



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ANA CAROLINA VIEIRA DA SILVA
JÉSSICA MÜLLER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA IMUNIZAÇÃO ATIVA NA FUNÇÃO OVARIANA DAS
CAPIVARAS.**

BRASÍLIA
2020



ANA CAROLINA VIEIRA DA SILVA

JÉSSICA MÜLLER

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA IMUNIZAÇÃO ATIVA NA FUNÇÃO OVARIANA DAS
CAPIVARAS.**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

BRASÍLIA

2020

Dedicamos esse trabalho aos nossos pais e professores que nos auxiliaram em todo processo de execução desse projeto.

RESUMO

As capivaras trazem riscos à saúde pública por transmitirem doenças através dos carrapatos que são os vetores das enfermidades como febre maculosa. A reprodução pode ocorrer durante todo o ano, com pico nas épocas chuvosas, gerando em média 4 filhotes por ninhada, logo, sua proliferação é rápida e seria importante ter um controle populacional. Com esse trabalho, objetivou-se avaliar a função ovariana das fêmeas após aplicações de um imunógeno contendo antígenos criados a partir dos genes GDF9 e BMP15 de bovinos, a fim de se ter uma esterilização imunológica. Para a realização do estudo, foi feito o condicionamento das capivaras do Jardim Zoológico de Brasília para posteriormente executar o manejo com a aplicação do imunógeno, o qual foi elaborado nos laboratórios da EMBRAPA CENARGEN. Na etapa laboratorial foi utilizada a bactéria *E.coli* para a clonagem dos genes, que foram submetidos a expressão e purificação para que eles efetuassem uma ação inibitória dos hormônios esteroidais, bloqueando a luteinização das células do folículo e sua capacidade reprodutiva.

Palavras-chave: Esterilização imunológica. Reprodução. Função ovariana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Brete de madeira do Zoológico de Brasília	9
Figura 2 – Brete de metal do Zoológico de Brasília.....	10
Figura 3 – Uma capivara em cada brete, respeitando o limite.....	11

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
3 METODOLOGIA.....	9
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
REFERÊNCIAS.....	15

1 INTRODUÇÃO

As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são os maiores roedores do mundo, seu peso varia de 30 a 60 kg podendo chegar até a 80 kg no animal adulto, com tamanhos de 1,0 a 1,35 m (ALHO, 1986). Esses animais são encontrados em sua maioria na América do Sul e possuem uma boa relação com ambientes próximos de seres humanos, fazendo com que haja um certo contato das capivaras com a população ou com outros animais domésticos e levando alguns problemas, como a transmissão de doenças (FARIKOSKI, et al., 2019).

A principal doença é a febre maculosa, transmitida através do carrapato, entretanto, outras doenças também podem se propagar por conta da capivara, como a leptospirose, leishmaniose, raiva, doença de Chagas, infecções por enterobactérias e enfermidades fúngicas e parasitárias. No Brasil, há um grande problema na transmissão de febre maculosa através dos carrapatos presentes nas capivaras, além disso, as capivaras têm sido grandes ampliadoras da bactéria *Rickettsia rickettsii*, que é responsável por causar a febre maculosa (CHIACCHIO, 2012).

A reprodução das capivaras ocorre durante todo o ano, com uma predileção por estações chuvosas, visto que a cópula ocorre dentro da água, nesse período eles permanecem um maior tempo nos lagos/lagoas/rios. O período da gestação dura em torno de 150 dias, podendo gestar duas vezes ao ano, além disso, atingem sua maturidade sexual antes dos 2 anos e nascem em média quatro filhotes por ninhada (PEREIRA e ESTON, 2007).

Devido ao fato das possíveis doenças transmitidas e sua acelerada reprodução, é muito importante que o controle populacional seja feito, diminuindo os riscos de dissipar as zoonoses e contaminar a população com doenças que não são fáceis de tratar e possuem uma taxa relativamente alta de mortalidade, além de poder afetar os animais.

O controle da população de capivaras já foi feito por meio de remanejamento de um grupo para outros locais, porém é ineficaz visto que os animais podem voltar ao lugar de origem, e a castração cirúrgica, que é uma alternativa inviável economicamente. Logo, acredita-se que uma nova possibilidade mais prática e apropriada seria a castração imunológica, nunca testada em capivaras, porém comum em suínos. Nesses animais, a vacina estimula o próprio sistema imune do suíno a bloquear o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (SOAVE e TREVISAN, 2011), diferentemente desse projeto, que a ação do antígeno é diretamente no ovário.

Tendo em vista a importância da diminuição populacional das capivaras, o projeto teria como objetivo, criar e avaliar o potencial e ação contraceptiva de um imunógeno relacionado à inibição de fatores de crescimento específicos do ovócito em capivaras.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As fêmeas possuem a reprodução regulada de forma endócrina, através das gonadotrofinas hipofisárias, porém estudos avaliaram a ação intrafolicular entre as células germinativas e as somáticas e obtiveram como resultados a comprovação da secreção de fatores pelo ovócito, que tem capacidade de atuação direto nas etapas de maturação de folículo por sinalização de indicadores parácrinos (LI et al., 2008). Dentre os elementos que tem essa função, destacam-se a proteína morfogenética de osso 15 (BMP 15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF 9).

O BMP 15 é um gene que está ligado ao cromossomo X e tem a função de codificar uma proteína secretada pelos ovócitos, já o GDF 9 está localizado no cromossomo 5 e seu RNA mensageiro é sintetizado a partir do estágio de folículo primário até um pouco depois da ovulação. Os dois genes tiveram uma boa evolução comparado a outros da mesma família e obtiveram uma seleção positiva nos mamíferos. Os RNAs mensageiros dos dois são expressos nos ovócitos das fêmeas, possuem um grau de homologia muito alto de aminoácidos, tendo assim, uma estrutura proteica bem semelhante, e atuam juntamente, com uma interação sinérgica (SAFINS, RODRIGUES, ALBERTINI, 2018), contudo o BMP15 foi já encontrado na hipófise e testículos, o que indica que não é um fator exclusivo do ovário.

O GDF-9 e o BMP15 são sintetizados pelos ovócitos e participam do impulsionamento dos folículos primordiais e no desenvolvimento das células da granulosa que secretam proteínas que estão associadas a transição e diferenciação folicular e, conseqüentemente, na fertilidade dos animais (BARAKAT et al., 2018)

A proteína morfogenética de osso 15 tem um papel crucial na ovulação dos mamíferos, tendo as funções variadas de acordo com as espécies, nas ovelhas ocorre desde um aumento na taxa de ovulação e fertilidade em animais heterozigotos, até uma infertilidade dos animais homozigotos. A atuação do BMP 15 nas mulheres é essencial para a fertilidade, porém, algumas mutações desse gene já são capazes de causar a infertilidade nos humanos, ou seja, pequenas mutações podem fazer uma grande diferença no sistema reprodutivo. Ao contrário de ovelhas e humanos, não há uma ação lógica do BMP 15 nos camundongos, pois em alguns casos não é necessário para a foliculogênese, ou seja, todas as etapas são feitas sem a ação do BMP 15 (YOSHINO, et al., 2006).

3 METODOLOGIA

Para a avaliação do efeito biológico da imunização ativa na função ovariana nas capivaras, eram necessárias duas etapas anteriores, a primeira era a produção do imunógeno, feito nos laboratórios da Embrapa Cenargen, e a segunda, o condicionamento e manejo das capivaras no Jardim Zoológico de Brasília.

Embora as capivaras utilizadas no projeto habitem o Zoológico, esses animais não são sua propriedade, vivem livremente por toda área e estão sob tutela do ICMBio, por isso houve a necessidade de autorização de ambas entidades para a devida manipulação. As concentrações das populações estavam principalmente em dois lagos localizados no setor Ilha dos Macacos, e em cada recinto havia bretes de contenção, um de madeira e outro de metal.

Figura 1 – Brete de madeira do Zoológico de Brasília



Fonte: MÜLLER, 2019.

Figura 2 – Brete de metal do Zoológico de Brasília



Fonte: MÜLLER, 2019.

O condicionamento foi feito por meio de alimentos como banana, cenoura, manga, milho e bagaço de cana de açúcar, juntamente a estímulos sonoros por apitos ultrassônicos e reprodução da gravação da vocalização das capivaras, com o objetivo de levá-las espontaneamente até as gaiolas e, assim, possibilitar um manejo ético e seguro.

Pensando no bem-estar e na segurança dos animais, foi estipulado o limite de uma capivara por brete a cada contenção. Ademais, os lagos são as fugas para esses animais em casos de ameaça e defesa, assim, foi necessário levá-las aos equipamentos de contenção para manejo, a fim de evitar que na hora da administração de anestesia, o animal não fuja e não tenha o efeito sedativo dentro da água.

Figura 3 – Uma capivara em cada brete, obedecendo o limite para bem-estar



Fonte: SILVA, 2019.

A manipulação dos animais capturados foi feita por contenção anestésica através da administração intramuscular de Tiletamina associada a Zolazepam, por meio de dardos e zarabatanas. Como o estudo é voltado a imunização ovariana, foi preconizado um protocolo exclusivo para fêmeas, assim, foi feito coleta de amostras como swab vaginal, coleta de sangue e ultrassonografia abdominal para avaliar as condições reprodutivas e possíveis gestações.

Além disso, foi realizado exames clínicos como avaliação de frequência cardíaca e respiratória, mensuração da temperatura corporal, movimentos oculares e reflexos. Após todo manejo e aplicação do imunógenos, houve a observação e espera da total recuperação do animal após a anestesia, e só assim as capivaras eram liberadas das gaiolas.

Para realizar a imunização foi necessário clonar e sequenciar a região que possui as proteínas a partir do DNA genômico. Essas proteínas que foram produzidas nas bactérias iriam servir de antígeno quando aplicadas nas capivaras, a resposta varia de acordo com a espécie e posteriormente poderá servir de exemplo para outros animais.

Para fazer as proteínas a partir do gene obtido, foi feita a transformação de vetores com as proteínas nas bactérias *E. coli* com resistência a cloranfenicol, isolando apenas o que precisamos. Essas células são cultivadas em placas de meio LB ágar com cloranfenicol e ampicilina (antibióticos os quais são resistentes) e feita a inoculação em shaker a 250 RPM (rotações por minuto) até atingir a quantidade de 0,4 a 0,6 nm de densidade óptica, em seguida, é adicionado o IPTG e feita a indução de 4 a 6 horas.

A extração das proteínas é feita com a sonicação das amostras e, em seguida, são colocadas as alíquotas no gel de acrilamida para verificar o funcionamento da sonicação, a quantificação e se as proteínas estão sendo expressas. Quando obtido um bom resultado nas amostras a próxima etapa é a purificação em colunas de Ni⁺, logo após, as alíquotas foram colocadas novamente no gel para verificar integridade e se foi realizada uma boa purificação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na etapa do Zoológico houve muitas interferências para obtenção de bons resultados, o objetivo era imunizar um número grande de capivaras e ter um grupo para controle negativo, acompanhar as fêmeas imunizadas e fazer pelo menos 3 aplicações do imunógeno, porém algumas condições impostas pelo Zoológico dificultaram o “n” amostral do trabalho.

A primeira dificuldade foi a questão da autorização para manejo apenas nas segundas-feiras, visto que o Zoológico é aberto para visitantes de terça a domingo e seria incômodo para algumas pessoas toda a manipulação com os animais, além de dificultar ainda mais o condicionamento até os bretes. Outro ponto é o hábito de coprofagia que as capivaras têm no período matutino, fazendo com que diminua o interesse no fornecimento de alimentos para a possível contenção.

Contudo, quando o condicionamento começou a ser efetivo e os animais responsivos, iniciou-se a época chuvosa em Brasília, aumentando a oferta de pasto e frutas, também afetando na contenção, além de que as capivaras usam o lago como refúgio no momento da chuva, então dificilmente saiam da água quando estava chovendo. Foi feita uma laboriosa programação e muitas tentativas falhas de condicionamento, ocasionando na decisão de pausar as imunizações até o fim das chuvas. Quando as atividades voltaram, houve paralisação das atividades e fechamento do Zoológico, por tempo indeterminado, devido ao decreto de isolamento e distanciamento social ocasionado pela pandemia da Covid-19.

No dia 29 de junho, ainda com as atividades suspensas, retomou-se os procedimentos laboratoriais do projeto, na Embrapa Cenargen, mas como o prazo de pesquisa encerrava no final de julho, o período para dominar todos os procedimentos necessários e entender todo protocolo consumiu muito tempo, acarretando a não obtenção de resultados nessa etapa.

Quanto ao real objetivo do projeto, avaliação da resposta biológica da imunização ativa na função ovariana das capivaras, não foi possível realizar em virtude das dificuldades citadas acima, e da inconclusão das duas etapas que precedem a análise do imunógeno.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do projeto era avaliar o efeito biológico da imunização ativa na função ovariana das capivaras, para isso, foi feito o condicionamento das fêmeas no Zoológico de Brasília para um manejo ético e seguro, e a produção de imunógenos a base de GDF9 e BMP15 nos laboratórios da Embrapa. Apesar de ter um objetivo muito relevante quanto a saúde pública, não foi possível a completa realização do estudo, devido as dificuldades no manejo dos animais de vida livre e posteriormente, pela pandemia da Covid-19.

Porém, no período de execução do projeto observou-se a questão comportamental das capivaras, que poderá auxiliar estudos futuros. Concluiu-se que são animais de boa convivência com outras espécies, nos períodos chuvosos permanecem um tempo maior dentro da água, possuem hábitos coprofágicos durante as manhãs e tem paladar seletivo para alimentos como banana, manga, cenoura, milho e bagaço de cana de açúcar.

REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J. R. Criação e manejo de capivaras em pequenas propriedades rurais. **EMBRAPA - DPP. Documentos 13**, 1986. Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/201693/1/Criacao-e-manejo.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2020.
- BARAKAT, I. A. H. et al. Gene expression and maturation evaluation of sheep oocytes cultured in medium supplemented with natural antioxidant source. **South African Journal of Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 261-270, 2018. Disponível em:
<http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-15892018000200007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 out.2020.
- CHIACCHIO, R. G. M. D. **Avaliação sanitária de capivaras (Hydrochoerus hydrochaeris) de vida livre na região da Cantareira - zona norte de São Paulo**. Dissertação (Pós graduação em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 125. 2012.
- FARIA, L. B. ROLIM, A. C. A. DONALÍSIO, M. R. A febre maculosa brasileira e o discurso da mídia impressa: perspectivas de atores envolvidos. **Scielo**. 2020. Disponível em:
<<https://scielosp.org/article/icse/2020.v24/e190784/#>>. Acesso em: 18 out 2020
- FARIKOSKI, I. O. et al. The urban and rural capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) as reservoir of Salmonella in the western Amazon, Brazil. **Pesq. Vet. Bras**, v. 39, n. 1, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em:
<https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2019000100066&lang=en#B4>. Acesso em: 20 out. 2020
- LI, Q.; MCKENZIE, L. J.; MATZUK, M. M. Revisiting oocyte–somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 673–678, 2008. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2639448/>> Acesso em: 26 out. 2020.
- PEREIRA, H. F. A. ESTON, M. R. BIOLOGIA E MANEJO DE CAPIVARAS (Hydrochoerus hydrochaeris) NO PARQUE ESTADUAL ALBERTO LÖFGREN, SÃO PAULO, BRASIL. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 55-64, jun. 2007. Disponível em:
<<http://www.conhecer.org.br/download/CONTENCAO%20E%20CAPTURA%20DE%20ANIMAIS%20SELVAGENS/LEITURA%20ANEXA%201.pdf>>. Acesso em: 16 out 2020
- SAFINS, A., RODRIGUES, P., ALBERTINI, A. F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. **J Assist Reprod Genet**, v. 35, n. 10, p. 1741-1750. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6150895/>>. Acesso em: 17 out. 2020.
- SOAVE, G.; TREVISAN, C. Castração alternativa em suinocultura. **Revista nutri time**, v. 8, n. 2, p. 1461-1468, 2011. Disponível em:
<https://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/132V8N2P1461_1468_MAR2011_.pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.

YOSHINO, O. et al. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proc Natl Acad Sei USA**, v. 103, n. 28, p. 10678-10683, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1502291/>>. Acesso em: 17 out. 2020.