testosterone levels decreased, while progesterone levels increased significantly in rats induced with PCOS, compared to control animals. No significant differences were observed in estrogen levels in the two groups. The postnatal induction method partially reproduced pathophysiological aspects found in human disease.

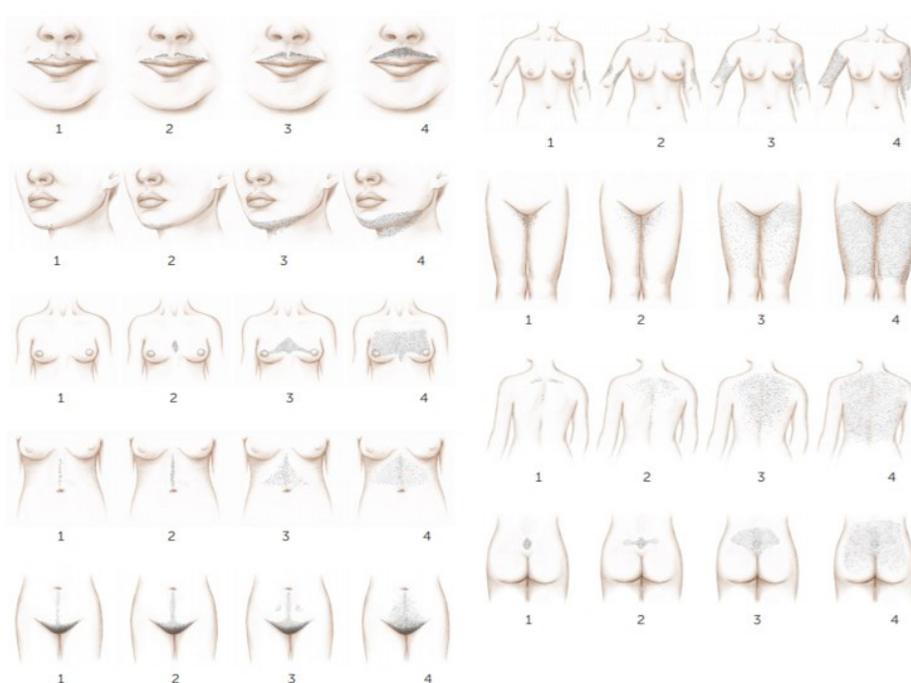
Keywords: *androgens; Stein-Leventhal syndrome; Wistar rats.*

INTRODUÇÃO

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma das endocrinopatias mais comuns no mundo, sendo uma das maiores causas de hiperandrogenismo e caracterizada pela anovulação, resistência insulínica, obesidade, acne e hirsutismo. Sua etiologia não é totalmente conhecida, mas têm-se como hipótese uma desordem multi-gênica complexa.¹⁻³

O hirsutismo se caracteriza pelo crescimento excessivo de pelos terminais em áreas típicas do corpo feminino com padrão masculino. A escala de Ferriman-Gallwey é uma ferramenta amplamente usada para avaliar o hirsutismo em mulheres. Ela mede a densidade e distribuição dos pelos terminais em áreas do corpo que são sensíveis a andrógenos, utilizando uma pontuação que varia de 0 (sem pelos) a 4 (crescimento de pelos extenso) em nove áreas do corpo, onde uma pontuação ≥ 8 hirsutismo é considerado leve e uma pontuação ≥ 15 hirsutismo é considerado de moderado a grave.^{4,5}

Figura 1. Escala Ferriman-Gallwey modificada



Fonte: Pontificia Universidad Católica de Chile, 2021.

O Critério de Rotterdam é amplamente utilizado para o diagnóstico da Síndrome dos Ovários Policísticos. Ele foi estabelecido em 2003 durante uma conferência de consenso entre a European Society for Human Reproductive Medicine (ESHRE) e a American Society for Reproductive Medicine (ASRM). Onde para confirmar o diagnóstico de SOP, é necessário exclusão de outras condições que possam explicar os sintomas e que a paciente apresente pelo menos dois dos três critérios a seguir: irregularidade no ciclo menstrual (≤ 8 ciclos por ano ou sem menstruar por mais de 3 meses), Hiperandrogenismo (laboratorial e/ou clínico), Ovários policísticos identificados através da ultrassonografia (+ de 20 cistos ou folículos medindo 2-9 mm e/ou volume ovariano total $\geq 10 \text{ cm}^3$ em um ou ambos os ovários).^{5,6}

Estudos demonstram que a exposição de ratos a hormônios esteroides sexuais, na fase pós-natal, apresenta inúmeras características similares à SOP em mulheres, tais como excesso de andrógenos, interrupção do

ciclo estral, oligo/anovulação, hipersecreção do hormônio luteinizante, desenvolvimento de cistos ovarianos e resistência insulínica.⁷⁻¹⁴

O método de exposição pós-natal na indução da SOP murina é amplamente utilizado, baseado na morfologia normal do sistema reprodutivo da rata na idade adulta, a qual tende a ser a mais adequada.¹⁵⁻²²

Considerando a existência de diversos métodos de mimetização da síndrome em ratos, observa-se a falta de um consenso quanto ao modelo ideal. O fato, não permite uma análise comparativa rigorosa no que tange a eficácia dos modelos em simular a condição humana. Assim, uma investigação a respeito do método de indução pós-natal, se faz oportuna e relevante.

OBJETIVOS

Geral:

- Comparar a similaridade do modelo de indução pós-natal da SOP murina, com o observado em mulheres.

Específicos:

- Analisar a concentração hormonal durante a fase de estro;
- Realizar a avaliação morfológica dos órgãos sexuais durante o estro;
- Comparar as diferenças hormonais, morfológicas dos órgãos sexuais e a medição do peso corporal encontradas entre os grupos experimentais.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental aprovado pela CEUA/UNIFESO sob o n.º de protocolo 580/2024.

Caracterização da amostra

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas 12 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia – Berkenhaout, 1769), Wistar, com média de idade de 2-3 meses e peso de 250 ± 20 g, com comida e água disponíveis *ad libitum*, procedentes da Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis-RJ.

Desenho do estudo experimental

A randomização ocorreu por meio do editor Excel (Microsoft Corporation®, Washington D.C, US), sendo formado dois grupos:

I) Grupo Controle (GC, n = 6), fêmeas híginas no estro;

II) Grupo Pós-Natal (GPós, n = 6), fêmeas com 9 dias de idade induzidas à SOP por meio de dose única de 5 mg de propionato de testosterona (Durateston®, Eurofarma Laboratórios S.A, SP, BR), via S.C. (subcutânea). Os exames laboratoriais e complementares foram realizados aos 90 dias.

Análise do ciclo estral (esfregaço vaginal)

A ciclicidade estral foi monitorada por observações diárias de esfregaços vaginais para todas as fêmeas, após a indução do estro por meio da presença do macho na gaiola. O procedimento para a coleta de amostras vaginais envolveu a separação dos lábios da vulva e a inserção de um cotonete estéril na vagina. O swab foi girado duas ou três vezes contra a parede vaginal e, em seguida, realizado um imprint em uma lâmina de vidro limpa. Os esfregaços foram fixados em metanol, corados com Giemsa e examinados por microscopia óptica (aumento de 100x).

As proporções de leucócitos, células epiteliais e células cornificadas foram determinadas nos esfregaços vaginais diários. Essas proporções mudam de maneira característica durante as diferentes fases do ciclo estral. O ciclo estral de ratos dura 4 dias.²³

Análise do peso corporal, parâmetros morfológicos e peso dos órgãos do controle e da prole androgenizada aos 9 dias

Os pesos corporais das fêmeas foram determinados aos 30, 45, 60 e 81 dias de idade. Na idade adulta (90 dias), todos os parâmetros morfológicos foram medidos com um paquímetro, incluindo a distância anovaginal [a distância (em milímetros) entre a borda anterior do ânus e a borda posterior do orifício vaginal] e os comprimentos da vagina e do clitóris. Analisou-se o peso corporal (g) e peso dos ovários (g).

Coleta de sangue e dosagem hormonal

Amostras de sangue para dosagem hormonal foram obtidas por via intracardíaca terminal, após anestesia profunda durante a fase de estro.

Níveis séricos de testosterona (T) (ng/dL), estradiol (E2) (pg/ml), progesterona (P) (ng/ml), foram determinados pelo método de quimioluminescência.

Avaliação da morfologia ovariana

Após a eutanásia, os ovários de todos os animais durante a fase estro foram removidos, limpos de tecido adiposo conjuntivo aderente, fixados em paraformaldeído a 4% e, em seguida, processados por protocolos padrão e incluídos em parafina.

Os ovários foram seccionados longitudinal e serialmente a 5 µm de espessura; os cortes foram montados em lâmina de vidro, desparafinizados por xileno, hidratados em série de etanol (100, 90, 80, 70 e 50%) e água destilada, e corados em H&E. Os cortes ovarianos foram observados em microscópio de luz com objetivas variando de 4 a 100x e oculares de 10x.

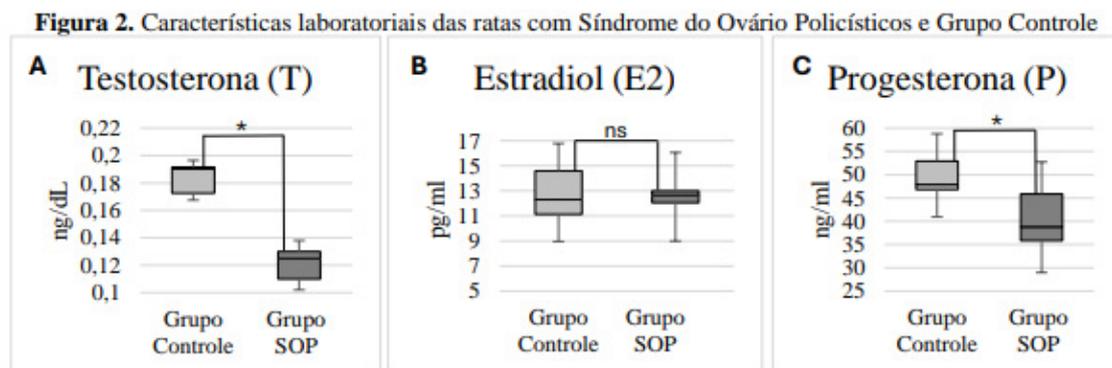
Análise estatística

Após a coleta dos dados, para comparar as médias entre os grupos estudados, utilizou-se o teste t de Student, seguido do cálculo da média, desvio padrão de cada grupo experimental e gráfico box plot, utilizando o programa Excel. Em todos os testes foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% (IC = 95%) e grau de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Utilizou-se o programa SPSS versão 22.0® (Belmont, CA, US).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem hormonal

Durante o experimento o principal resultado encontrado foi a determinação da concentração hormonal, na qual, os resultados, mostraram que a concentração de testosterona foi inferior no grupo SOP ($0,12 \pm 0,008$ ng/dL) em relação ao grupo controle ($0,18 \pm 0,005$ ng/dL) ($p < 0,05$). A progesterona também teve uma baixa significativa no grupo SOP ($40,06 \pm 6,87$ ng/ml) em relação ao grupo controle ($48,61 \pm 5,85$ ng/ml) ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de estradiol nos dois grupos. (Figura 2).



Gráficos box plot mostrando os níveis séricos de ratas em estro fisiológico. (*) valores $p < 0,05$ considerados estatisticamente significantes; (ns) não significativo. A - Comparativo do nível sérico de testosterona entre os grupos; B - Comparativo do nível sérico de estradiol entre os grupos; C - Comparativo do nível sérico de progesterona entre os grupos. Quimioluminescência. Fonte: Autores, 2024.

Neste estudo, o estradiol do grupo SOP (GSOP) não apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo controle (GC), enquanto nas mulheres este pode apresentar variações, estando em muitos casos elevado nas fases iniciais do ciclo menstrual, refletindo a hiperestimulação folicular que pode ocorrer devido à disfunção ovulatória, o que leva a um desequilíbrio entre o estradiol e a progesterona, contribuindo para as alterações endometriais e possíveis dificuldades reprodutivas nas pacientes com SOP.^{24,25}

Por outro lado, as ratas do grupo induzido por testosterona (GSOP) apresentaram níveis mais baixos de progesterona que o grupo controle (GC), assim como os níveis apresentados em mulheres com SOP, especialmente devido à anovulação frequente, o que afeta a produção desse hormônio na fase lútea do ciclo menstrual. Os resultados mostraram que os níveis de testosterona foram inferiores no grupo SOP (GSOP) em relação ao grupo controle (GC), em contrapartida, foram encontrados níveis significativamente mais altos de testosterona no estudo em mulheres.^{24,25}

Análise do peso corporal, parâmetros morfológicos e peso dos órgãos

Na análise de peso corporal, o peso do grupo SOP mostrou-se mais elevado em todas as medições. 30 dias (GSOP: $87 \pm 3,60$ g versus GC: $84,5 \pm 3,2$ g), 45 dias (GSOP: $158,33 \pm 4,81$ g versus GC: $130 \pm 4,3$ g), 60 dias (GSOP: $203 \pm 6,70$ g versus GC: $167 \pm 5,5$ g) e 81 dias (GSOP: $215 \pm 4,72$ g versus GC: $187,1 \pm 5,2$ g). (Figura 3).

Figura 3. Peso corporal (g) dos animais

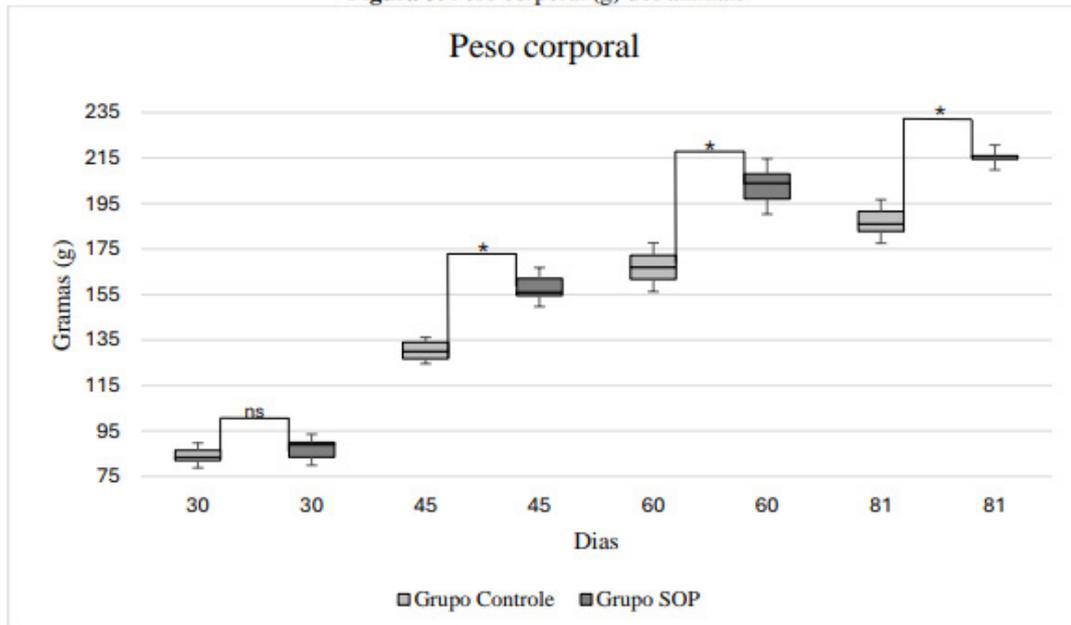
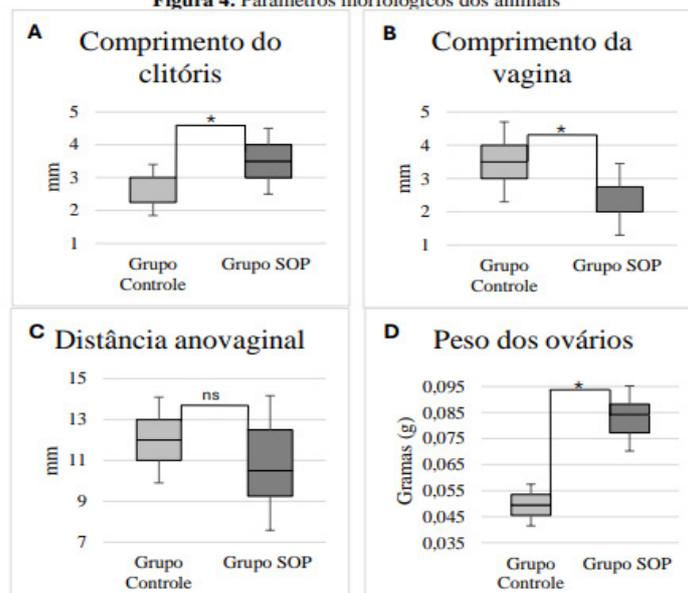


Gráfico *box plot* mostrando a diferença entre os pesos corporais dos dois grupos (GC e GSOP) durante a mesma fase de desenvolvimento. (*) valores $p < 0,05$ considerados estatisticamente significantes; (ns) não significativo. Fonte: Autores, 2024.

O peso do grupo SOP mostrou-se mais elevado em todas as medições, o que se alinha ao encontrado em mulheres como aumento de insulina, resistência insulínica (HOMA-IR) e índice de andrógenos livres (FAI), o que contribui para o agravamento da deposição de gordura abdominal e influencia negativamente a composição corporal.^{26,27}

Quanto aos parâmetros morfológicos dos animais, observou-se que o grupo SOP (GSOP) apresentou comprimento do clitóris ($3,3 \pm 0,7$) maior que o grupo controle (GC), assim como o peso ovariano. (Figura 4).

Figura 4. Parâmetros morfológicos dos animais



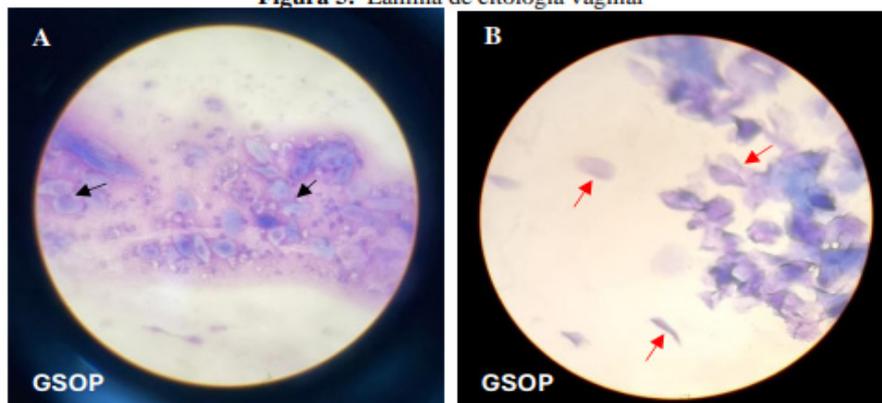
Gráficos *box plot* mostrando a diferença entre parâmetros morfológicos dos dois grupos (GC e GSOP) durante a mesma fase de desenvolvimento. (*) valores $p < 0,05$ considerados estatisticamente significantes; (ns) não significativo. A - Comparativo do comprimento do clitóris entre os grupos; B - Comparativo do comprimento da vagina entre os grupos; C - Comparativo da distância anovaginal entre os grupos; D - Comparativo dos pesos ovarianos entre os grupos. Fonte: Autores, 2024.

Quanto aos testes de parâmetros morfológicos dos animais, observou-se que o grupo SOP (GSOP) apresentou comprimento do clitóris e peso ovariano maior que o grupo controle (GC), entretanto o comprimento vaginal no grupo SOP (GSOP) apresentou comprimento maior que no grupo controle (GC). Já a distância anovaginal não teve uma diferença significativa entre os grupos estudados. Nas pesquisas em mulheres houve diferença significativa entre os grupos na composição corporal, esses achados sugerem que o hiperandrogenismo está associado à síndrome.²⁴⁻²⁶

Análise do ciclo estral (esfregaço vaginal)

Durante a citologia vaginal, as proporções de leucócitos, células epiteliais e células cornificadas foram determinadas nos esfregaços. Esses, foram realizados pela manhã em dias diferentes para determinar a fase do ciclo estral na qual os animais se encontravam. Observou-se predominantemente após a introdução do macho na gaiola, a fase de estro, a qual se caracteriza pela queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas anucleadas, dando o aspecto de “folhas secas”.²⁸ (Figura 5).

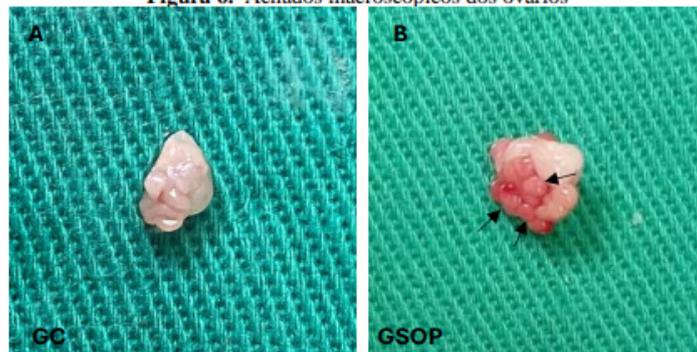
Figura 5. Lâmina de citologia vaginal



Lâminas de esfregaço vaginal. A - Proestro: células intermediárias nucleadas (setas pretas); B - Estro: células anucleadas (setas vermelhas). 100X. Giemsa. Fonte: Autores, 2024.

Avaliação da morfologia ovariana Após a eutanásia, procedeu-se ao exame anatomopatológico dos ovários, para verificação da presença de cistos ovarianos, os quais o grupo SOP indicou a presença de inúmeros cistos, ao contrário do grupo controle, que não se encontrou nenhum cisto. (Figura 6).

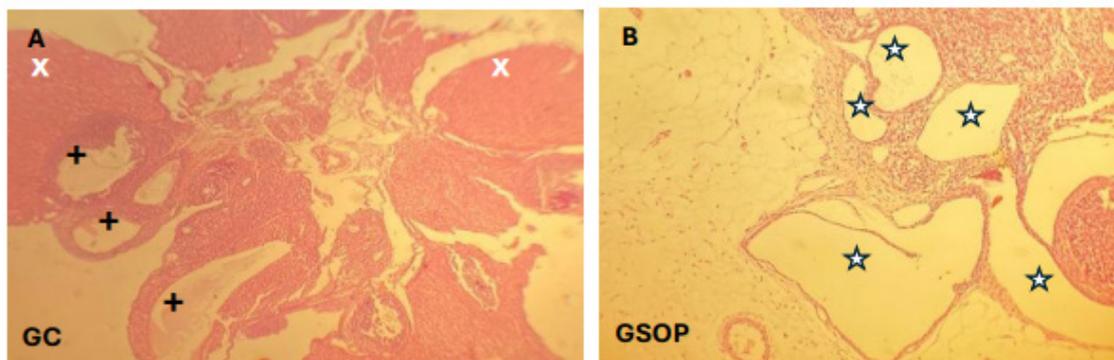
Figura 6. Achados macroscópicos dos ovários



Ovário de ratas, aos 90 dias de idade. Observar em grupo controle (GC) a inexistência de cistos ovarianos. Em grupo induzido por testosterona (GSOP), notar presença de inúmeros cistos ovarianos (setas pretas). Fonte: Autores, 2024.

Observou-se por meio de cortes histológicos a confirmação da presença de cistos ovarianos e não se observou corpos lúteos nos ovários do grupo induzido por testosterona (GSOP), assim como a inexistência de cistos no grupo controle (GC) (Figura 7).

Figura 7. Achados histológicos dos ovários



Fotomicrografias mostrando corte de ratas em estro fisiológico. Observar em grupo controle (GC) a presença de corpos lúteos (X) e folículos antrais (Cruz). Em grupo induzido à SOP (GSOP), notar cistos ovarianos (Estrela). 40X. HE. Fonte: Autores, 2024.

Após o exame anatomopatológico dos ovários aos 90 dias e a histopatologia, confirmamos a presença de inúmeros cistos ovarianos no grupo SOP (GSOP), diferente do grupo controle (GC), onde não encontramos a presença de nenhum cisto. Enquanto os achados ultrassonográficos em mulheres compatíveis com ovários policísticos são os menos prevalentes, principalmente entre as pacientes na ultrassonografia transabdominal.^{27,29,30}

CONCLUSÕES

O estudo comparou parâmetros hormonais e morfológicos entre ratas com síndrome dos ovários policísticos (SOP) induzida por testosterona e ratas híginas, bem como achados similares em mulheres com SOP. As ratas com SOP apresentaram níveis mais baixos de progesterona em relação ao grupo controle (GC), similar ao observado em mulheres, devido à anovulação. Não houve diferença significativa nos níveis de estradiol entre os grupos de ratas, enquanto nas mulheres este pode apresentar variações. No entanto, as ratas com SOP mostraram níveis de testosterona inferiores aos do grupo controle, enquanto em mulheres com SOP, os níveis de testosterona foram significativamente mais altos.

O peso corporal e o peso ovariano das ratas do grupo induzido (GSOP) foram maiores em relação ao grupo controle (GC), assim como os níveis de insulina e andrógenos livres em mulheres com SOP, sugerindo que resistência à insulina e hiperandrogenismo estão relacionados a síndrome. Os exames histopatológicos confirmaram a presença de cistos ovarianos no grupo SOP das ratas, o que também é observado em mulheres com SOP.

Com isso, podemos concluir que o método de indução pós-natal reproduziu parcialmente aspectos fisiopatológicos encontrados na doença humana.

REFERÊNCIAS

1. Stein, IF e Leventhal, ML. Amenorréia associada a ovários policísticos bilaterais. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1935;29:181-5.
2. Moura HHG de, Costa DLM, Bagatin E, Sodr e CT, Manela-Azulay M. Síndrome do ovário policístico: abordagem dermatológica. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2011. doi: 10.1590/S0365-05962011000100015.
3. Junqueira P, Fonseca A, Aldrighi J. Síndrome dos ovários policísticos. *Revista da Associa o Médica Brasileira* 2003. doi:10.1590/S0104-42302003000100021.
4. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1961;21(11):1440-7.
5. Hirsutismo: diagnóstico. *Revista da Associa o Médica Brasileira*. 2010;56(1):6-8.
6. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 2004;81:19-25.
7. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010;25(2):544-51. doi: 10.1093/humrep/dep399.
8. Van Houten EL, Kramer P, McLuskey A, Karels B, Themmen AP, Visser JA. Reproductive and metabolic phenotype of a mouse model of PCOS. *Endocrinology* 2012;153(6):2861-9. doi: 10.1210/en.2011-1754.
9. Ramezani Tehrani F, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Hashemi S, Azizi F. The time of prenatal androgen exposure affects development of polycystic ovary syndrome like phenotype in adulthood in female rats. *Int J Endocrinol Metab* 2014;12(2):e16502. doi: 10.5812/ijem.16502.
10. Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol* 2014;99(5):792-801. doi: 10.1113/expphysiol.2014.078055.
11. Hurliman A, Keller Brown J, Maille N, Mandala M, Casson P, Osol G. Hyperandrogenism and Insulin Resistance, Not Changes in Body Weight, Mediate the Development of Endothelial Dysfunction in a Female Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Endocrinology* 2015;156(11):4071-80. doi: 10.1210/en.2015-1159.
12. Ergenoglu M, Yildirim N, Yildirim AG, Yeni l O, Erbas O, Yavasoglu A, Taskiran D, Karadadas N. Effects of Resveratrol on Ovarian Morphology, Plasma Anti-Mullerian Hormone, IGF-1 Levels, and Oxidative Stress Parameters in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci* 2015;22(8):942-7. doi: 10.1177/1933719115570900.
13. Pontes AG, Rehme MFB, Martins AMV de C, Micussi MTABC, Maranhão TM de O, Pimenta W de P, et al. Resistência   insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos: rela o com as variáveis antropométricas e bioquímicas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2012. doi: 10.1590/S0100-72032012000200006.
14. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, Papavassiliou AG, Duleba AJ, Diamanti-Kandaris E. Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochemistry and Cell Biology* 2007;127(6):581-9. doi: 10.1007/s00418-006-0265-3.
15. J. Zhou, Y. Liang, X.-M. Lin, R.-J. Ma, J.-Q. Fang, Is the efficacy of Chinese herbal medicine on polycystic ovarian syndrome enhanced by acupuncture in rats, *Biomedical Research-India* 23 (3) (2012) 329-32.

16. N. Tamura, T. Kurabayashi, H. Nagata, H. Matsushita, T. Yahata, K. Tanaka, Effects of testosterone on cancellous bone, marrow adipocytes, and ovarian phenotype in a young female rat model of polycystic ovary syndrome, *Fertil Steril* 2 (2005):1277-84.
17. Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, et al. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 2007;148(8):3781–91.
18. A. Hurliman, J.K. Brown, N. Maille, M. Mandala, P. Casson, G. Osol, Hyperandrogenism and Insulin Resistance, Not Changes in Body Weight, Mediate the Development of Endothelial Dysfunction in a Female Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), *Endocrinology* 156 (11) (2015): 4071-80.
19. Z.L. Miao, L. Guo, Y.X. Wang, R. Cui, N. Yang, M.Q. Huang, W.B. Qin, J. Chen, H.M. Li, Z.N. Wang, X.C. Wei, The intervention effect of Rosiglitazone in ovarian fibrosis of PCOS rats, *Biomed Environ Sci* 25 (1) (2012):46-52.
20. Y.X. Wang, X.M. Xie, M. Dai W.J. Zhu, Relationship between insulin resistance and adiponectin expression in a rat model of polycystic ovary syndrome, *Scientific Research and Essays* 5 (13) (2010):1632-9.
21. M. Ergenoglu, N. Yildirim, A.G. Yildirim, O. Yeniel, O. Erbas, A. Yavasoglu, D. Taskiran, N. Karadadas, Effects of Resveratrol on Ovarian Morphology, Plasma AntiMullerian Hormone, IGF-1 Levels, and Oxidative Stress Parameters in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome, *Reprod Sci* 22 (8) (2015):942-7.
22. Noroozzadeh M, Behboudi-Gandevani S, Zadeh-Vakili A, Ramezani Tehrani F. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life Sci* 2017;191:259-272. doi: 10.1016/j.lfs.2017.10.020.
23. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002;62(4A):609–14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
24. Kogure GS, Piccki FK, Vieira CS, Martins W de P, Reis RM dos. Análise de força muscular e composição corporal de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2012. doi:10.1590/S0100-72032012000700005.
25. Pinheiro SA, Clapauch R. Importância da dosagem da 17OH-progesterona na síndrome dos ovários policísticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2001. doi: 10.1590/S0004-27302001000400008.
26. Melo AS, Macedo CSV, Romano LGM, Ferriani RA, Navarro PA de AS. Mulheres com síndrome dos ovários policísticos apresentam maior frequência de síndrome metabólica independentemente do índice de massa corpóreo. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2012. doi: 10.1590/S0100-72032012000100002.
27. Rehme MFB, Pontes AG, Goldberg TBL, Corrente JE, Pontes A. Manifestações clínicas, bioquímicas, ultrassonográficas e metabólicas da síndrome dos ovários policísticos em adolescentes. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2013. doi: 10.1590/S0100-72032013000600003.
28. Vilela MG, Santos Jr. JL, Castro e Silva JG. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *FEMINA*. 2007;35(10):667-70.
29. Hickey M, Doherty DA, Atkinson H, Sloboda DM, Franks S, Norman RJ, et al. Clinical, ultrasound and biochemical features of polycystic ovary syndrome in adolescents: implications for diagnosis. *Human Reproduction* 2011. doi: 10.1093/humrep/der102.
30. Gomes PC de A. Aspectos ultrassonográficos na síndrome dos ovários policísticos: novas recomendações / Sonographic aspects in polycystic ovary syndrome: new recommendations. *Brazilian Journal of Health Review* 2021. doi: 10.34119/bjhrv4n2-202.

ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE FILHOTES DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À SEPARAÇÃO MATERNA: UM ESTUDO TRANSGERACIONAL

Geórgia Rosa Lobato¹, Suzana Maria Bernardino Araújo², Maria Eduarda Cordeiro da Cunha², Bruna Maia Pinheiro³, Aline Pacheco Moura da Silva⁴, Valéria Cristina Lopes Marques⁴, Marcel Vasconcellos¹

1 - Docente do Curso de Medicina do UNIFESO; 2 - Discente do Curso de Medicina do UNIFESO; 3 - Discente do Curso de Psicologia do UNIFESO; 4 - Técnica administrativa do UNIFESO

RESUMO

Introdução: Estudos indicam que o modelo murino de separação materna, equivale ao estresse no início da vida e, mais especificamente, ao abuso e/ou negligência infantil em humanos, modulando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), afetando a função neuronal subsequente e o comportamento emocional. Em que pese a alta validade de construto do modelo de separação materna em roedores, verifica-se a inconsistência entre os resultados da literatura, devido a diferenças de metodologia, espécie escolhida, momento da avaliação do desfecho e escolha do grupo controle. **Objetivos:** Investigar se a separação materna prolongada origina um fenótipo predisposto (após três gerações consecutivas), a transtornos psiquiátricos. **Métodos:** O estudo foi aprovado pela CEUA/UNIFESO sob n.º 553/23. Serão utilizados 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade entre 1 e 90 dias e peso entre 6 e 300 g, composto por 24 machos e 24 fêmeas. Os animais serão distribuídos nos grupos: I- Grupo Controle: ratos desmamados no 21º dia, sem estresse na vida adulta (90 dias); II- Grupo Estresse Adulto; neonatos mantidos com a presença materna até o desmame (21 dias), e submetidos a estresse aos 90 dias, por meio de isolamento social e ciclo claro de 24h por três dias consecutivos; III- Grupo Separação Materna; neonatos separados da mãe do 2º ao 14º dia por 3 horas diárias; IV- Grupo Separação Materna/Estresse Adulto; neonatos separados da mãe do 2º ao 14º dia por 3 horas diárias e expostos ao estímulo estressor descrito no grupo II. Em todos os grupos, serão realizados testes cognitivos e de ansiedade aos 22 e 94 dias, além da determinação da concentração de corticosterona plasmática. **Resultados preliminares:** Caracterizou-se o comportamento de machos e fêmeas do Grupo Controle, quando submetidos aos testes do labirinto em cruz elevada e do campo aberto, além de determinar-se a concentração sérica de corticosterona dos animais.

Palavras-chave: Psicologia experimental; Transtornos psiquiátricos; Transgeracional; Epigenética; Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

As teorias psicanalistas, desde o seu surgimento com Freud, apresentam como seu principal objeto de estudo o aparelho psíquico individual, sua estrutura e seus processos intrapsíquicos de funcionamento. Para a psicanálise, “a relação com o cuidador permite à criança aprender sobre o mundo, e isso inclui a capacidade de experimentar o mundo por meio dos sinais de segurança e ameaça que o cuidador transmite”,¹ nesse sentido, a relação mãe-bebê se estabelece como meio significativo na construção do psiquismo, necessário seu estabelecimento como sujeito. Em seu livro “Instintos e suas Vicissitudes”, Freud (1915)², sinaliza o apego do bebê à mãe em seus primeiros anos de vida, assim atribui o vínculo que se estabelece nesta relação na associação da figura materna à redução de suas tensões fisiológicas, ao passo que a mãe supre suas necessidades de sede, fome, conforto e dor. Para alguns psicanalistas, este vínculo se estabelece para além das necessidades fisiológicas, visto o investimento emocional da mãe e a relevância no desenvolvimento e na estruturação do psiquismo. Diversos estudos demonstraram que filhos que passaram por algum tipo de estresse têm maiores riscos de desenvolver transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade.³ Além disso, já relacionaram o neurodesenvolvimento da criança aos cuidados maternos. Ensaio realizado com crianças de um ano colocadas em ambientes novos, onde a mãe se ausentou durante um breve período, observou que as crianças oscilavam entre exploração do ambiente e busca pela mãe, mostrando sinais de desconforto. Esse padrão foi descrito como apego seguro.⁴

Em pesquisas conduzidas em ratos (*Rattus norvegicus*), a manipulação neonatal induziu a déficits nos comportamentos sociais iniciais revelando ter um efeito determinante sobre o desenvolvimento do desempenho social.⁴ O estresse no início da vida na espécie tem efeitos adversos evidentes em diversos sistemas fisiológicos, mas o mais enfatizado é o aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos.⁵

Vários modelos animais foram desenvolvidos para estudar essa relação, cada um com diferentes tipos de estressores e tempos de desenvolvimento. A separação materna (SM) é uma categoria de modelos que manipula o ambiente pós-natal precoce da prole. A SM prolongada, em que a prole é removida de seu cuidador por entre 3 e 6 horas diárias, é considerada uma condição de estresse no início da vida. No entanto, os efeitos relatados da SM prolongada variam consideravelmente entre os estudos consultados. Alguns estudos sugerem que a separação materna gera aumento da ansiedade^{6,7} e prejuízo na aprendizagem de respostas de esquiva⁸. Outros indicam que ela pode ter efeito ansiolítico⁹ e melhora no desempenho em uma aprendizagem de esquiva¹⁰. A inconsistência decorre das diferenças na metodologia da separação materna, da espécie escolhida, e do momento da avaliação do desfecho e escolha do grupo controle¹⁰. Após 30 anos de estudos sobre os efeitos do manejo precoce e separação materna em ratos, foi proposto que o modelo SM180 (separação materna por 180 minutos diários), pode ser considerado um modelo evolutivo para a depressão humana¹¹, cumprindo os critérios para um modelo de depressão de alto valor de construto e validade mecanicista. Diversas pesquisas têm demonstrado que, do ponto de vista biológico, variações na relação materna e no ambiente inicial do desenvolvimento alteram desde a expressão gênica,^{12,13} até a estrutura e o funcionamento cerebral¹⁴. Gehm¹⁵ aduziu que, embora a atual concepção de maternidade permita supor que a separação materna possa gerar prejuízos nas relações sociais dos animais a ela submetidos, os resultados decorrentes do modelo SM180 não permitem estabelecer uma conclusão definitiva. Em conjunto, os dados indicam que os efeitos da separação materna são mais complexos do que meramente “melhorar ou piorar” o desempenho dos animais em contextos sociais.

Considerando a atual divergência na literatura sobre o tema, o presente estudo objetiva investigar se a separação materna prolongada, origina um fenótipo predisposto a transtornos psiquiátricos, mas que não necessariamente se exterioriza na vida adulta, a menos que haja continuidade de estímulos estressores (gatilhos). Além disso, testa a hipótese da transgeracionalidade das psicopatologias, com base no conhecimento epigenético atual.

JUSTIFICATIVA

Nemeroff (2016)³ aponta que filhos submetidos a algum tipo de estresse apresentam maiores riscos de desenvolver transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade. Outro estudo inclui alterações neuroendócrinas, além da expressão de citocinas pró-inflamatórias e alterações em áreas cerebrais relacionadas com a regulação do humor, somado à possibilidade de mecanismos epigenéticos com potencial vulnerabilidade ao desenvolvimento de doenças psíquicas.^{1,3} Contudo, o que percebemos na sociedade é que nem todos os indivíduos submetidos à separação materna na infância desenvolvem alterações psíquicas. Nesse sentido, nos perguntamos se um evento estressor na fase adulta poderia ser um fator desencadeante para a manifestação das alterações psíquicas.

Nosso estudo adotará a metodologia da separação materna prolongada na primeira infância, somado a um estímulo estressor na fase adulta em ratos Wistar, buscando a compreensão da susceptibilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, associado aos possíveis déficits nos comportamentos sociais e se essas alterações poderiam ser transmitidas a outras gerações.

Entendendo que a transgeracionalidade é representada pela experiência e conhecimentos trazidos a partir dos modelos familiares e sociais e que na maioria das vezes acontece de maneira inconsciente, perpassando entre as gerações e dimensões psíquicas¹⁶. Nesse sentido, nosso grupo se propõe a estudar a hipótese de que os transtornos psiquiátricos, associado aos possíveis déficits nos comportamentos sociais possam ser transmitidos a futuras gerações. Limitações no estudo da transgeracionalidade e da herança epigenética aplicada aos transtornos psiquiátricos em humanos, corroboram com a necessidade da caracterização de um modelo animal como uma ferramenta que permita uma melhor compreensão sobre o tema, além da possibilidade de contribuir com a possibilidade de identificar fatores que predispõe ao desenvolvimento de psicopatologias, assim como contribuir para um diagnóstico mais preciso e de repensar as formas de tratamento e intervenção a serem trabalhadas com os sujeitos acometidos por psicopatologias nesse contexto.

Buscando a integração de diferentes áreas do conhecimento e entendendo a relevância e complexidade do tema proposto, somado a diversidade de competências necessárias para execução deste projeto, adotamos a inserção de estudantes de diferentes áreas como discentes em medicina, psicologia e biomedicina, técnicas de laboratório de ciência animal da instituição UNIFESO, todos sob a orientação de docentes do curso de medicina, sendo estes profissionais das áreas de medicina veterinária e psicologia. Acreditamos que a inserção de diferentes campos do conhecimento possa contribuir de forma significativa na obtenção e análise dos dados garantindo resultados robustos e consolidados, incentivar a atuação interprofissional sendo essa para a efetivação de mudanças das práticas profissionais, na intenção de qualificar para o trabalho colaborativo.

OBJETIVOS

Primário

Analisar os impactos comportamentais da separação materna prolongada em ratos Wistar submetidos a um estímulo estressor na vida adulta.

Secundários

Analisar o comportamento de ratos (3ª geração), descendentes do cruzamento de animais consanguíneos (irmãos), portadores de transtornos psiquiátricos. Desenvolver em parceria com professores e discentes e do Curso de Graduação em Ciências da Computação, software similar ao Any-Maze Video Tracking System™ (Stoelting Co., Il. US).

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFESO) sob o n.º 553/2023. Serão utilizados 48 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade entre 1 e 90 dias e peso entre 6 e 300 g, sendo 24 machos e 24 fêmeas. Os animais serão randomizados e distribuídos nos seguintes grupos: 1. Grupo Controle (n = 12); ratos desmamados no 21º dia, sem estresse na vida adulta (90 dias); 2. Grupo Estresse Adulto (n = 12); neonatos mantidos com a presença materna até o desmame (21 dias), e submetidos a estresse na fase adulta (90 dias), por meio de isolamento social e ciclo claro de 24h por três dias consecutivos; 3. Grupo Separação Materna (n = 12); neonatos separados da mãe do 2º ao 14º dia por 3 horas diárias; 4. Grupo Separação Materna/Estresse Adulto (n = 12); neonatos separados da mãe do 2º ao 14º dia por 3 horas diárias e expostos a estímulo estressor (isolamento social e ciclo claro de 24h por três dias consecutivos) aos 90 dias. Os animais dos quatro grupos realizarão testes cognitivos e de ansiedade aos 22 e 94 dias de vida.

Modelo de Separação Materna prolongada por 3 horas diárias (Modelo SM180)

Do 2º ao 14º dia de vida, os neonatos serão submetidos ao procedimento de separação materna por 3 horas diárias. A separação materna consiste na privação diária do contato entre a prole e sua mãe por 3 horas diárias no horário das 9 às 12 h.

No início de cada período de separação, a mãe será retirada da gaiola e colocada em outra gaiola com características iguais, na mesma sala de manutenção. Em seguida, a caixa contendo os filhotes será conduzida até outra sala, com características semelhantes à anterior. Os filhotes serão, então, retirados da caixa e colocados sobre uma mesa forrada com manta térmica aquecida a 32 °C, para manter sua temperatura corporal, permanecendo nessa condição por 3 horas. Ao final do período, a prole será recolocada na gaiola e levada de volta à sala de manutenção, sendo a mãe reintroduzida nessa caixa em seguida.

Estímulo estressor na fase adulta

Os animais serão submetidos a um ciclo de luz (325 lux a 1 m do piso) ininterrupto por 36 horas e colocados em isolamento social (gaiolas individuais). Testes etológicos e laboratoriais Aos 22 e 94 dias todos os animais serão submetidos ao Teste do Campo Aberto (Open-Field test) e ao Teste do Labirinto em Cruz Elevada (*Elevated Plus Maze test*). Aos 95 dias, será realizada a colheita de sangue e determinação da concentração plasmática de corticosterona (expressa em µg/dL). Teste do Campo aberto (*Open-field Test*) O teste do campo aberto é amplamente utilizado para avaliar alterações na atividade locomotora, hiperatividade, ansiedade e comportamentos exploratórios de roedores¹⁷. O teste é realizado em um ambiente isolado e com iluminação reduzida, sendo o animal colocado no centro de uma arena circundada por paredes medindo 60x60x450 cm (largura, comprimento, altura) (Figura 1) e o seu comportamento exploratório filmado durante cinco minutos. Ao final, será analisado o comportamento do animal durante o teste, e os seguintes parâmetros serão obtidos: distância total percorrida e tempo passado na periferia e no centro da arena, sendo os dois últimos parâmetros para avaliação de comportamento do tipo ansioso. Os parâmetros serão analisados pelo software Any-Maze Video Tracking System™ (Stoelting Co., Il. US). Interpretação: Ratos exibem uma aversão natural a áreas abertas bem iluminadas. Por outro lado, eles também têm um impulso para explorar um estímulo percebido como ameaçador. A diminuição dos níveis de ansiedade leva ao aumento do comportamento exploratório. O aumento da ansiedade, em contrapartida, resultará em menos locomoção e preferência por ficar perto das paredes do campo.

Figura 1. Teste do Campo Aberto

Fonte: Autores, 2024.

Teste do Labirinto em Cruz Elevada (Elevated Plus Maze Test)

O teste do labirinto em cruz elevada é um dos testes de ansiedade mais utilizados por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, e baseia-se no comportamento natural dos animais, não oferecendo nenhum tipo de punição aos mesmos. O aparato utilizado neste teste, construído em madeira, é constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes (braços fechados) e foi a princípio utilizado para avaliar o comportamento de ratos. Os autores do teste observaram que os animais, ao serem colocados no centro do aparato, demonstravam clara tendência a explorar os braços fechados, em detrimento dos abertos. A exposição dos ratos a situações naturalmente ameaçadoras, representadas no modelo pela altura e pelo espaço aberto, explicaria a maior aversão para explorar os braços abertos. O labirinto em cruz elevada (LCE) é um teste de ansiedade amplamente utilizado tanto para a descoberta de novos agentes ansiolíticos, quanto para investigar as bases psicológicas e neuroquímicas da ansiedade (Figura 2).

Figura 2. Teste do Labirinto em Cruz Elevada

O aparato foi colocado acima da caixa do teste de campo aberto, no caso de uma eventual queda do animal. Fonte: Autores, 2024.

Determinação da concentração plasmática de corticosterona

Aos 94 dias, serão colhidas, em todos os animais, amostras de sangue total (0,5 ml) pela veia femoral. As amostras serão enviadas a laboratório de análises clínicas, particular para determinação da corticosterona plasmática. Os resultados serão expressos em $\mu\text{g/dL}$. Em seguida, os animais serão eutanasiados, segundo as Diretrizes para a Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (RN n.º 37/2018).

Coleta e análise dos dados

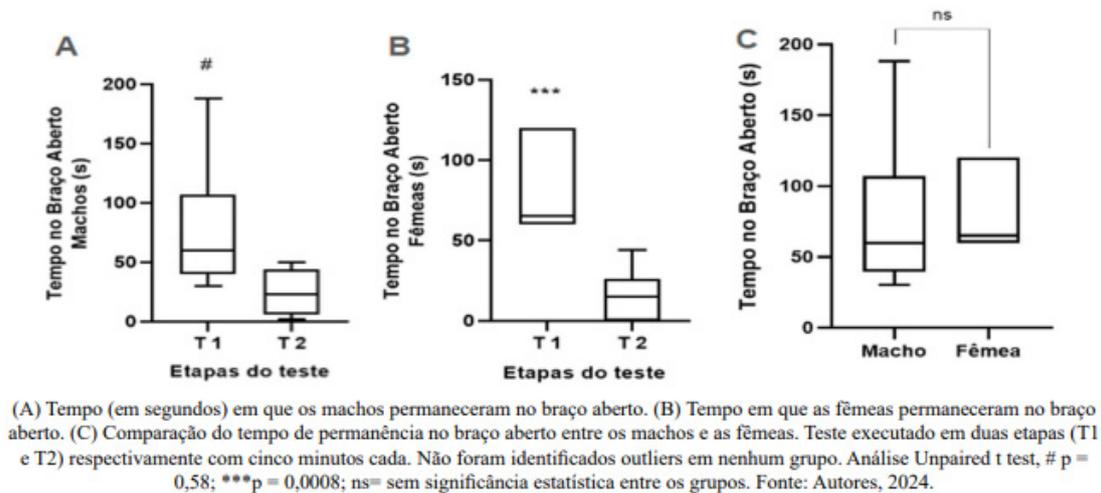
Todos os dados coletados em ambas as etapas serão analisados com auxílio do GraphPad Prism v.8. pela análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), tendo como fatores animais que mantiveram o vínculo com a mãe e animais sem vínculo com a mãe. Os gráficos serão expressos na forma de Média \pm Erro Padrão da Média e será adotada significância estatística quando o valor de p obtido for igual ou inferior a 0,05.

Análise da transgeracionalidade do transtorno psiquiátrico

Após a coleta e análise dos dados obtidos na primeira etapa da pesquisa, os animais identificados como portadores dos graus mais elevados de ansiedade (machos e fêmeas) serão selecionados e acasalados. Após o nascimento da prole, esses animais serão submetidos ao modelo de origem paterna. Tal procedimento será reproduzido por três gerações consecutivas (F1, F2 e F3). Ao término dessa etapa, todos os animais nascidos serão criados com a presença materna e submetidos aos testes descritos aos 90 dias. A etapa busca analisar a transgeracionalidade do transtorno psiquiátrico. Em todas as proles (F1, F2 e F3), o número de nascidos será limitado a seis animais, a fim de se obter homogeneidade dos dados.

RESULTADOS PRELIMINARES

O Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*) é um teste utilizado em diferentes estudos com roedores com objetivo de analisar o comportamento do tipo ansioso.¹⁶⁻¹⁸ Foi realizada uma análise comparativa do tempo de permanência do animal no braço aberto e no braço fechado. O teste foi realizado em duas etapas (T1 e T2) com 300 segundos cada etapa com intervalo de 300 segundos entre elas (Figura 3A, 1B). Em T1, os machos do Grupo Controle (GC) apresentaram uma média de 76,83, mediana de 60,00, percentil de 25% e 75% foi 39,75 e 107 respectivamente, já em T2, os animais obtiveram a média de 24,50, mediana de 23,00, o percentil de 25% e 75% = 5,75 e 44,0 respectivamente, sendo o valor de $p\# = 0,058$ e a diferença entre médias \pm SEM: $52,33 \pm 24,54$. Já as fêmeas do GC, em T1, obtiveram a média de 81,67, mediana 65,00, o percentil de 25% e 75% = 60,00 e 120,00 respectivamente. Em T2, as fêmeas apresentaram a média de 15,67, mediana de 15,00, o percentil de 25% e 75% = 0,00 e 26,0 respectivamente, sendo o valor de $p^{***} = 0,0008$ e a diferença entre médias \pm SEM: $66,00 \pm 13,96$. Os resultados configuraram um perfil explorador característico de ratos adultos Wistar saudáveis. Os resultados demonstram que em T1 tanto os machos quanto as fêmeas permaneceram por maior tempo no braço aberto em relação à segunda exposição em T2 (Figura 3A, 1B). Neste estudo, também buscou-se avaliar a diferença comportamental entre os gêneros (Figura 3 C) no tempo de permanência no braço aberto. Os machos do GC apresentaram uma média de 76,83, mediana de 60,00, o percentil de 25% e 75% = 39,75 e 107,00 respectivamente. As fêmeas do GC obtiveram a média de 81,67, a mediana de 65,00, o percentil de 25% e 75% = 60,00 e 120,00 respectivamente, valor de $p = 0,857$ e a diferença entre médias \pm SEM: $4,833 \pm 26,30$, sendo possível observar que não houve diferença comportamental em relação ao gênero, onde machos e fêmeas permaneceram por tempo semelhante no braço aberto em T1.

Figura 3. Análise comportamental do GC no teste do labirinto em cruz elevada (LCE)


O Teste de Campo Aberto (*Open Field Test*) é uma ferramenta versátil e comumente utilizado para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade e depressão, além de possibilitar a análise de outros parâmetros como locomoção e atividade exploratória.¹⁹⁻²¹ Nesse estudo foram analisados diferentes parâmetros como locomoção, atitude de autocuidado/limpeza, e exploratória. A locomoção foi representada pela análise do número de vezes que os animais entraram no quadrado demarcado na arena e o número de cruzamento dos mesmos (Figura 4 A, 2B) respectivamente, nesse sentido observamos que os machos do GC apresentaram uma média de 73,67, mediana de 66,50, percentil de 25% e 75% = 53,50 e 94,25 respectivamente e média do grupo de fêmea foi de 81,17, mediana de 91,00, o percentil de 25% e 75% = 43,25 e 116,5 respectivamente em relação ao número de entradas no quadrado demarcado, sendo o valor de $p = 0,57$ e a diferença entre médias \pm SEM: $7,500 \pm 22,51$.

Quanto ao cruzamento dos quadrados os machos obtiveram a média de 1,0, mediana de 1,0, percentil de 25% e 75% = 0,00 e 2,0 respectivamente. As fêmeas do GC obtiveram a média de 1,3, mediana de 1,0, o percentil de 25% e 75% = 1,0 e 2,0 respectivamente, o valor de $p = 0,25$ e a diferença entre médias \pm SEM: $0,333 \pm 0,421$. Portanto, ambos os grupos apresentaram características de locomoção semelhantes e compatíveis com a normalidade, sugerindo nenhum déficit locomotor presente em ambos os grupos.

A atitude de autocuidado/limpeza representada pelo “grooming” explicita uma atividade natural do animal, contudo a intensidade ou diminuição desse comportamento pode denotar alterações caracterizadas por comportamento do tipo ansioso e/ou depressivo respectivamente. Observa-se na figura 2 C que durante o teste, os machos do GC apresentaram uma média de 0,83, mediana 1,0, o percentil de 25% e 75% = 0,75 e 1,0 respectivamente. As fêmeas do GC obtiveram a média de 0,83, mediana de 1,0, o percentil de 25% e 75% = 0,75 e 1,0 respectivamente e a diferença entre médias \pm SEM: $0,0 \pm 0,235$. Sendo assim, os dois grupos apresentaram “grooming”, não sendo identificada diferença entre os grupos, contudo ressaltamos um número de apenas uma atividade de “grooming” realizada em ambos os grupos de animais controle.

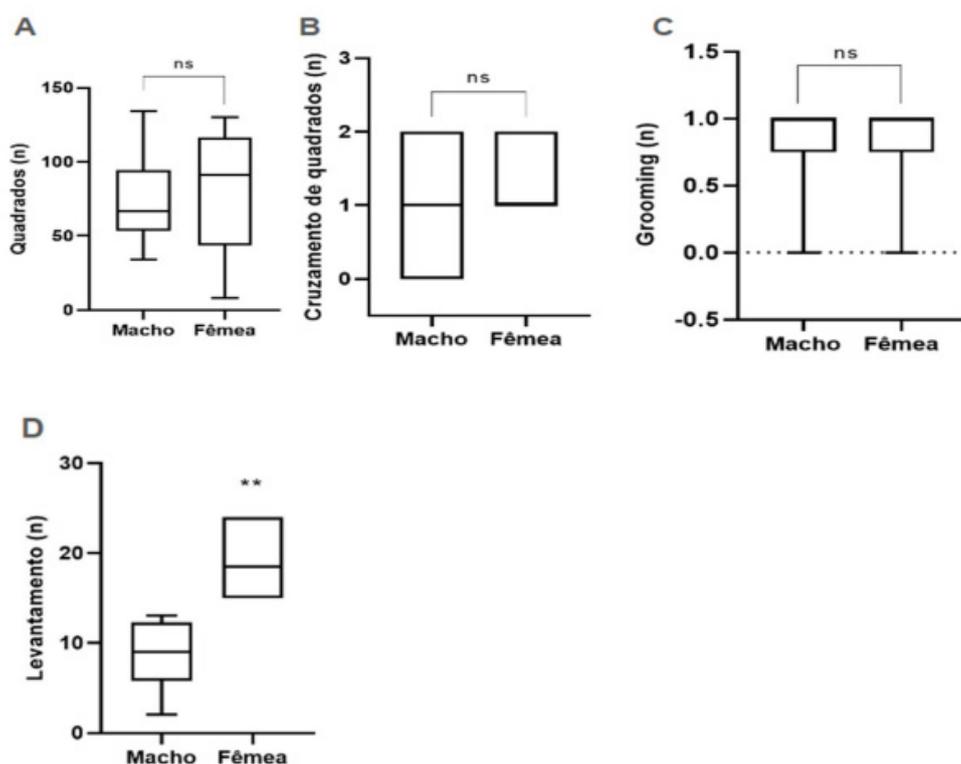
Quanto à atividade exploratória, foram analisadas duas atitudes comportamentais: o levantamento (“*rearing*”), onde o animal fica apoiado sobre as patas traseiras e realiza o deslocamento das patas dianteiras para posição superior à originalmente ocupada (Figura 4 D), e a atitude de roer (Figura 4 E), característica intrínseca presentes nos roedores. Na figura 4 D observa-se que machos do GC apresentaram uma média de 8,667, mediana de 9,00, o percentil de 25% e 75% = 5,75 e 12,25 respectivamente. As fêmeas do GC obtiveram a média de 19,17, mediana de 18,50, o percentil de 25% e 75% = 15 e 24,0 respectivamente e a diferença entre médias

\pm SEM: $10,50 \pm 2,396$. Ambos os grupos apresentaram características exploratórias satisfatórias, no entanto, as fêmeas apresentaram atitudes exploratórias superiores aos machos com valor estatístico de $p^{**} = 0,0014$.

Como esperado, no comportamento de roer (Figura 4 E), ambos os grupos demonstraram tal atitude, contudo não se observou diferença significativa entre os grupos. Os machos do GC apresentaram uma média de 2,16, mediana de 1,0, o percentil de 25% e 75% = 0,00 e 5,25 respectivamente. As fêmeas do GC obtiveram a média de 4,33, mediana de 4,0, o percentil de 25% e 75% = 3 e 5,5 respectivamente, valor de $p = 0,12$ e a diferença entre médias \pm SEM: $2,167 \pm 1,293$.

Juntos esses resultados sugeriram que os animais do GC, tanto macho como fêmeas não apresentaram alterações nos parâmetros de locomoção, autocuidado e exploração do ambiente, podendo ser considerados animais com características comportamentais no padrão de normalidade, entretanto, as fêmeas parecem apresentar um fenótipo mais explorador que os machos.

Figura 4. Análise comportamental do GC no teste do campo aberto (CA)



Número (n) de vezes em que os machos e fêmeas entraram no quadrado demarcado. (B) Número de vezes em que os machos e fêmeas cruzaram ou atravessaram o quadrado demarcado, representando também a capacidade de locomoção do animal. (C) Número de vezes em que os machos e fêmeas realizaram o movimento de grooming. (D) Número de vezes em que os machos e fêmeas realizaram a exploração do ambiente, representado pela atitude de levantamento (ficar sobre as duas patas traseiras). Teste executado em cinco minutos. Não foram identificados outliers em nenhum grupo. Análise Unpaired t test, $**p = 0,0014$; ns = sem significância estatística entre os grupos. Fonte: Autores, 2024.

DISCUSSÃO

Estudos com modelos animais, sugerem que o estresse na primeira infância pode contribuir com vulnerabilidades no desenvolvimento em diferentes sistemas fisiológicos, destacando-se as alterações no desenvolvimento comportamental. O modelo de separação materna tem sido utilizado como uma ferramenta estressora na primeira infância capaz de induzir, no modelo animal, um fenótipo do tipo ansioso.^{6,7} Nesse contexto, os testes de labirinto em cruz elevada e campo aberto tornam-se uma ferramenta útil, por serem frequentemente utilizados nos estudos em doenças neuropsiquiátricas, permitindo avaliar o perfil do comportamento do tipo ansioso e depressivo, além da possibilidade de análise de outros parâmetros como locomoção e atividade exploratória.¹⁶⁻²²

Como etapa inicial deste estudo, foi analisado o comportamento dos ratos Wistar adultos, tanto machos quanto fêmeas, que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse, no teste de labirinto em cruz elevada. Observou-se que os animais não apresentaram alterações comportamentais do tipo ansioso, explorando um tempo maior na primeira etapa do teste (T1) o braço aberto em detrimento ao braço fechado.

Inferido uma característica exploratória esperada nos animais controle, corroborando com o encontrado na literatura, onde animais saudáveis tendem a explorar mais tempo o braço aberto em T1, uma vez que em T2 os animais já haviam tido contato prévio com os perigos inerentes a exposição e altura representada pelo braço aberto. Na primeira exposição (T1) é normal que os animais explorem o ambiente na identificação espacial em relação às oportunidades e aos perigos. No segundo momento (T2), após a exposição prévia em T1, os animais já conheciam as situações ameaçadoras representadas pela altura e pelo espaço aberto do aparato, demonstrando maior aversão em explorar os braços abertos. Portanto, os resultados apresentados aventam que os animais do Grupo Controle, tanto machos quanto fêmeas não apresentaram comportamento do tipo ansioso à medida que ambos os grupos exploraram o braço aberto do aparato do teste de labirinto em cruz elevada na primeira etapa do teste.

Curiosamente não foi observada diferença entre os grupos de machos e fêmeas. Alguns autores discutem alguns fatores intrínsecos capazes de modular a resposta dos animais submetidos ao teste de labirinto em cruz elevada, dentre esses fatores destaca-se a diferença entre os gêneros, onde animais fêmeas podem apresentar um número de entradas e permanência no braço aberto superior em relação aos machos.²³ Contudo, a igualdade entre os gêneros podem ser observada sem caracterizar nenhum distúrbio comportamental, uma vez que fatores extrínsecos como ambiente, climatização da sala, iluminação e até mesmo o período estral das fêmeas podem influenciar no comportamento dos animais. Nesse sentido, as análises futuras seguirão as mesmas técnicas adotadas nesta fase do estudo, para minimizar o viés garantindo a reprodutibilidade do estudo. Neste primeiro momento, sugere-se que os animais controles machos e fêmeas apresentam características comportamentais sem alterações, ratificando a utilização desses animais como um controle adequado ao estudo proposto.

Outros parâmetros que permitam avaliar o comportamento dos animais que mimetizam alterações psíquicas em humanos são atividades como locomoção, autocuidado e exploração do ambiente através do teste de campo aberto.^{20,21} No presente estudo observa-se que os animais do GC, tanto machos quanto fêmeas apresentaram características de locomoção e autocuidado semelhantes. Diferentes autores que utilizaram o teste de campo aberto tanto para análise em modelos que induzem comportamentos do tipo depressivo, como em processos infecciosos e neurodegenerativos, demonstraram que os animais controle tendem a se locomover mais em relação ao grupo afetado. Quanto ao parâmetro de autocuidado, explicitado como grooming, a menos que os animais tenham sido submetidos a algum estímulo agressor, o grooming não é observado com tanta intensidade, contudo é uma característica intrínseca do animal.²⁴

Na atividade exploratória, as fêmeas apresentaram uma característica superior aos machos, corroborando com visto no teste de labirinto em cruz elevada onde as fêmeas apresentaram uma diferença significativamente

maior ($p = 0,0008$), que os machos ($p = 0,58$) no tempo de permanência no braço aberto. Knight e colaboradores (2021)²⁵ exploraram as diferenças sexuais em parâmetros de ansiedade e atividade no teste de labirinto em cruz elevada e no teste de campo aberto, identificando que as fêmeas ficaram por um tempo maior no braço aberto, assim como passaram mais tempo na zona central do aparato do campo aberto, além de percorrer uma distância maior em relação aos machos. Os autores observaram também uma correlação positiva entre as entradas no braço aberto no labirinto em cruz elevada e entradas na zona central do campo aberto, inferindo que as fêmeas parecem exibir um menor comportamento semelhante à ansiedade e depressão nos testes de labirinto em cruz elevada e campo aberto, corroborando com os dados apresentados neste estudo.

Diante do exposto, inferimos que dentre os parâmetros comportamentais analisados, machos e fêmeas apresentaram características fenotípicas dentro da normalidade reproduzindo o que já se tem descrito na literatura onde as fêmeas saudáveis tendem a apresentar um fenótipo mais explorador que os machos, o qual se acredita estar relacionado a características intrínsecas do animal como ciclo estral, instinto materno como a necessidade de construção do ninho, de maneira a assegurar a segurança da prole futura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Caracterizou-se o comportamento de machos e fêmeas do Grupo Controle da Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, quando submetidos aos testes do labirinto em cruz elevada e do campo aberto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finkler A. Efeitos comportamentais da adoção sobre a relação mãe-filhote no início do desenvolvimento pós-natal em ratos. 2019. Tese [Doutorado em Neurociências] - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/203864>.
2. Freud S. Os instintos e suas vicissitudes. In: Freud S. A história do movimento psicanalítico, Artigos sobre a metapsicologia e outros trabalhos (1914–1916). Edição Standard Brasileira das Obras Psicológicas Completas de Sigmund Freud. Volume XIV. Rio de Janeiro: Imago, 2006.
3. Nemeroff CB. Paradise Lost: The Neurobiological and Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect”. *Neuron*, 2016;89(5):892–909. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.019.
4. Karkow ARM. Efeitos da manipulação neonatal sobre comportamentos sociais e a expressão de receptores de ocitocina em ratos neonatos e juvenis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Porto Alegre, 2013. 96p. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/83818>.
5. Bick J, Nelson CA. Early adverse experiences and the developing brain. *Neuropsychopharmacology*, 2016;41:177–96. doi: 10.1038/npp.2015.252.
6. Bailoo JD, Jordan RL, Garza XJ, Tyler AN. Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol*, 2014;56(4):674-85. doi: 10.1002/dev.21135.
7. Sousa VC, Vital J, Costenla AR, Batalha VL, Sebastião AM, Ribeiro JA, Lopes LV. Maternal separation impairs long term-potentiation in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiol Aging*, 2014;35(7):1680-5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.024.
8. Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1999;64(4):705-15. doi: 10.1016/s0091-3057(99)00150-1.

9. Rodrigues DAL, Dueñas Z. Maternal separation during breastfeeding induces gender-dependent changes in anxiety and the GABA-A receptor alpha-subunit in adult Wistar rats. *PLoS ONE*, 2013;8(6):e68010. doi: 10.1371/journal.pone.0068010.
10. Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: Consistent or confusing? *Rev Neurosci*, 2000;11:383–408. doi: 10.1515/REVENURO.2000.11.4.383.
11. Thierry B, Steru L, Chermat R, Simon P. Searching Waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav Neural Biol*, 1984;41:180–9. doi: 10.1016/s0163-1047(84)90555-7.
12. Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, Caldji C, Bredy T, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic Programming of Stress Responses through Variations in Maternal Care. *Ann N Y Acad Sci*, 2004;1036:167–80. doi: 10.1196/annals.1330.011.
13. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Journal Epigenetics*, 2008;3:97-106. doi: 10.4161/epi.3.2.6034.
14. Korraa AA, Nagger AAI, Mohamed RAE, Helmy MN. Impact of kangaroo mother care on cerebral blood flow of preterm infants. *Ital J Pediatr*, 2014;40(83):1-6. doi: 10.1186/s13052-014-0083-5.
15. Gehm TP. Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de respostas sociais em ratos / São Paulo. 114 f. Tese [Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental]. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.47.2018.tde-05022018-150751.
16. Briley M, Chopin P, Veigner M. The “anxiety maze test”: validation in different rat strains and effect of a wide range of antidepressants. *Br. J. Pharmacology*. 87:217p. (1986).
17. Silva RH, Frussa-Filho R. The plus-maze discriminative avoidance task: A new model for studying memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *J Neurosci Métodos*. 30 de outubro de 2000; 102(2):117-25. doi: 10.1016/s0165-0270(00)00289-2.
18. Pinto WBVR, Ko GM, Valero-Lapchick VB, Ariza CB, Porcionatto M. Teste de labirinto em cruz elevado: Aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *RESBCAL*. 2012;1(1):102-20.
19. Tremml P, Lipp H-P, Müller U, Ricceri L, Wolf DP. Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified β -amyloid precursor protein gene. *Behav Brain Res*, 1998;9(1):65-76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432897002118>
20. Burek DJ, Massaly N, Doering M, Zec A, Gaelen J, Morón JA. Long-term inflammatory pain does not affect exploratory behavior and stress coping strategies in mice. *Pain*. 2021; 162(6):1705-1721. doi 10.1097/j.pain.0000000000002179.
21. Rosso M, Wirz R, Loretan AV, Sutter NA, Pereira da Cunha CT, Jaric I, Würbel H, Voelkl B. Reliability of common mouse behavioural tests of anxiety: A systematic review and meta-analysis on the effects of anxiolytics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022; 143:104928. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104928.
22. Kraeuter AK, PC, Sarnyai Z. The open field test to measure locomotor activity and anxious behavior. *Mol Biol Methods*. 2019;1916:99-103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
23. Júnior AG, Morato, S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Inter Psicol (Brazil)*. 2002; 6(2):141-8. doi:10.5380/psi. v6i2.3301.
24. Lopez DC, White ZJ, Hall SE. Anxiety in Alzheimer’s disease rats is independent of memory and impacted by genotype, age, sex, and exercise. *Alzheimers Dement*. 2024;20(5):3543-3550. doi: 10.1002/alz.13813.
25. Knight P, Chellian R, Wilson R, Behnood-Rod A, Panunzio S, Bruijnzeel AW. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2021; 204:173168. doi: 10.1016/j.pbb.2021.173168.

FERRAMENTA DE VISÃO COMPUTACIONAL PARA SUPORTE AO TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN FIELD TEST)

Alberto Torres Angonese¹, João Pedro Moreira Ferreira¹, Marcel Vasconcellos², Rafael Soares Areal Costa³, Valéria Cristina Lopes Marques³, Arthur da Conceição Cunha⁴, Gustavo Mattos Rodrigues⁴, Marco Antônio Araujo de Almeida⁴, Ana Beatriz Rocha Câmara⁵, Pedro Augusto da Costa⁵, Tayna Mendes Maurat⁶

1 - Docente da Ciência da Computação do UNIFESO; 2 - Docente da Medicina do UNIFESO; 3 - Técnico Administrativo do UNIFESO; 4 - Discente do Curso de Ciência da Computação do UNIFESO; 5 - Discente do Curso de Biomedicina do UNIFESO; 6 - Discente do Curso de Medicina Veterinária do UNIFESO

RESUMO

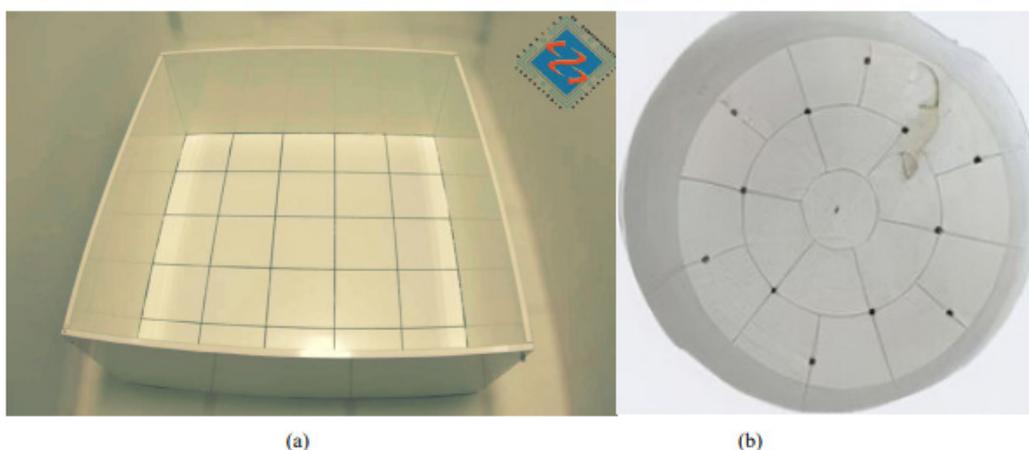
O presente artigo apresenta a etapa inicial de desenvolvimento da ferramenta de Visão Computacional para apoio ao Teste de Campo Aberto. O objetivo do projeto é proporcionar aos alunos a oportunidade de interagir com ferramentas tecnológicas avançadas, promovendo o desenvolvimento de habilidades em pesquisa e inovação. A proposta inclui a criação de uma solução automatizada para o Teste de Campo Aberto, um método utilizado para avaliar o comportamento de roedores, especialmente ratos, em ambientes controlados. Atualmente, essa avaliação é feita manualmente pelos alunos e pesquisadores do Biotério do Unifeso, o que pode resultar em análises menos precisas e mais trabalhosas. Através da integração entre os cursos de Ciência da Computação, Medicina Veterinária, Biomedicina, Farmácia e Psicologia, o projeto busca desenvolver uma ferramenta baseada em técnicas de Visão Computacional. Essa ferramenta permitirá o rastreamento automatizado dos padrões de movimentação dos roedores, facilitando a mensuração de comportamentos que indicam níveis de ansiedade e memória. A colaboração entre alunos de diferentes áreas será essencial para identificar as necessidades específicas do Teste de Campo Aberto e assegurar que a solução desenvolvida atenda a essas exigências. Além de contribuir para a formação acadêmica e profissional dos estudantes envolvidos, o projeto tem relevância educacional ao incentivar o uso de tecnologias avançadas no processo de aprendizagem e pesquisa. Em resumo, espera-se que o projeto resulte na criação de uma ferramenta eficaz e prática para o Teste de Campo Aberto, com benefícios diretos para os cursos envolvidos e para a qualidade das pesquisas realizadas no Unifeso.

Palavras-chave: Teste de Campo Aberto; Visão Computacional; Biotério.

INTRODUÇÃO

O Teste de Campo Aberto foi proposto por Calvin S. Hall em 1932 (HALL, 1932), que apesar de antigo, apresenta bastante aplicabilidade nos dias atuais para apoio à estudos nas áreas psicológicas e farmacológicas. O Teste de Campo Aberto é um teste que permite avaliar padrões comportamentais, através do rastreamento da locomoção de roedores, habitualmente ratos, durante um tempo definido. Para o teste utiliza-se uma arena, circular (Figura 1b) ou quadrada (Figura 1a), delimitada por paredes e com a área interna demarcada por linhas que se cruzam. Tais linhas formam uma grade interna, que permitem a definição da posição e distância percorrida pelo do roedor, dadas as dimensões conhecidas da arena e áreas internas (SOUZA et al, 2013).

Figura 1: Tipos de arena do Teste de Campo Aberto.



FONTE: Laboratório de Genética Comportamental UFSC, (SOUZA et al, 2013)

Padrões comportamentais que indicam níveis de ansiedade e memória podem ser mensuráveis pelo rastreamento da movimentação do animal (STANTFORD, 2007). Podem ser observados a frequência com que o roedor cruza linhas de grade com todas as quatro patas, frequência e tempo de permanência na área central, frequência com que o animal se movimenta próximo às paredes, dentre outras. Os desafios do Teste de Campo Aberto, estão justamente na identificação visual assertiva dos padrões de comportamento, o que exige um treinamento e experiência adequados para a obtenção de diagnósticos precisos.

O trabalho descrito neste projeto apresenta a proposta de desenvolvimento de uma ferramenta de Visão Computacional, cujo objetivo é automatizar o processo de identificação visual dos padrões de movimentação dos animais, durante o Teste de Campo Aberto. Espera-se com isso, que a ferramenta possa auxiliar no processo de obtenção de diagnósticos mais precisos.

Visão Computacional é uma área da Inteligência Artificial que trabalha com dados visuais, isto é, imagens, vídeos, etc. O principal objetivo dos algoritmos desenvolvidos nesta área é interpretar os dados visuais adquiridos do ambiente a fim de fornecer informações relevantes aos usuários, ou a modelos de tomada de decisão (WECHSLER, 2014). Dentre as tarefas que Visão Computacional almeja abordar, pode-se citar, detecção de objetos, reconhecimento de faces, classificação de objetos, todos esses problemas utilizando apenas dados visuais. Um exemplo de aplicação são os carros autônomos, que precisam detectar e reconhecer pedestres, sinais de trânsito, etc., na grande maioria das vezes utilizando apenas informações visuais da cena.

Neste trabalho a Visão Computacional será empregada através de técnicas (algoritmos) serão avaliadas para a detecção e rastreamento dos animais durante o Teste de Campo Aberto, com o objetivo de automatização dos experimentos a serem realizados.

JUSTIFICATIVA

Atualmente o Unifeso possui uma arena para a realização do Teste de Campo Aberto, conforme ilustrado na Figura 2, que fica localizada no Biotério da instituição no Campus Quinta do Paraíso. A arena está disponível para ser utilizada pelos cursos de Medicina, Biomedicina, Farmácia, Medicina Veterinária e Psicologia para a realização de experimentos.

Figura 2: Arena do Teste de Campo Aberto do Unifeso.



FONTE: Próprio Autor

Apesar da arena atender satisfatoriamente ao propósito da realização do Teste de Campo Aberto, todo o processo de observação comportamental dos roedores durante os experimentos é realizada de forma manual, como pode ser observado na Figura 2. O procedimento realizado dessa forma, necessita de atenção e cuidados redobrados para que as observações gerem diagnósticos corretos. Nesse sentido, a automatização do processo de observabilidade dos padrões de movimentação durante um experimento, pode auxiliar em diagnósticos mais precisos. Para tal, é proposto, neste projeto, o desenvolvimento de uma ferramenta de Visão Computacional para rastreamento dos roedores na arena do Teste de Campo Aberto.

Reforçamos que uma ferramenta comercial, com propósitos semelhantes, custa em torno de US\$ 7.500,00 (ANY-MAZE, 2023). Adicionalmente ao ganho de conhecimento que se pretende obter durante o desenvolvimento da ferramenta, vislumbramos a possibilidade de amadurecimento do projeto para a geração de um produto com aplicações relevantes à instituição.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral é o desenvolvimento de uma ferramenta de Visão Computacional para a rastreabilidade de movimentação de roedores durante a realização do Teste de Campo Aberto.

Objetivos específicos

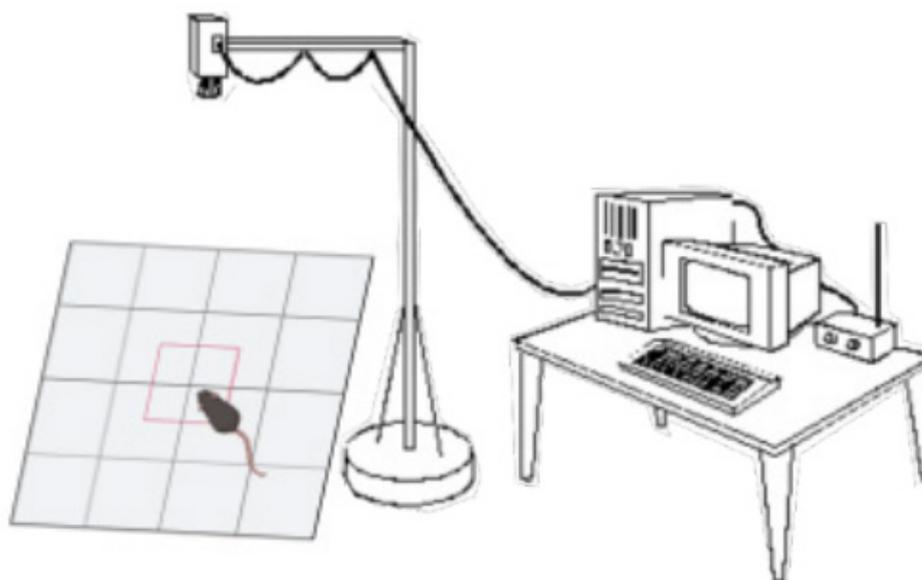
Para que o objetivo geral seja alcançado, são propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Revisão de literatura, tanto da parte dos alunos de computação quanto dos alunos relacionados ao Biotério;
2. Aprendizagem, implementação, teste e validação da detecção de roedores utilizando a técnica de Visão Computacional HOG (Histogramas de Gradientes Orientados);
3. Avaliação da técnica utilizando as métricas de acurácia e precisão;
4. Aprendizagem, implementação, teste e validação da detecção de roedores utilizando a técnica de Visão Computacional CNN (Redes Neurais Convolucionais);
5. Avaliação da técnica utilizando as métricas de acurácia e precisão;
6. Testes em ambiente real da arena do biotério para escolha da técnica com melhor desempenho;
7. Implementação de ajustes e modificações na ferramenta de acordo com as avaliações dos alunos relacionados ao Biotério para que os critérios de observabilidade sejam satisfatórios.

MÉTODOS

A proposta da ferramenta é realizar o rastreamento automatizado dos padrões de movimentação dos roedores na arena utilizando técnicas de Visão Computacional. Para isso, a abordagem inicial prevê a construção de um arcabouço, conforme ilustrado na Figura 3. O arcabouço deverá conter uma estrutura para acomodação de uma câmera, necessária para a aquisição das imagens em tempo real, durante a realização do Teste de Campo Aberto, e um computador conectado à câmera, em que será executado o programa de rastreamento por Visão Computacional.

Figura 3: Arcabouço da Ferramenta de Visão Computacional.



FONTE: Adaptada de (DA ROSA, 2014)

Para o desenvolvimento do projeto será necessário a integração entre os alunos do curso de Ciência da Computação e alunos de cursos que utilizem a arena para o Teste de Campo Aberto do Biotério do Unifeso.

Preliminarmente está sendo adotada a avaliação comparativa de duas técnicas de Visão Computacional conhecidas, como proposta de solução para a detecção e rastreamento de roedores no Teste de Campo Aberto.

Serão utilizados como critérios de comparação os parâmetros de desempenho computacional e acurácia de detecção para definição da posição e distância percorrida do roedor na arena. A primeira técnica empregada será a detecção utilizando HOG (Histogramas de Gradientes Orientados), (TOMASI, 2012) e a segunda utilizando CNN (Redes Neurais Convolucionais). A primeira técnica é um descritor de características utilizado para detecção de objetos, que apresenta um bom desempenho computacional (DALAL et al, 2005), já a segunda é uma rede neural de aprendizado profundo, notoriamente conhecida pelos altos percentuais de acurácia (DIWAN et al, 2023). O objetivo é avaliá-las conforme o problema proposto no cenário de aplicação do Biotério da Unifeso.]

O desenvolvimento das atividades será executado pelos alunos do Curso de Ciência da Computação em conjunto com os alunos relacionados nas tarefas do Biotério, que se reunirão com frequência semanal para discussão e apresentação do andamento das atividades, conforme tarefas previstas no plano de trabalho individualizado.

Coleta de dados

As estratégias de coleta de dados adotadas no projeto se limitam às métricas de acurácia e precisão do processo de detecção do roedor pelo processo de visão computacional em tempo real durante a execução de um experimento na arena do Teste de Campo Aberto. As métricas adotadas somente servirão para a definição da técnica que melhor se adequa ao cenário proposto.

Considerando que os dados coletados se resumem às imagens dos vídeos e o experimento não envolve diretamente a pesquisa com o animal, entendemos que o projeto não se enquadra para ser submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Reforçamos ainda que projetos dos cursos de saúde que utilizam a arena para execução do Teste de Campo Aberto, cujos experimentos servirão de base para validação da ferramenta computacional, já tem aprovação do CEUA. Um dos exemplos é o projeto intitulado Análise Comportamental de Filhotes de Ratos Wistar Submetidos à Separação Materna: Um Estudo Transgeracional, que está aprovado pelo CEUA/UNIFESO sob nº 553/23, (LOBATO et al, 2023).

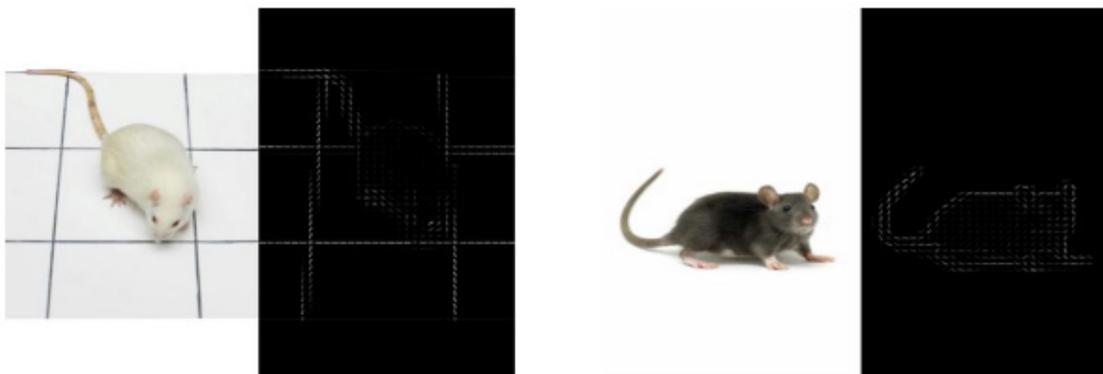
EXPERIMENTOS E RESULTADOS PRELIMINARES

Os alunos dos cursos de Ciência da Computação, Biomedicina e Veterinária se reuniram para a troca de ideias, compartilhamento dos conhecimentos próprios de cada área e planejamento dos primeiros passos.

Preliminarmente, foi desenvolvido um script em Python para implementação inicial da técnica de visão computacional HOG. Foram selecionadas imagens de ratos e aplicadas ao script para verificação do processo de extração de características, conforme ilustrado na Figura 4. A figura apresenta a imagem do rato inserida no script e imediatamente a direita a imagem de saída após a execução do script. O resultado esperado do experimento foi a extração das características, pela aplicação do HOG e a geração de uma imagem com os contornos do rato, conforme a imagem de entrada.

É possível observar, que a imagem à esquerda da Figura 4 é de um rato branco em cima de uma superfície branca, já a da direita é de um rato escuro em uma superfície branca. Nesse cenário, a aplicação do HOG na imagem do rato à esquerda gerou uma extração de características com baixa resolução em relação à imagem do rato à direita da figura. Isso se deve em virtude do HOG trabalhar com a avaliação da magnitude do gradiente da imagem, o que significa que imagens que possuem maior realce apresentem resultados de extração de contornos mais definidos.

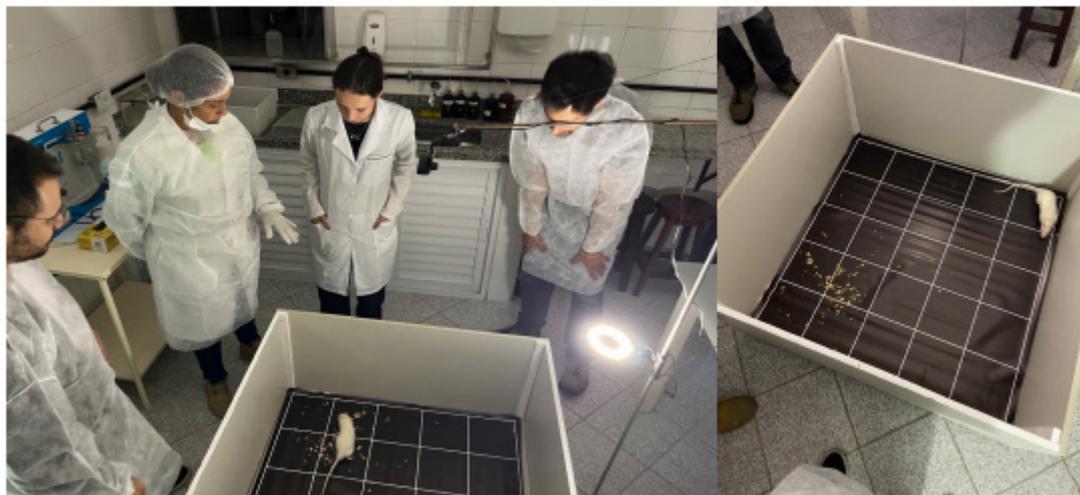
Figura 4: Resultados da extração de Característica pelo HOG



FONTE: Próprio autor

Após realização de outros testes, foi proposta a alteração do fundo da arena do Biotério para preto com as delimitações em branco, conforme pode ser observado na Figura 5.

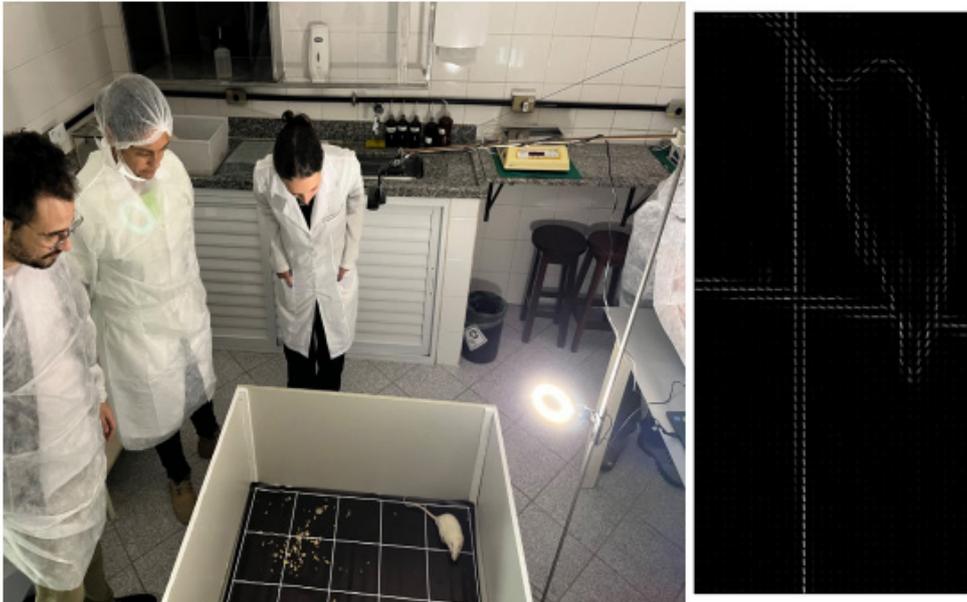
Figura 5: Arena do Teste de Campo Aberto do Unifeso com fundo preto



FONTE: Próprio Autor

Foi projetado um aparato com câmera e iluminação ajustáveis, permitindo uma melhor aquisição das imagens e dos vídeos de ratos realizando o Teste de Campo Aberto na arena adaptada com fundo preto. Foram realizados novos testes no script para extração de características com imagens extraídas da nova arena, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Resultados da extração de Característica pelo HOG na Arena do Teste de Campo Aberto do Unifeso com fundo preto



FONTE: Próprio Autor

A imagem à direita da Figura 6 ilustra o resultado do HOG obtido de um crop da imagem da esquerda, conforme ilustrado pela caixa delimitadora em verde. Pelo resultado obtido é possível observar uma melhoria na extração das características HOG, indicando uma melhor detecção do rato na nova arena. Na Figura 6 também é possível visualizar parte da equipe durante a execução dos testes no Biotério do Unifeso. Na figura se destacam, a responsável pelo Biotério, um aluno de Computação e uma aluna de Veterinária.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente artigo foram apresentados os trabalhos preliminares realizados para o desenvolvimento da ferramenta de visão computacional para apoio ao teste de campo aberto.

A equipe de alunos dos cursos de Ciência da Computação, Biomedicina e Veterinária reuniu-se para planejamento dos primeiros passos. A equipe do curso de Ciência da Computação desenvolveu um script em Python para implementação da técnica HOG, a fim de realizar os primeiros testes de detecção dos ratos com a técnica. Foi contatado que o realce de ratos brancos em fundo branco gera uma extração de características com pouca definição, podendo dificultar o processo de detecção. A equipe do Biotério adaptou a arena existente colocando um fundo preto. Foi criado um aparato com câmera e iluminação ajustáveis para a aquisição de imagens com melhor qualidade.

Após esses ajustes, novos testes foram realizados com o script gerado. Os resultados apresentaram uma melhor definição das características HOG indicando uma melhor detecção.

Para as próximas fases a equipe continuará com os testes com a técnica HOG e serão adicionadas no script, funcionalidades de rastreamento para detecção dos ratos em tempo real.

REFERÊNCIAS

1. ANY-MAZE. Full License Pricing, 2024. Disponível em <https://www.any-maze.com/pricing/>. Acessado em : 09/02/2024
2. DALAL, Navneet; TRIGGS, Bill. Histograms of oriented gradients for human detection. In: 2005 IEEE computer society conference on computer vision and pattern recognition (CVPR'05). Ieee, 2005. p. 886-893.
3. DA ROSA, Johnathan Fercher. Construção de um time de futebol de robôs para a categoria IEEE Very Small Size Soccer. 2015.
4. DIWAN, Tausif; ANIRUDH, G.; TEMBHURNE, Jitendra V. Object detection using YOLO: Challenges, architectural successors, datasets and applications. *Multimedia Tools and Applications*, v. 82, n. 6, p. 9243-9275, 2023.
5. DU, Juan. Understanding of object detection based on CNN family and YOLO. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2018. p. 012029.
6. HALL, Calvin; BALLACHEY, Egerton L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology, 1932.
7. LOBATO, R Geórgia; ARAÚJO, M. B. Suzana; PINHEIRO, M. Bruna; CÂMARA, R. Ana Beatriz; SILVA, P.M. Aline; MARQUES, C.L. Valéria; VASCONCELLOS, Marcel. Análise Comportamental de Filhotes de Ratos Wistar Submetidos à Separação Materna: Um Estudo Transgeracional. VIII Congresso Acadêmico Científico do UNIFESO – CONFESO: Comunicação Oral - Centro Universitário Serra dos Órgãos, Teresópolis, 2023.
8. STANFORD, S. Clare. The open field test: reinventing the wheel. *Journal of psychopharmacology*, v. 21, n. 2, p. 134-135, 2007.
9. TOMASI, Carlo. Histograms of oriented gradients. *Computer Vision Sampler*, p. 1-6, 2012. WECHSLER, Harry. *Computational vision*. Elsevier, 2014.