



**LUÍSA OLIVEIRA ORLANDI**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMBRAPA -  
GADO DE LEITE**

**LAVRAS-MG**

**2023**

**LUÍSA OLIVEIRA ORLANDI**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMBRAPA - GADO DE LEITE**

Relatório de Estágio Supervisionado  
apresentado ao Colegiado do Curso  
de Medicina Veterinária da  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso  
de Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de Bacharel.

Professor Dr. Marcos Ferrante

Orientador

**Lavras-MG**

**2023**

**LUÍSA OLIVEIRA ORLANDI**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMBRAPA - GADO DE LEITE**

**SUPERVISED INTERSHIP AT THE EMBRAPA - DAIRY CATTLE**

Relatório de Estágio  
Supervisionado apresentado ao  
Colegiado do Curso de Medicina  
Veterinária da Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Medicina  
Veterinária, para obtenção do  
título de Bacharel.

APROVADA em 01 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Marcos Ferrante – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG

Me. João Vitor Fernandes Cotrim de Almeida – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

M.V. Melissa Sanches Mongelli – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

M.V. Luiz Fernando Oliva Campos – Universidade Federal de Lavras (UFLA)

**LAVRAS-MG  
2023**

À mim mesma, para nunca mais esquecer de acreditar no meu potencial. Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Lisiane e Fernando e ao meu irmão Vinícius por sempre estarem do meu lado, me apoiando, amando e cuidando. Mudei de caminho muitas vezes e sei que poderia mudar outras milhares e vocês continuariam torcendo por mim. Eu amo vocês

Aos meus muitos amigos, que nunca soltaram da minha mão, me apoiando nos momentos felizes e tristes da graduação, não me canso de dizer que sou realmente fã de todos vocês. Eu poderia produzir outro TCC com os nomes de todos vocês, mas deixo aqui minha gratidão especialmente a Karina, Anderson, Amanda, Paula, Pitaco, Ana, Jéssica, Vini, Tom, Gustavo, Duran, Antônio, Laura, Letícia e Arisa. Aos meus amigos e colegas de curso Carolina, Patrick, Gabriela e Iara que dividiam os dias e os neurônios comigo. E a todos os moradores e ex-moradores das Repúblicas AmaZona e K-Zona que me receberam e abraçaram como parte dessas famílias tão lindas.

Em especial, agradeço ao meu amigo e orientador Marcos que me recebeu e abraçou em seu laboratório. Por sempre reconhecer o meu potencial, e como um pai científico, saber o que eu necessitava para crescer. E ao meu amigo e professor João, por ter me apoiado e acalmado em todas as situações possíveis com tanto carinho. Tenho muito orgulho de ter aprendido tanto com vocês.

Agradeço também a todos os integrantes do NEFARM e da iniciação científica do laboratório de Farmacologia Veterinária por todos os momentos juntos. E a todos os integrantes do NECCIGA e do HVGA da UFLA, em especial aos residentes e estagiários da pandemia, vocês deixaram um momento tão difícil leve, e o HVGA sempre será minha casa.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Otávio, por deixar minha vida mais leve e cheia de amor. Por me ensinar tanto sobre a vida sozinha e a dois. A vida é melhor ao seu lado.

Agradeço especialmente a todos os animais que passaram pela minha vida, pacientes ou não. Todos me mostraram onde meu coração realmente está e eu não teria palavras para demonstrar tanto amor. Com uma menção honrosa à minha Catarina, obrigada por me escolher.

Enfim, agradeço a Embrapa e toda a equipe que me recebeu com tanto carinho e fez com que esse trabalho fosse possível, à Universidade Federal de Lavras e a todos que de alguma forma fizeram parte desta trajetória.

## **RESUMO**

O presente trabalho de conclusão de curso foi redigido como relatório de estágio supervisionado realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) sob supervisão do Dr. Humberto de Mello Brandão e orientação do Prof. Dr. Marcos Ferrante, durante o período de 14 de agosto a 03 de novembro de 2023, contabilizando 408 (quatrocentas e oito) horas totais. O objetivo será relatar as atividades acompanhadas, ou seja, as rotinas laboratoriais dos pesquisadores de nanotecnologia e reprodução animal, bem como a rotina experimental relacionada ao experimento de análises metabolômicas em animais submetidos a estresse térmico realizado no Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade localizado no campo experimental José Henrique Bruschi da Embrapa localizado no município de Coronel Pacheco. Este documento visa também apresentar uma revisão de literatura sobre análise metabolômica, abordagem relacionada ao principal experimento acompanhado pela discente durante o período de estágio supervisionado. A análise metabolômica é uma abordagem emergente e promissora usada para entender mecanismos biológicos a partir da análise de metabólitos em amostras biológicas. Ela pode fornecer uma visão geral do estado fisiológico do animal e ser aplicada em diversas áreas como toxicologia, farmacologia e reprodução animal.

**Palavras chave:** Nanotecnologia; Gado de Leite; Análise Metabolômica.

## **ABSTRACT**

This final course work was written as a supervised internship report carried out at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) under the supervision of Dr. Humberto de Mello Brandão and guidance of Prof. Dr. Marcos Ferrante, during the period from August 14 to November 3, 2023, totaling 408 (four hundred and eight) total hours. The objective will be to report the activities followed, that is, the laboratory routines of nanotechnology and animal reproduction researchers, as well as the experimental routine related to the experiment of metabolomic analyses in animals subjected to thermal stress carried out at the Multiuser Laboratory of Bioefficiency and Sustainability located at the experimental field José Henrique Bruschi of Embrapa located in the municipality of Coronel Pacheco. This document also aims to present a literature review on metabolomic analysis, an approach related to the main experiment followed by the student during the period of supervised internship. Metabolomic analysis is an emerging and promising approach used to understand biological mechanisms from the analysis of metabolites in biological samples. It can provide an overview of the animal's physiological state and be applied in various areas such as toxicology, pharmacology, and animal reproduction.

**Key Words:** Nanotechnology; Dairy Cattle; Metabolomic Analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fachada da Sede da Embrapa Gado de Leite-Juiz de Fora (MG).....	13
Figura 2- Laboratório de reprodução animal do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG) .....	14
Figura 3- Free-stall do Campo Experimental José Henrique Bruschi–Coronel Pacheco (MG) .....	15
Figura 4- Câmara Climática do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG) .....	16
Figura 5- Coleta de sangue a partir da veia coccígea do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG) .....	19
Figura 6- Oócitos recuperados no Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG) .....	21
Figura 7- Print da interface do sistema Intergado onde eram coletados os dados de consumo relativos ao experimento de estresse térmico realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG) .....	22
Figura 8- Sala de Ressonância Magnética Nuclear localizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear em Líquidos – Rio de Janeiro (RJ) .....	24
Figura 9- Sala de caracterização de Nanomateriais localizada no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	25
Figura 10- Sala de Cultivo Celular localizada no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	26
Figura 11- Sala de Espectometria de Massas localizada no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	27
Figura 12- Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	28
Figura 13- Balança eletrônica de precisão do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	29
Figura 14- Rotaevaporador do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	30

Figura 15- Equipamento de DLS do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	31
Figura 16- Becker com solução e bailarina no agitador magnético do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG) .....	32
Figura 17- Mapa de calor do experimento de Rivera-Velez e colaboradores proveniente de uma análise lipidômica.....	38
Figura 18- Gráfico do experimento de Rivera-Velez e colaboradores proveniente de uma análise metabolômica em gatos tratados repetidamente com meloxicam.....	39

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

BE - Benzoato de Estradiol

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta

ECC - Escore de Condição Corporal

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FF - Fluido Folicular

IM - Intramuscular

ITU - Índice de Temperatura e Umidade

IUPAC – União de Química Pura e Aplicada

LMBS - Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade

MS – Espectometria de Massas (*mass spectrometry*)

MSI – *Metabolomics Standards Initiative*

NEFARM - Núcleo de Farmacologia Veterinária Aplicada

OPU - Ovum Pick-up

P4 - Progesterona

PGF - Prostaglandina

PLA - Ácido Polilático

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TMR - Total Mixed Ration

TTP - Tripolifosfato de Sódio

UFLA - Universidade Federal de Lavras

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>CAMPO EXPERIMENTAL JOSÉ HENRIQUE BRUSCHI (CORONEL PACHECO, MG): INSTALAÇÕES E ATIVIDADES REALIZADAS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>INSTALAÇÕES .....</b>	<b>14</b>
3.1.1	Laboratório de reprodução .....	14
3.1.2	Laboratório de processamento de sangue .....	14
3.1.3	Galpão Free-stall .....	14
3.1.4	Câmara Climática.....	15
<b>3.2</b>	<b>ATIVIDADES REALIZADAS .....</b>	<b>16</b>
3.2.1	Animais, local e alimentação .....	16
3.2.2	Pesagem e escala de escore corporal.....	17
3.2.3	Avaliação clínica.....	18
3.2.4	Coleta de amostras de leite e sangue, e biópsias hepática e endometrial.....	18
3.2.5	Sincronização emergencial de onda folicular .....	20
3.2.6	Aspiração de folículo dominante (coleta de fluido folicular) e recuperação de complexos cumulus-oócitos.....	20
3.2.7	Coleta e tabulação de dados .....	22
3.2.8	Preparação e análise de amostras de sangue, fluido folicular, endométrio e fígado .....	22
<b>4</b>	<b>SEDE DA EMBRAPA GADO DE LEITE (JUIZ DE FORA, MG): INSTALAÇÕES E ATIVIDADES REALIZADAS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>ESTRUTURA DO LABORATÓRIO DE NANOTECNOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>ATIVIDADES REALIZADAS .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA À MEDICINA VETERINÁRIA: REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>33</b>
<b>6.1</b>	<b>INTRODUÇÃO A TERAPIAS ÔMICAS E À ABORDAGEM METABOLÔMICA.....</b>	<b>33</b>
<b>6.2</b>	<b>TIPOS E MÉTODOS DE ANÁLISE METABOLÔMICA.....</b>	<b>34</b>
6.2.1	Tipos de análise.....	34
6.2.2	Métodos de análise e preparação de amostras.....	34

<b>6.3 APLICAÇÕES DA METABOLÔMICA NA MEDICINA VETERINÁRIA.....</b>	<b>36</b>
<b>6.4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>41</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

O estágio curricular supervisionado está contido na disciplina PRG 107, e é uma exigência do último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Ele totaliza em 476 horas, das quais 408 horas são dedicadas à prática e 68 horas à elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Este estágio é uma oportunidade valiosa para os alunos aprimorarem os conhecimentos técnicos adquiridos durante a graduação e desenvolverem novas habilidades na área de sua escolha. Além disso, permite que os alunos vivenciem a rotina profissional fora do ambiente acadêmico e expandam seus contatos.

O presente trabalho descreve as atividades desenvolvidas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), realizado no período de agosto de 2023 a novembro de 2023, totalizando 408 horas, sob supervisão do pesquisador Dr. Humberto de Mello Brandão. Objetiva também trazer uma revisão de literatura acerca de análise metabólica, abordagem relacionada a um dos experimentos acompanhados pela discente durante esse período.

O estágio foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. Marcos Ferrante, membro do corpo docente da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (FZMV/UFLA), responsável pela disciplina de Farmacologia Veterinária e Professor Coordenador do Núcleo de Estudos em Farmacologia Aplicada (NEFARM).

## **2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO**

A sede da Embrapa Gado de Leite está localizada na Avenida Eugênio do Nascimento, 610 - Aeroporto na cidade de Juiz de Fora - MG. A sede contempla uma área de 3,85 hectares, no qual estão presentes salas de trabalho, laboratórios, casas de vegetação, auditórios, bibliotecas e escritórios de parceiros. É uma das 42 Unidades Descentralizadas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (FIGURA 1), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Possui campos experimentais em Coronel Pacheco (MG) e Valença (RJ), como também quatro núcleos que apoiam em atividades de transferência de tecnologia em cada região do país. O corpo técnico é constituído por 275 funcionários, sendo 75 pesquisadores, 74 analistas, 33 técnicos e 92 assistentes.

Nos laboratórios da Embrapa Gado de Leite são realizados experimentos, além disso, são utilizados para auxiliar pesquisas tanto da instituição quanto de parceiros, e prestarem

serviços para a cadeia de produção leiteira. São utilizados também para fins acadêmicos, onde atuam mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e alunos de graduação em estágios e iniciações científicas. A unidade conta com os seguintes laboratórios: I. Laboratório de Análise de Alimentos; II. Laboratório de Bioinformática e Genômica Animal; III. Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Animal; IV. Laboratório de Cromatografia; V. Laboratório de Entomologia; VI. Laboratório de Genética Molecular; VII. Laboratório de Genética Vegetal; VIII. Laboratório de Microbiologia do Leite; XIX. Laboratório de Microbiologia do Rúmen; X. Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal; XI. Laboratório de Parasitologia; XII. Laboratório de Qualidade do Leite e XII. Laboratório de Reprodução Animal.

Figura 1: Fachada da Embrapa Gado de Leite - MG, Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023



Fonte: Portal Embrapa

O Campo Experimental José Henrique Bruschi está localizado na Rodovia MG 133, no quilômetro 42 pertencente ao município de Coronel Pacheco – MG. Possui uma área de 1.037 hectares e abriga infraestrutura para experimentação tanto a campo quanto em laboratório, diferentes sistemas de produção de leite e espaço para treinamentos. O campo experimental conta com um rebanho de 1.100 ruminantes e lá são realizadas pesquisas em melhoramento de forrageiras e raças leiteiras, qualidade de leite, reprodução e sanidade animal.

### **3 CAMPO EXPERIMENTAL JOSÉ HENRIQUE BRUSCHI (CORONEL PACHECO, MG): INSTALAÇÕES E ATIVIDADES REALIZADAS.**

#### 3.1 Instalações

##### 3.1.1 Laboratório de reprodução

No laboratório de reprodução existe uma bancada contendo centrífuga, banho maria, estufa incubadora, suporte para pipetas e pipetadores automáticos. Também encontra-se uma geladeira para armazenamento de amostras, capela de fluxo laminar, microestereoscópio e placa de aquecimento para processamento de amostras e trabalho com embriões (FIGURA 2).

Figura 2: Laboratório de reprodução animal do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023



Fonte: Portal Embrapa

##### 3.1.2 Laboratório de processamento de sangue

No laboratório de processamento de sangue encontram-se 5 freezers para armazenamento de amostras, uma bancada com centrífugas, suportes para pipetas e para tubos de coleta, e uma mesa usada para processamento e etiquetagem de amostras.

##### 3.1.3 Galpão Free-stall

O galpão free-stall utilizado conta com 84 cochos eletrônicos individuais, ativados pelas coleiras dos animais, 12 bebedouros com plataformas de pesagem automáticos, camas de

borracha, sistema de climatização com aspersores e ventiladores tanto na linha de cocho quanto nas camas e sistema de limpeza hidráulico nos corredores. (FIGURA 3).

Figura 3: Free-stall do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023



Fonte: Da autora

#### 3.1.4 Câmara Climática

A câmara climática possui capacidade para 6 animais e é equipada com sistema que permite o ajuste de temperatura e umidade relativa do ar. Conta com ventiladores, exaustores, cochos eletrônicos individuais e camas de borracha. (FIGURA 4)

Figura 4: Câmara Climática do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

### 3.2 Atividades Realizadas

As principais atividades realizadas no campo experimental da Embrapa do município de Coronel Pacheco foram condizentes com a rotina diária do experimento que a discente acompanhou. O experimento teve como objetivo realizar uma análise metabólica para identificação de moléculas biomarcadoras de resposta ao estresse térmico em bovinos.

#### 3.2.1 Animais, local e alimentação

Foram utilizadas 12 vacas Girolando no terço inicial da lactação, que não apresentavam distúrbios puerperais e foram divididas em dois grupos com seis animais cada. Os animais passaram por um período de adaptação no sistema de free-stall do Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade (LMBS) que conta com camas de borracha que eram recobertas diariamente com maravalha e cochos individuais acionados pelas coleiras de cada animal. Após isso foram realocados para a câmara de estresse térmico que também conta com

camas de borracha forradas com maravalha trocada todos os dias e cochos individuais, onde também passaram por um período de adaptação e posteriormente o período de estresse térmico proposto. Os animais também eram ordenhados duas vezes ao dia em sala de ordenha com registro automatizado de produção de leite.

Durante o experimento as vacas foram alimentadas com dieta balanceada (Total Mixed Ration, TMR) produzida na Embrapa, com consumo *ad libitum*, registrado tanto por dados de consumo fornecidos pelo cocho eletrônico da Intergado que eram coletados pelo site e tabelados por dia e por animal pela discente, quanto por valores obtidos de pesagens diárias das sobras feitas pela equipe do experimento e pela discente. Após o período de adaptação ao free-stall foi estabelecido a restrição alimentar de 15% sobre o consumo *ad libitum* individual. Essa restrição alimentar foi feita para que a diminuição de consumo, que ocorre naturalmente quando os animais estão em estresse térmico, não afetasse significativamente os resultados do experimento. Os animais permaneceram no free-stall em restrição alimentar durante dez dias antes de irem para a adaptação na câmara térmica.

Após a etapa de restrição alimentar, as vacas entram na câmara térmica com a alimentação ajustada onde permanecem por um período de adaptação seguido do período de estresse térmico. A câmara era ajustada duas vezes ao dia para que o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) permanecesse em 85 durante o dia no máximo e em 72 durante a noite no mínimo, que são os valores médios de ITU de um dia de verão na região em que o experimento foi realizado. A temperatura também era acompanhada por termômetros digitais colocados tanto no free-stall quanto na câmara térmica.

### 3.2.2 Pesagem e escala de escore corporal

Houveram seis pontos de pesagem e foi feita a análise do escore de condição corporal (ECC). Ocorreram, respectivamente, um dia antes do início da restrição alimentar, ao quinto dia de restrição, no primeiro e último dia de adaptação à câmara climática, e no quinto e no último dia de estresse térmico. Esse acompanhamento foi feito de forma a avaliar os efeitos do experimento no peso dos animais. As pesagens foram feitas em balança eletrônica na propriedade e o ECC foi avaliado pela discente e pela equipe utilizando-se de uma escala de 1 a 5, sendo 1 vacas muito magras e 5 vacas muito gordas.

### 3.2.3 Avaliação clínica

Diariamente os animais eram avaliados clinicamente pela discente e a equipe. Eram feitas três aferições de frequência respiratória durante o dia, sendo às oito da manhã, ao meio dia e às dezesseis horas. Aliado a esse processo, ocorria a observação dos animais para análise de comportamento e avaliação da respiração ofegante. Em suma, tais dados também eram avaliados a partir de coleiras com sensores eletrônicos que coletam dados de ruminção, atividade, ócio e respiração ofegante e os transferem automaticamente para a nuvem. É importante o acompanhamento da frequência respiratória pois ela também é uma das principais variáveis de estresse térmico, visto que os animais perdem calor a partir da dissipação pela respiração.

Foram também coletados e tabulados semanalmente dados de temperatura dos animais provenientes de termômetros vaginais eletrônicos (ibutton) acoplados em dispositivos intravaginais. A principal forma de análise de estresse térmico em um animal é a aferição da temperatura corporal. É interessante que tais informações possam ser relacionadas com os resultados provenientes da análise metabólica, funcionando como um reflexo físico e comportamental dos dados obtidos. Os dispositivos eram trocados semanalmente ou a cada intervenção reprodutiva pela via vaginal, e, diariamente as vacas eram checadas duas vezes ao dia quanto à presença e localização correta do implante para prevenir perdas e facilitar a reposição o mais rápido possível, caso fosse preciso.

### 3.2.4 Coleta de amostras de leite e sangue, e biópsias hepática e endometrial

Foi feito o controle de produção leiteira diário a partir de dados eletrônicos da ordenha mecânica do LMBS. Os dados eram coletados no sistema e tabulados pela discente e pela equipe. Realizou-se também coletas de leite em cada período (restrição alimentar e estresse térmico) para cada animal, para determinação da composição do leite e para separação de células somáticas. As análises de produção, composição e de presença de células somáticas no leite se justificam visto que esses fatores podem ser afetados tanto pela restrição alimentar quanto pelo estresse térmico (COWLEY et al., 2015; FISCHER et al., 2014).

Foram realizados dois pontos de coletas de sangue em cada animal, sendo uma no mesmo dia que foi realizado a coleta de oócitos denominada *ovum pick-up* (OPU) e a segunda na mesma data da aspiração de fluido folicular. As vacas foram colocadas em brete de

contenção, a coleta foi feita a partir de punção da veia coccígea (FIGURA 5) e foram coletados dois tubos de cada animal, sendo um deles destinado a análise do soro sanguíneo no tubo de EDTA e outro para o plasma no tubo com ativador de coágulo e gel. As amostras de soro serão destinadas para análise por ressonância magnética nuclear (RMN) assim como as das biópsias realizadas e as de fluido folicular recolhidas. As coletas de plasma foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para que, se necessário, façam análises de metabólitos para correlacionar com as análises de fluido folicular, visto que parte da composição do segundo é influenciada pelo primeiro.

Figura 5: Coleta de sangue em bovino a partir da veia coccígea do Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

As biópsias hepática e endometrial foram feitas ao final de cada período experimental. Para as biópsias endometriais utilizou-se um fórceps de 5mm de diâmetro, envolto em camisa sanitária que foi introduzido no corpo uterino através de manipulação cervical por palpação transretal. O fórceps é introduzido até o terço inicial do corno uterino, onde são coletadas quatro

amostras com cerca de 100mg de endométrio. Para as biópsias hepáticas realizou-se, primeiramente a tricotomia de 5x5cm no nono espaço intercostal, e posteriormente a anestesia subcutânea com 5ml de Lidocaína, antissepsia com álcool iodado. Realiza-se uma incisão pequena com o bisturi na qual foi introduzida a pinça de biópsia com disparo semi-automático em sentido látero-medial e dorso-ventral, com uma inclinação de 45°. Foram coletados também quatro fragmentos com cerca de 100mg cada. Após o procedimento o local da incisão era limpo, suturado com ponto simples em casos necessários e foi usado spray prata com ação repelente para evitar a presença de insetos, após essa etapa era feito o acompanhamento dos animais pela discente e pela equipe para garantir o bem-estar dos animais. Ao final de todos os procedimentos, os animais também receberam dipirona sódica 500mg na dosagem de 15mg por via intramuscular na região de glúteo médio dos animais. Todos os fragmentos coletados eram lacrados e corretamente armazenados em botijões de nitrogênio líquido e posteriormente em freezer a - 80°C para posterior análise no equipamento de RMN.

### 3.2.5 Sincronização emergencial de onda folicular

Para garantir que todos os animais do experimento estivessem no mesmo momento reprodutivo e para possibilitar as coletas de fluido folicular de folículo dominante e de cumulus-oócitos foi feito um protocolo de sincronização emergencial de onda folicular. Para tal, no primeiro dia de experimento, foi aplicada prostaglandina (PGF) para lisa a presença de possíveis corpos lúteos. Posteriormente iniciou-se o protocolo propriamente dito com implante vaginal de liberação controlada de progesterona (P4) e aplicar uma dose de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) pela via intramuscular (IM). O protocolo foi repetido nos dias que havia atividade de manejo reprodutivo (aspiração de fluido folicular e OPU). A aplicação de PGF foi repetida após a aspiração de FF e é importante pois lisa o corpo lúteo possibilitando a OPU feita posteriormente.

### 3.2.6 Aspiração de folículo dominante (coleta de fluido folicular) e recuperação de complexos cumulus-oócitos

Ao sétimo dia de cada etapa experimental, os animais passaram pelo processo de aspiração do folículo dominante para a coleta do fluido folicular. Para tal, inicialmente foram avaliados os ovários de cada animal por meio do ultrassom, as vacas recebiam anestesia peridural com 3mL de Lidocaína no primeiro espaço intercoccígeo. Utilizando-se de um guia de aspiração e bomba de vácuo os folículos dominantes, quando presentes, foram aspirados. O

fluido folicular recuperado foi submetido à centrifugação para separação de células e sobrenadante e congelados para posterior análise no RMN.

Nas mesmas datas que foram feitas as biópsias, os animais também passaram pelo procedimento de punção tubária ou *ovum pick-up* (OPU) que consiste em recuperar complexos cumulus-oócitos por meio de aspiração com bomba de vácuo guiada por ultrassom. Para tal, os animais recebiam anestesia peridural com 3mL de lidocaína que os insensibilizava tanto para esse procedimento quanto para a biópsia endometrial, e procedia-se a aspiração de todos os folículos ovarianos com diâmetro superior a 3mm, localizados por ultrassom transvaginal. Os oócitos recuperados foram analisados no laboratório de reprodução por meio de um estereomicroscópio e classificados quanto à sua qualidade morfológica e aqueles classificados em grau de qualidade I e II foram selecionados para posterior análise por espectrometria de massas. (FIGURA 6)

Figura 6: Oócitos de bovino recuperados por OPU no Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.

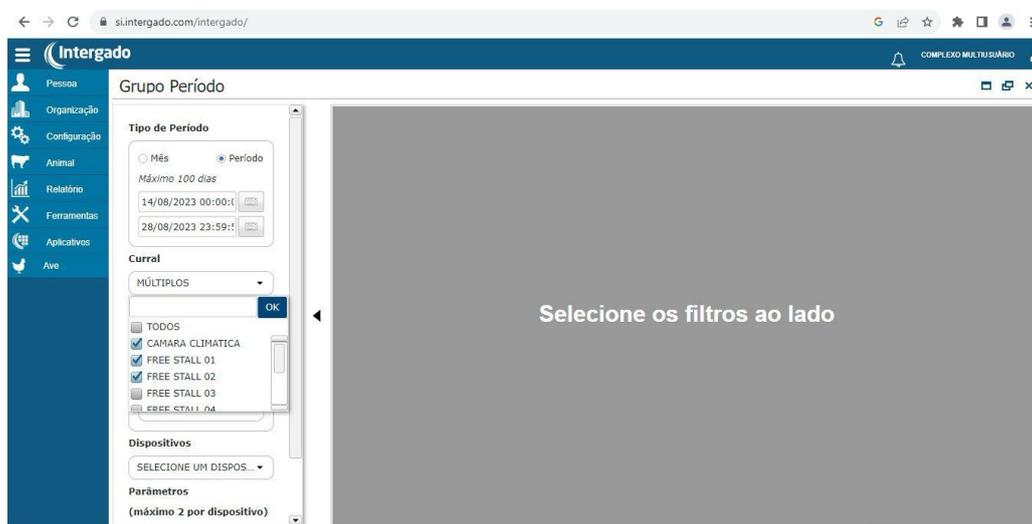


Fonte: Da autora

### 3.2.7 Coleta e tabulação de dados

Existe uma variedade de dados que eram coletados e tabulados todos os dias. Com relação ao consumo, os dados eram extraídos do site do Sistema Ponta da Intergado (FIGURA 7). A base de dados oferece grande liberdade quanto ao tipo de informação procurada como a seleção de cada animal, o período de tempo desejado tanto em dias quanto em horas, quais os currais desejados (free-stall 1 ou 2 e câmara climática) e qual o parâmetro desejado. Com isso é gerada uma tabela contendo o número do animal, o número do equipamento e a hora que ele foi acessado, quanto tempo o animal permaneceu nele e o consumo estimado pela mudança de peso. O período de tempo selecionado era de nove da manhã (hora que era colocado o novo trato) de um dia até as sete da manhã do dia seguinte (hora que as sobras eram coletadas e pesadas). Esses dados eram tabulados para que pudessem ser analisados e comparados com aqueles obtidos da pesagem do trato oferecido e das sobras que eram coletadas e pesadas em balança.

Figura 7: Print da interface do sistema Intergado onde eram coletados os dados de consumo relativos ao experimento de estresse térmico realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi – Coronel Pacheco (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

### 3.2.8 Preparação e análise de amostras de sangue, fluido folicular, endométrio e fígado

A discente acompanhou um estudo piloto, realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), de análise de amostras de sangue, fluido folicular, endométrio e fígado por

RMN. Para tal foram coletadas amostras de sangue, fluido folicular e biópsias endometrial e hepática de quatro animais que não estavam no experimento. Todas as coletas e processamento prévio das mesmas seguiram os padrões já citados. As amostras teciduais foram submetidas a um processo de extração tecidual e secagem utilizando-se para isso clorofórmio e metanol como solventes e água ultrapura para soluções. Após processadas, metade das amostras foram submetidas a um processo de secagem por speed vacuum e a outra metade por evaporador de amostras, essa divisão ocorreu para analisar se haveria diferença entre elas no momento da análise metabolômica. As amostras foram então levadas para o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear em Líquidos da Universidade Federal do Rio de Janeiro onde foram submetidas a um processo de diluição com solução tampão Tris-Buffered Saline (TBS), que contém cloreto de sódio, fosfato de sódio e tris(hidroximetil)aminometano, água deuterada (D<sub>2</sub>O) e água Milli-Q. Após a diluição, as amostras de soro sanguíneo, endométrio e fígado foram pipetadas em tubos de 6mm e as de FF em tubos de 3mm para a análise no RMN de 500 US2. A discente acompanhou uma análise preliminar que indicou que o método foi eficiente para a leitura metabolômica das amostras. (FIGURA 8).

Figura 8: Sala de Ressonância Magnética Nuclear localizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear em Líquidos – Rio de Janeiro (RJ), em que foram realizadas análises relacionadas ao experimento acompanhado no estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

## **4 SEDE DA EMBRAPA GADO DE LEITE (JUIZ DE FORA, MG): INSTALAÇÕES E ATIVIDADES REALIZADAS**

### **4.1 Estrutura do Laboratório de Nanotecnologia**

No Laboratório de Nanotecnologia há uma bancada central, onde encontram-se estufa, centrífuga, banho-maria, máquina extrusora e suporte de pipetas. Além disso, há salas distintas para realização de procedimentos como caracterização de nanomateriais (FIGURA 9), sala de cultivo celular (FIGURA 10), sala de preparo de amostras para espectrometria de massas e sala de espectrometria de massas (FIGURA 11). Além disso, o ambiente contém geladeiras, freezers e pias (FIGURA 12).

Figura 9: Sala de caracterização de Nanomateriais localizada no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

Figura 10: Sala de Cultivo Celular localizada no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

Figura 11: Sala de Espectrometria de Massas localizada no Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

Figura 12: Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

#### 4.2 Atividades realizadas

As atividades realizadas pela discente no laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite estiveram relacionadas ao experimento anteriormente citado, ou ao acompanhamento de procedimentos conduzidos por membros do laboratório. A atividade relacionada ao experimento de estresse térmico foi basicamente a preparação de tubos para as coletas de sangue e eppendorfs para coletas de biópsias e fluido folicular. Eram feitas etiquetas contendo o tipo de amostra e o número dela, pois no caso das biópsias endometriais, por exemplo, eram feitas quatro coletas de cada animal, o número de cada animal e o dia da coleta. Os eppendorfs destinados a coleta de biópsias endometrial e hepática e os de fluido folicular eram pesados em balança eletrônica de precisão (FIGURA 13) pela discente primeiramente sem

as etiquetas e depois novamente com as etiquetas colocadas, os pesos foram registrados em tabelas para que, no momento da análise, pudessem ser pesados novamente e o peso da amostra calculado com maior precisão pela diferença.

Figura 13: Balança eletrônica de precisão do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

O principal processo acompanhado foi o de elaboração de nanopartículas para uma formulação antibiótica. Para isso, utiliza-se o rotaevaporador (FIGURA 14) disponível com o intuito de separar solvente e amostra em recipientes diferentes. O equipamento realiza o processo de destilação simples em um sistema de aquecimento a vácuo no qual o solvente aquecido evapora, passa pelo condensador e é recolhido em um frasco diferente. O resultado desse processo é uma amostra pura que é levada para análise no equipamento de Espalhamento

Dinâmico de Luz e Potencial Zeta (DLS) (FIGURA 15), com essa análise é possível avaliar o tamanho e a voltagem da nanopartícula produzida se ela possuir diâmetros entre 0,3 nanômetros a 5 micrômetros.

Figura 14: Rotaevaporador do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

Figura 15: Equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta (DLS) do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

A discente também teve a oportunidade de acompanhar o processo de produção de uma nanocápsula a partir de gelificação iônica. Para tal, a substância da qual será gerada a nanocápsula foi colocada em um becker com uma bailarina e agitada em agitador magnético (FIGURA 16) associada com um aglutinante, em seguida é gotejado Tripolifosfato de Sódio na solução que atua como agente reticulante, formando a nanocápsula. Posteriormente a solução formada é também foi analisada no DLS para observação do tamanho e voltagem da partícula formada.

Por último, a discente acompanhou e auxiliou no processo de produção de filamento de polímero de Ácido Polilático (PLA) transparente para uso na impressora 3D. Para tal foi usado uma extrusora da marca Filmaq 3D (FIGURA 16) na qual era colocado o PLA peletizado que era derretido e saía em forma de filamento passando por uma fileira de ventiladores que

resfriavam e endureciam o material, o equipamento também conta com uma parte para medição do filamento e por último o carretel no qual era enrolado o filamento produzido. O filamento foi testado na impressora 3D presente no laboratório e se mostrou apto para uso.

Figura 16: Becker com solução e bailarina no agitador magnético do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora (MG), em que foi realizado o estágio supervisionado no período de agosto a novembro de 2023.



Fonte: Da autora

## 5 CONCLUSÃO

Foi possível observar os efeitos do estresse térmico principalmente no consumo de alimento e comportamento dos animais. O consumo alimentar reduz consideravelmente, e os indivíduos tendem a ficar mais agitados. Quanto às atividades realizadas em laboratório, observou-se que as técnicas utilizadas nos três experimentos foram eficazes para os respectivos fins. As análises de DLS obtiveram os resultados almejados, tanto de tamanho das

nanopartículas quanto de carga. Além disso, o filamento de PLA produzido foi empregado com sucesso na impressora 3D.

## **6 ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA À MEDICINA VETERINÁRIA: REVISÃO DE LITERATURA**

### **6.1 Introdução a terapias ômicas e à abordagem metabolômica**

As terapias ômicas são uma abordagem interdisciplinar que estuda um conjunto de moléculas ou genes, surgiram da necessidade de se estudar os processos químicos de uma forma mais completa, entendendo que as interações entre genes, proteínas, moléculas de carbono, lipídios e metabólitos são complexas demais e que algumas propriedades não poderiam ser explicadas analisando esses compostos um a um. Elas são análises de alto rendimento usadas para estudar funções, diferenças e interações entre células de um organismo, como por exemplo, genes, proteínas e metabólitos. Essas análises são feitas basicamente perturbando essas células de forma sistêmica, genética ou química e monitorando as respostas em nível genômico, para isso os dados são integrados em modelos computacionais que auxiliam a compreender as funções individuais e globais dos componentes envolvidos (Stagljar, 2016).

Essas análises tiveram início com avanços no sequenciamento de DNA de alto rendimento, o que levou ao surgimento da genômica. Os avanços tecnológicos contribuíram para que surgissem muitas outras análises de alto rendimento como a transcriptômica (RNA), proteômica (proteínas), lipidômica (lipídeos), glicômica (carboidratos) e metabolômica (metabólitos; Stagljjar, 2016). A maioria dessas análises tem como base a ideia de serem geradoras de hipótese, ou seja, primeiro é feita a análise para a partir dos resultados uma hipótese ser gerada (Nalbantoglu, 2019). Em contrapartida, a análise metabolômica pode informar o que acontece ou aconteceu em um organismo e fornecer dados sobre mudanças fisiológicas oriundas de interações gene-ambiente devido à natureza de mudanças de metabólitos. Essa característica faz com que esse tipo de análise seja muito pontual mesmo considerando que a quantidade informações fornecidas sejam muito menores se comparadas com a genômica, visto que há cerca de 3.000 metabólitos chaves de vias metabólicas principais, enquanto existem mais de 40.000 genes no genoma, baseando-se no organismo humano (Yu, *et. Al*, 2017). Lembrando que é importante destacar que o tamanho do metaboloma varia de acordo com o organismo estudado.

A metabolômica pode ser, então, entendida como o estudo do metaboloma, que é o conjunto de metabólitos de células, fluidos biológicos, tecidos ou organismos e tem o objetivo

de identificar e quantificar metabólitos endógenos e exógenos de baixo peso molecular, em um sistema biológico por meio de uma análise de alto rendimento (Nalbantoglu, 2019). Os metabólitos, por sua vez, são produtos intermediários ou finais de reações bioquímicas em um sistema biológico. Essa análise é considerada um reflexo do fenótipo devido à natureza dos metabólitos, que têm sua composição diretamente influenciada pelo montante do proteoma, genoma e fatores ambientais, tornando-a mais complexa física e quimicamente do que as outras análises ômicas (Nalbantoglu, 2019). Por essa proximidade com o fenótipo, a metabolômica também possui a capacidade de representar melhor o fenótipo molecular tanto da saúde quanto das doenças (Guijas, *et. Al*, 2018).

## 6.2 Tipos e métodos de análise metabolômica

### 6.2.1 Tipos de análise

A metabolômica pode ser dividida em duas categorias: uma delas é a “*Targeted*” que é direcionada para moléculas específicas, ou alvos, previamente conhecidos. Para tal, utilizam-se de sinais pré-definidos desses metabólitos conhecidos para detectá-los e quantificá-los com maior precisão. Essa abordagem pode ser considerada um teste de hipótese e é normalmente usada para validação de análises não direcionadas.

Já a análise não-direcionada, também chamada de “*Untargeted*”, tem como objetivo criar um perfil metabólico dos sistemas analisados medindo simultaneamente o maior número de metabólitos possível, sem saber previamente quais são eles. Apesar de apresentar limitações por fornecer apenas informações qualitativas e semiquantitativas, ela permite uma varredura completa do metaboloma proporcionando informações sobre identificação de padrões, o que auxilia na classificação de fenótipos com interações de vias metabólicas que interagem entre si. Pode-se dizer que a abordagem não-direcionada cria hipóteses que impulsionam a abordagem direcionada (Agin, 2016; Canuto *et al.*, 2017; Nalbantoglu, 2019).

### 6.2.2 Métodos de análise e preparação de amostras

A Sociedade de Metabolômica criou o Metabolomics Standards Initiative (MSI) definiu procedimentos padrões para estudos e publicações de trabalhos com metabolômica. Para tal deve-se predefinir o problema biológico a ser analisado, definir a abordagem empregada (*targeted* ou *untargeted*) e a partir disso serão definidas as próximas etapas do planejamento experimental, esse planejamento inclui a escolha do tipo de amostra, o número delas e como elas serão coletadas e armazenadas. Durante a coleta é importante se atentar ao *quenching*

metabólico, que nada mais é que a interrupção das atividades enzimáticas da amostra, isso pode ser feito com a adição de solventes resfriados ou com o congelamento das amostras em gelo seco ou nitrogênio líquido. A próxima etapa é o preparo dessas amostras. Para o método *untargeted* prefere-se o preparo mínimo e não-seletivo, no caso de amostras líquidas executa-se a remoção de sais e precipitação de proteínas pela adição de solventes orgânicos, seguido de filtração e diluição, já para amostras sólidas e semi-sólidas esse processo também envolve aparatos mecânicos de mistura com o solvente devido a maior dificuldade de extração por sua maior rigidez. Para o método *targeted*, o processo é seletivo para apenas um composto ou uma classe deles e envolve extrações líquido-líquido, sólido-líquido ou em fase sólida com o objetivo de remover substâncias que possam alterar os resultados e concentrar os analitos. O restante da preparação deve estar de acordo com o método de análise que será aplicado. Após o preparo das amostras são preparadas amostras de controle de qualidade para avaliar o desempenho e a estabilidade do instrumento que será usado. (Canuto *et al.*, 2017)

Os principais métodos de análise metabolômica são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) (Canuto *et al.*, 2017). A RMN é uma técnica que exige pouca ou nenhuma manipulação de amostras mas pode apresentar baixa sensibilidade apesar de ter alta seletividade, sendo necessário o uso de equipamentos de alta resolução para melhor interpretação dos resultados. Ela se baseia na absorção e reemissão de energia dos núcleos dos átomos a partir de variações de um campo magnético externo criado pelo equipamento. É uma técnica rápida e fácil de se reproduzir, além de fornecer análises tanto qualitativas quanto quantitativas (Canuto *et al.*, 2017; Agin *et al.*, 2016).

A técnica de análise por espectrometria de massas é a estratégia mais utilizada por oferecer uma boa combinação entre seletividade e sensibilidade. Ela foi definida pela União de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como “o estudo de sistemas por processamento de formação de íons gasosos, com ou sem fragmentação, que são caracterizados por suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e suas abundâncias relativas”, ou seja, ela calcula a razão de massa sobre carga de íons, esses vêm de uma fonte de ionização que gera íons na fase gasosa a partir de moléculas neutras ou carregadas utilizando campos elétricos ou magnéticos. Dentro da espectrometria de massas existem diversas tecnologias com princípios e desempenhos diferentes. Aqui é possível citar duas estratégias baseadas em MS: análise direta por MS e análise por MS acoplado a técnicas de separação. As análises diretas não precisam de separação cromatográfica prévia e a extração de metabólitos pode ser feita por infusão direta dos extratos ou por dessorção a laser assistida

por matriz. Já nas análises que necessitam de separação prévia normalmente utiliza-se a cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência ou a eletroforese capilar. A cromatografia gasosa a técnica mais utilizada por ter alta robustez e repetibilidade e pela sua capacidade de informar o tempo de retenção e o padrão de fragmentação observado pela ionização de elétrons, essa separação reduz os efeitos da matriz, separa isômeros, fornece dados adicionais para a caracterização de metabólito e melhora a quantificação dos mesmos, no entanto, sua execução pode ser complicada visto que a maioria dos metabólitos precisam passar por um processo delicado e passível de erros para se tornarem voláteis a baixas temperaturas. Já a cromatografia líquida vem crescendo por apresentar altas taxas de sensibilidade e seletividade e ser mais fácil de executar, além de ser considerada uma técnica mais viável pela natureza dos compostos analisados. A eletroforese capilar é mais utilizada complementarmente às duas anteriores já que provoca a separação de compostos iônicos polares e possuir alta resolução em curtos tempos de análise. Ela não é usada sozinha por apresentar problemas de repetibilidade e sensibilidade. (Abdelnur, 2011; Agin *et al.*, 2016; Canuto *et al.*, 2017).

As análises geram muitos dados que também são complexos, por isso, é necessário tratá-los adequadamente. Para a análise *untargeted* realiza-se alinhamento e agrupamento de dados, seguido de correção do tempo de retenção e de linha de base, desenvolvimento espectral e normalização, trabalho que pode ser feito por softwares próprios. Para a análise *targeted* é necessário realizar a quantificação do(s) metabólito(s) pré-selecionado(s). Os resultados também passam por análises estatística para extração de informações relevantes e por interpretação biológica que tem o objetivo de responder os questionamentos feitos ao início do experimento. Antes dessa última, em análises *untargeted* também é necessária a identificação e determinação putativa de metabólitos através de bibliotecas de espectro e bases de dados públicas. (Canuto *et al.*, 2017).

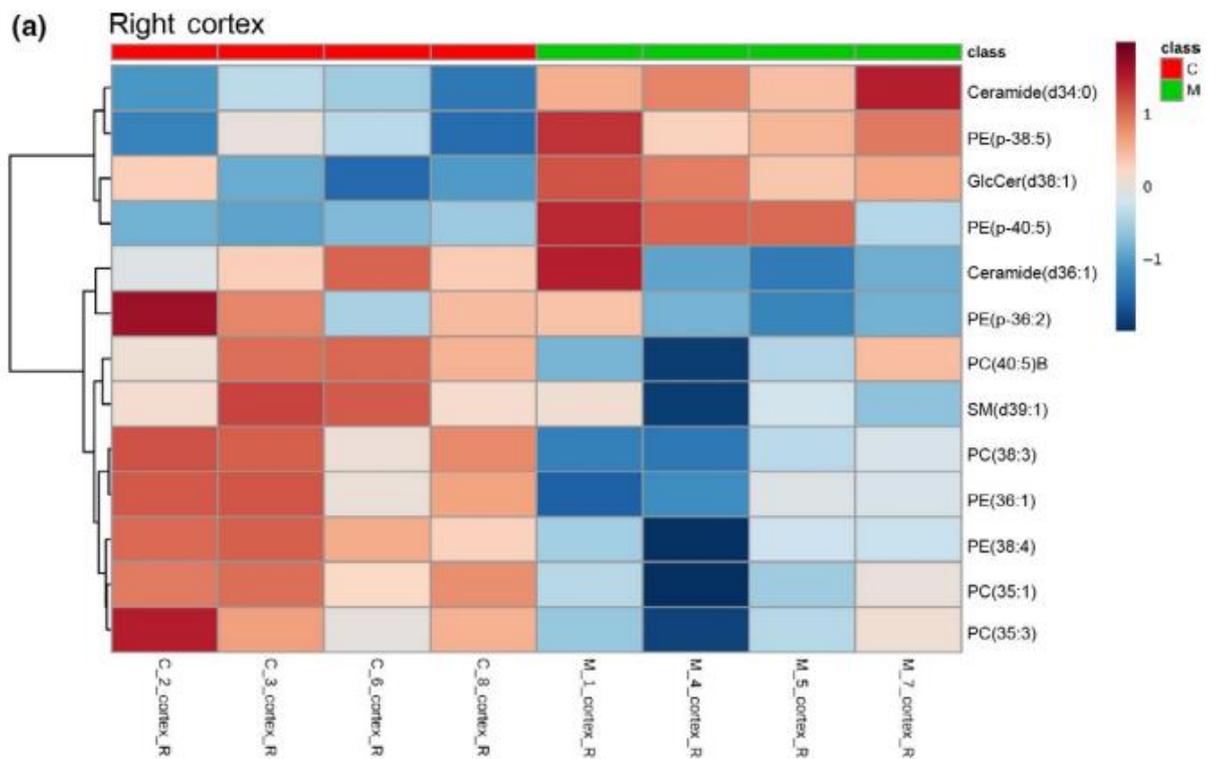
### 6.3 Aplicações da metabolômica na Medicina Veterinária

Como pode ser percebido, a metabolômica é uma análise muito completa e inovadora. Por sua versatilidade, pode ser aplicada em diferentes áreas da medicina veterinária, na presente revisão serão citadas algumas delas em que a metabolômica foi usada. Na medicina equina, Anderson (2022), traz em um trabalho que a metabolômica pode ser usada para identificar e diagnosticar doenças equinas, e até monitorar a resposta dos cavalos aos tratamentos pela identificação de biomarcadores que podem prever, por exemplo, a recorrência de laminite. O autor traz também que essa análise pode ser usada para desenvolver novos

biomarcadores para doenças equinas e para melhorar nossa compreensão da fisiopatologia dessas doenças, pois com a metabolômica é possível identificar alterações metabólicas que ocorrem por exemplo na síndrome da cólica equina. Para tal ele cita dois estudos, o primeiro, feito por Escalona *et al.* (2017), visou a produção de um “atlas de metabólitos” de bioflúidos de equinos e gerou uma visão abrangente do metaboloma equinos que pode ser usado para identificar potenciais biomarcadores de doenças comuns nesses animais. O segundo artigo, Beachler (2020), traz a análise metabolômica identificando biomarcadores e alterações metabólicas específicas de placentite em éguas gestantes, o que pode ser usado para diagnosticar a doença precocemente.

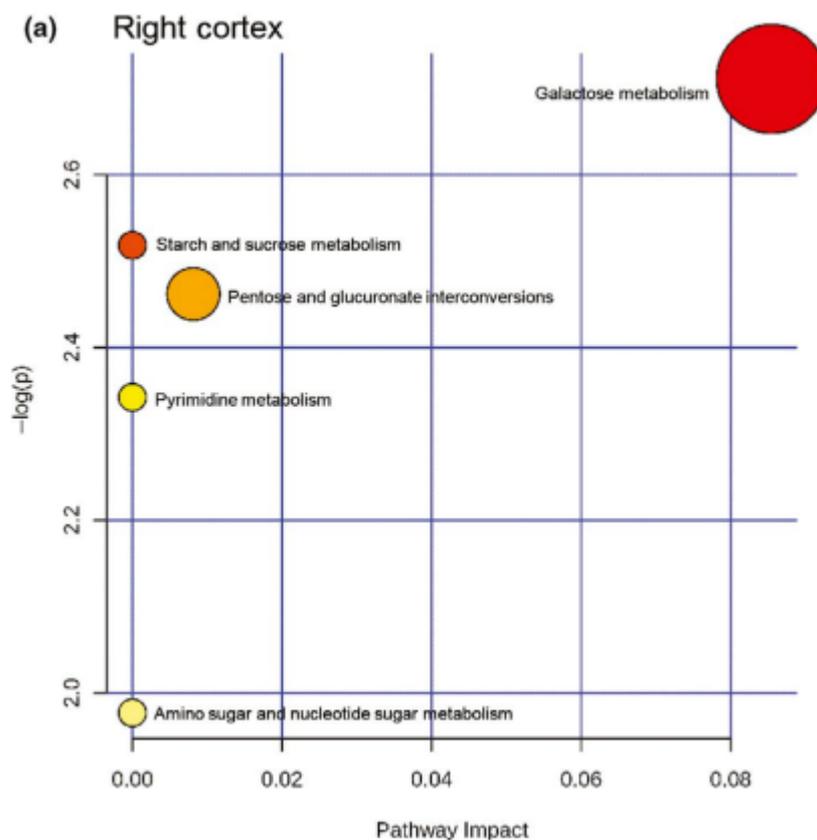
A metabolômica também pode ser usada em farmacologia e terapêutica veterinária. Em um experimento realizado por Rivera-Veléz e colaboradores (2019), com o objetivo avaliar os efeitos da administração repetida de meloxicam no perfil metabólico de gatos, observou-se que essa administração repetida alterou o perfil metabólico das amostras analisadas (plasma sanguíneo e urina), sugerindo que esse tipo de regime de doses pode causar efeitos adversos no metabolismo de gatos incluindo alterações no metabolismo energético, estresse oxidativo, inflamações e metabolismos ósseo e renal (Figuras 17 e 18). Relatos assim evidenciam a relevância das análises metabolômicas, o tratamento com meloxicam em gatos é altamente difundido e é importante ter o conhecimento dos efeitos que ele tem no animal. Essas informações obtidas podem auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos e diagnósticos para doenças em animais.

Figura 17: Mapa de calor do experimento de Rivera-Velez e colaboradores proveniente de uma análise lipidômica. Demonstra os lipídios presentes no córtex renal de gatos tratados com meloxicam e com solução salina. Quanto maior a intensidade do sinal de um lipídeo, mais vermelho ele é demonstrado no mapa, e quanto menor a intensidade, mais azul. Com esse tipo de imagem gerada é possível ter uma melhor representação visual dos resultados de análises ômicas



Fonte: Rivera-Velez *et.al.* **Understanding the effect of repeated administration of meloxicam on feline renal cortex and medulla: A lipidomics and metabolomics approach.** Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, p. 480, 2019.

Figura 18: Gráfico do experimento de Rivera-Velez e colaboradores proveniente de uma análise metabolômica em gatos tratados repetidamente com meloxicam. Demonstra vias metabólicas alteradas no córtex renal direito. Cada ponto representa uma via metabólica, quanto mais significativo o resultado mais para cima do eixo ele está e mais vermelho. A escala de significância por cor segue a ordem branco, amarelo, laranja e vermelho. Quanto mais a direita e maior o diâmetro do ponto, mais importante é o metabólito alterado para aquela via.



Fonte: Rivera-Velez *et.al.* **Understanding the effect of repeated administration of meloxicam on feline renal cortex and medulla: A lipidomics and metabolomics approach.** *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, p. 484, 2019.

Outra possível aplicação dessa análise é na medicina de animais atletas. Turlo, *et al.* (2018), trazem um artigo sobre a detecção de biomarcadores em lesões musculoesqueléticas em cavalos puro-sangue inglês. Foram incluídos no estudo animais com e sem lesões musculoesqueléticas e as análises foram feitas por RMN. Os resultados mostraram que os

cavalos lesionados apresentaram alterações significativas nos perfis metabólicos de soro sanguíneo em comparação com os não lesionados. Os resultados do estudo, então, sugerem que é possível identificar alterações metabólicas que podem contribuir para a patogênese da lesão. O que possibilita que esse perfil metabólico seja usado para diagnósticos de lesões e para o monitoramento da resposta a tratamentos. Keen e colaboradores (2022) também trabalharam com análises metabolômicas em cavalos de esporte focando em antidoping esportivo e concluíram que a metabolômica é uma grande aliada na detecção de uma ampla gama de substâncias proibidas, inclusive aquelas que são difíceis de detectar por métodos tradicionais por serem rapidamente metabolizadas ou excretadas em pequenas quantidades. Um exemplo de uma dessas drogas é o beta-estradiol que é rapidamente excretado na urina em concentrações baixas.

Keen e colaboradores (2022) também evidenciaram aplicações na toxicologia clínica e forense, e na análise de resíduos veterinários. As análises toxicológicas têm o objetivo de identificar e quantificar drogas e produtos químicos tóxicos em tecidos ou biofluidos. No estudo referido concluiu-se que é possível identificar drogas de abuso, medicamentos legais e produtos químicos industriais nos tecidos analisados. Já na parte relacionada a resíduos veterinários, o estudo foi feito para detectar e quantificar medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, os resultados obtidos também foram positivos.

Existem também aplicações importantes para a produção animal. Um estudo de Zhang e colaboradores (2020) aplicou análise metabolômica no fluido ruminal de vacas leiteiras com diferentes níveis de produção de leite. Os resultados demonstraram que em comparação à animais de baixa e média produção, as vacas de alta produção apresentaram aumento em níveis de ácidos graxo voláteis, o que sugere aumento da fermentação ruminal, aumento de níveis de aminoácidos sugerindo maior absorção ruminal de nutrientes, e redução de citocinas pró inflamatórias. A partir disso, é possível sugerir que existe sim uma diferença no metabolismo dessas vacas, e esses dados podem ajudar no maior entendimento dos fatores que contribuem para a diferença nos níveis produtivos e no desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a produção leiteira.

Por último, cabe citar o uso da metabolômica na medicina personalizada. Em um estudo de Hotea e colaboradores (2023), foi feita uma revisão de literatura com a integração da metabolômica com a nutrição animal e concluiu-se que essa integração tem o potencial de revolucionar a medicina personalizada visto que permite o diagnóstico precoce de doenças a partir da identificação de biomarcadores antes mesmo do aparecimento de sintomas, o

monitoramento da progressão de doenças e a eficácia dos tratamentos utilizados e, a partir disso, o desenvolvimento de tratamentos e/ou dietas personalizadas para cada paciente.

#### 6.4 Conclusão

Em vista do exposto, é possível concluir que a abordagem metabolômica apresenta eficácia em diversas áreas da medicina veterinária, apresentando resultados promissores e mostrando novos caminhos para a possível resolução de problemas persistentes como na clínica médica e na produção animal. É de suma importância que as análises sejam feitas seguindo as técnicas mais adequadas para cada situação proposta, visto que por se tratar de uma análise de moléculas muito pequenas e sensíveis, o emprego da técnica errada pode influenciar negativamente o resultado de todo o experimento. Por fim, conclui-se que a metabolômica tem um grande potencial dentro da medicina veterinária e a popularização dela pode contribuir positivamente para muitos avanços científicos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período de estágio supervisionado causa uma sensação ambígua, pois, ao mesmo tempo que o discente está acompanhando todas as atividades ainda como estagiário, é o momento do curso que estamos mais próximos do mercado de trabalho. Essa experiência é uma oportunidade do futuro médico veterinário observar e explorar o mercado de trabalho ainda com uma certa distância, mas se preparando para o ciclo que se inicia após a graduação. A ansiedade gerada pelo fim do ciclo acadêmico pode ser desafiadora, mas é importante manter em mente que o estágio é uma oportunidade a ser aproveitada, não apenas para colocar em prática os aprendizados adquiridos ao longo do curso, mas também as habilidades sociais de cada um, que são de grande importância em um ambiente de trabalho.

Realizar esse estágio na Embrapa foi muito proveitoso em diversos quesitos. Foi muito interessante acompanhar o funcionamento de um centro de pesquisa e ver as diversas formas e áreas que o médico veterinário pode atuar lá dentro. Ter essa oportunidade de estágio também me permitiu o contato com tecnologias de ponta e métodos de análise muito novos, que a maioria dos médicos veterinários não têm contato e que possuem um enorme potencial analítico. Estar nesses lugares possibilita perceber o potencial para novas descobertas e ideias

e aguçam a vontade de “fazer ciência” o que é muito positivo visto que é uma área ainda de pouco interesse na Medicina Veterinária.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNUR, P.V. **Metabolômica e Espectrometria de Massas**. 2011. Circular Técnica. Embrapa, Brasília, ISSN 2177-4420, v.10, 4p.

AGIN, A.; HEINTZ, D.; RUHLAND, E.; BARCA, J.M.C.; ZUMSTEG, J.; MOAL, V.; GAUCHEZ, A.S.; NAMER, I.J. **Metabolomics – an overview. From basic principles to potential biomarkers (Part 1)**. *Médecine Nucléaire*. v.40, p.4-10, 2016.

ANDERSON, J.R. **Science-in-brief: Proteomics and metabolomics in equine veterinary science**. *Equine Veterinary Journal*, v. 54, n. 2, p. 449-452, 2022.

BEACHLER, T.; GRACZ, H.; LONG, N.M.; BORST, L.; MORGAN, D.; NEBEL, A.; et al. **Os metabólitos alantóides, a progesterona e o estradiol-17 $\beta$  permanecem inalterados após a infecção em um modelo experimental de placentite ascendente equina**. *J Equine Vet Sci*. 2019;73:95–105.

BHATTACHARJEE, S. **DLS and zeta potential – What they are and what they are not?** *Journal of Controlled Release*. v.235, p.337–351. 2016. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.06.017

CANUTO, Gisele AB et al. **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas**. *Química Nova*, v. 41, p. 75-91, 2018.

COWLEY, F. C. et al. **Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism**. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 4, p. 2356-2368, 2015.

ESCALONA, E.E.; LENG, J.; DONA, A.C.; MERRIFIELD, C.A.; HOLMES, E.; PROUDMAN, C.J.; et al. **Componentes dominantes do metaboloma puro-sangue caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$ : um atlas metabólico de biofluidos comuns**. *Veterinário Equino J*. 2015;47:721–30.

FISCHER, Vivian et al. **Estresse calórico em vacas leiteiras: efeito sobre o metabolismo e a qualidade do leite**. In: BARBOSA, F. A. A.; LOPES, P. H. (Org.). *A vaca leiteira do século 21: lições de metabolismo e nutrição*. São Paulo: Editora Unesp, 2014. p. 61-76

GUIJAS, C.; MONTENEGRO-BURKE, J. R.; WARTH, B.; SPILKER, M. E.; SIUZDAK, G. **Triagem de atividade metabolômica para identificação de metabólitos que modulam o fenótipo**. *Biotecnologia da Natureza*, 36(4), 316-320, 2018.

HOTEA, I.; et al. **Integrating (Nutri-) Metabolomics into the One Health Tendency—The Key for Personalized Medicine Advancement**. *Metabolites*, v. 13, n. 7, p. 800, 2023.

KEEN, B.; et al. **Metabolomics in clinical and forensic toxicology, sports anti-doping and veterinary residues**. *Drug Testing and Analysis*, v. 14, n. 5, p. 794-807, 2022.

NALBANTOĞLU, Sinem. **Metabolomics: basic principles and strategies**. *Mol. Med*, v. 10, 2019.

RIVERA-VELEZ, Sol M. et al. **Understanding the effect of repeated administration of meloxicam on feline renal cortex and medulla: A lipidomics and metabolomics approach.** Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, v. 42, n. 4, p. 476-486, 2019.

STAGLJAR, Igor. **The power of OMICs.** Biochemical and biophysical research communications, v. 479, n. 4, p. 607-609, 2016.

TURLO, A.J.; et al. **Detecting Biomarkers of Musculoskeletal Injury in Racing Thoroughbreds with Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics.** BEVA, Equine Veterinary Journal, 3 Sept. 2018, doi-rg.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1111/evj.47\_13008.

YU, L.; LI, K.; ZHANG, X. **Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review.** Oncotarget, 8(70), 115774, 2017.

ZHANG, H.; et al. **Metabolomics reveals potential biomarkers in the rumen fluid of dairy cows with different levels of milk production.** Asian-Australasian journal of animal sciences, v. 33, n. 1, p. 79, 2020.