

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool

Title: Análise histopatológica da estrutura óssea e da placa de crescimento do fêmur e tíbia de porcos (*Sus scrofa domesticus*) expostos por via oral ao Captan (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide).

Creator: Ana Cláudia Lima

Affiliation: Universidade Federal de São Paulo (unifesp.br)

Principal Investigator: Ana Cláudia Tenfen das Chagas Lima

Funder: Digital Curation Centre (dcc.ac.uk)

Funding opportunity number: 59884

Template: Digital Curation Centre

Project abstract:

Suínos (*Sus scrofa domesticus*) são reconhecidos por suas similaridades fisiológicas e anatômicas com seres humanos, tornando-os um modelo experimental confiável para pesquisas biomédicas. Além disso, suínos são um dos principais rebanhos da pecuária e representam a carne mais consumida no planeta. Isto posto, análises de toxicidade de substâncias em suínos são de extrema relevância pois geram dados que são expansíveis tanto para a área de veterinária (patologia e produção), quanto extrapolados para humanos, principalmente dentro do contexto de Saúde Única. Tendo em vista que a criação de suínos pode ser encontrada próximas de grandes e pequenas plantações, e que estas podem ser contaminadas pelos agrotóxicos utilizados nestas lavouras, nos faz pensar nos impactos do uso destas substâncias nesses rebanhos e de como tal exposição pode também estar ocorrendo nos trabalhadores rurais que vivem próximos a estas regiões de cultivo. Essa questão de saúde pública se torna ainda mais relevante no estado do Mato Grosso, por ser o principal produtor de grãos do Brasil e a produção tecnificada de suínos expande na mesma proporção. Por conta disso, a comercialização de pesticidas ocorre em grande escala e, juntamente de diversos produtos, Captan se destaca como um dos principais fungicidas utilizados em sementes. Essas condições criam riscos toxicológicos diretos para os produtores de grãos, funcionários de granjas suínas e para os animais, além do risco indireto para a população consumidora de carne e grãos. Isto posto, o presente projeto tem como objetivo avaliar alterações macroscópicas e histológicas na estrutura óssea e na cartilagem da placa epifisária dos membros pélvicos de porcos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) expostos a doses subletais de Captan, um fungicida da classe ftalimida, amplamente utilizado na agricultura brasileira. Para isso, quatorze porcos, com três meses de idade, foram alocados em dois grupos, G1 (n = 7) e G2 (n = 7), onde o primeiro recebeu uma dieta com dose de 500 mg/kg do fungicida Captan, e G2 que recebeu a mesma dieta, mas sem a adição do fungicida por 7 semanas. Os animais foram então eutanasiados, sendo o fêmur e a tíbia esquerda serrados e fotografados para análises macroscópicas, e amostras de proximais e distais do fêmur e da tíbia do lado direito coletadas e fixadas em formalina a 10%, para análises microscópicas. Estas últimas serão realizadas após a inclusão em parafina e aplicação das técnicas de Hematoxilina e Eosina,

Safranina, Tricromo de Masson e Picrosirius Red, além de análises de imunohistoquímica para os fatores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , fatores da osteoclastogênese RANK (ab 13918), RANKL e OPG e metaloproteinases – MMPs, MMP-1, MMP-8 e MMP-13. A hipótese principal deste estudo experimental é que a exposição ao Captan, em doses sub letais, possa induzir a falhas localizadas na ossificação endocondral, uma lesão insidiosa que posteriormente pode causar osteocondrose.

Start date: 01-18-2021

End date: 12-30-2022

Last modified: 01-15-2021

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Análise histopatológica da estrutura óssea e da placa de crescimento do fêmur e tíbia de porcos (*Sus scrofa domesticus*) expostos por via oral ao Captan (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide).

Serão coletados dados sobre os possíveis efeitos tóxicos da exposição subcrônica ao fungicida Captan (N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide), em ossos longos (fêmur e tíbia) dos membros pélvicos de suínos (*Sus scrofa domesticus*). Os parâmetros avaliados serão: alterações macroscópicas e microscópicas no fêmur e tíbia de suínos expostos ao fungicida Captan.

Análises macroscópicas

A superfície de corte das extremidades dos ossos serão examinadas macroscopicamente de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Pesquisa de Osteoartrite (OARSI) em cinco escores: [0] superfície cartilaginosa intacta; [1] rugosidade da superfície articular; [2] erosões superficiais (fissuras e fibrilação) não atingindo o osso subcondral; [3] erosões intermediárias atingindo até 5mm diâmetro do osso subcondral e [4] erosões profundas atingindo mais 5mm diâmetro do osso subcondral. Para a mensuração do diâmetro será utilizado o programa ImageJ (VANDEWEERD et al., 2013).

Descalcificação

Logo após a fixação em formalina tamponada a 10 % as amostra de fêmur e tíbias serão descalcificadas em solução de EDTA a 10% em temperatura ambiente, até que as amostras apresentem-se maleáveis.

Inclusão

Após a descalcificação, as amostras serão reduzidas para que caibam em lâminas, criando assim fragmentos da porções proximais e distais dos ossos em análise. As amostras serão então incluídas em parafina com o auxílio do inclusor automático Leica TP1020 e serão emblocados na central de inclusão EG1150H Leica, seguindo o protocolo: desidratação em etanol 70%, 80%, 90%, 100% e posteriormente 3 passagens pelo de xilol, e três banhos em parafina processados no período noturno automaticamente.

Análises Microscópicas

Serão realizados cortes de 7µm para as análises histopatológicas e de 15µm para as análises de imuno-histoquímicas. Para as análises de de histopatologia, serão aplicadas as seguintes técnicas seguidas de seus protocolos: Hematoxilina e Eosina, para analisar a estrutura óssea e de cartilagem; PAS e Safranina aplicadas na cartilagem e Tricromo de Masson, Picrosirius Red e TRAP para a região calcificada.

a) Hematoxilina e Eosina: Segundo Paulete & Beçak (1976) esta técnica é composta dos reagentes, Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo celular de azul, e Eosina, que possui características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa. Para a realização desta técnica, as lâminas serão deixadas em água destilada por 1 minuto, coradas com hematoxilina por 5 minutos, reagirão com água por 4 minutos, serão lavadas em água corrente, coradas com eosina por 5 minutos e lavadas em água corrente.

b) PAS (Ácido Periódico de Schiff): Segundo Paulete & Beçak (1976) o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar à formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Para a realização desta técnica as lâminas serão deixadas em ácido periódico 0,4% por 10 minutos, lavadas em água destilada, reagirão com o reativo de Schiff por 1h no escuro, lavadas em água sulfurosa (3 banhos de 1 minutos cada), lavadas em água corrente por 10 minutos.

c) Picrossirus Red: Segundo Pearse (1985), a técnica é utilizada para diferenciar fibras colágenas do tipo I, de fibras colágenas do tipo III. O colágeno tipo I é evidenciado por coloração vermelha, ao passo que o colágeno tipo III, é marcado de verde. Na realização da técnica, as lâminas são coradas com Picrossirus durante 1 hora em estufa a 60°C (o corante já pré-aquecido), depois lavadas em água destilada, coradas com hematoxilina por 8 minutos e lavadas em água corrente.

d) Safranina Segundo Paulete & Beçak (1976): Esta técnica é usada para evidenciar regiões de cartilagem. Na realização desta técnica as lâminas inicialmente são coradas com Hematoxilina por 7 min, lavadas em água, coradas com safranina 0,1% por 5 min e lavadas em água.

e) Tricrômico de Masson segundo Paulete & Beçak (1976): é uma das colorações mais usadas para visualização diferencial de fibras colágenas. Composta por azul de anilina, orange G, ácido fosfotúngstico e hematoxilina (contra coloração), corando as fibras colágenas de azul, fibras musculares de vermelho e fibras elásticas de amarelo ou rosa. Na realização desta técnica as lâminas inicialmente são coradas com Hematoxilina por Hematoxilina férrica por 10 min; lavadas em água; lavadas em solução alcoólica de ácido pícrico por 6min; coradas com Fucsina de Ponceau por 4 min; lavadas em solução ácida fosfomobilídica por 5min e coradas com Azul de anilina de Masson por 5min.

f) As análises de imunomarcação serão realizadas para fatores inflamatórios IL-1 β (ab19140), IL-6(ab9324), IL10(ab192271) e TNF- α (ab22021), fatores da osteoclastogênese RANK(ab13918), RANKL(ab23960) e OPG(ab73400), metaloproteinases – MMPs, MMP-1(ab137332), MMP-8(ab53017) e MMP-13(ab219620) e para o fator osteogênico TRAP (ab19140). Posteriormente ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (10 volumes) das ligações inespecíficas com PBS/BSA 2 % por uma hora cada, os cortes serão mergulhados em solução de tampão citrato pH 6,0 em banho-maria para recuperação antigênica. Após o resfriamento e lavagem em PBS, as amostras serão incubadas com os anticorpos primários por dezoito horas a 4-8 °C. A seguir, os cortes serão lavados em PBS e incubados a 4-8 °C por 3 horas com o anticorpo secundário. A reação será revelada com solução de diaminobenzidina (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio líquido (0,005 mL/100 mL) em PBS por 10 minutos. Os cortes serão lavados em PBS, contracorados com hematoxilina.

Análise dos dados

Os dados obtidos por estas diferentes metodologias aplicadas serão comparados, visando identificar as modificações causadas pelo agrotóxico nos grupos tratados, em relação ao grupo controle. Inicialmente será realizada a análise qualitativa das técnicas de histologia e histoquímica, visando identificar as possíveis alterações na estrutura dos ossos e placas de crescimento aqui propostas. Após esta primeira etapa, todo o grupo de pesquisadores colaboradores deste projeto irão discutir os resultados obtidos e quais seriam as melhores estratégias para as análises imunohistoquímicas, seguindo o planejamento descrito no item "análises microscópicas". Encerrada esta etapa metodológica final, o grupo irá discutir os resultados finais, visando compilar as informações geradas, visando um entendimento de como este composto pode atuar no osso e nas placas de crescimento sempre levando em consideração a estrutura normal obtida no grupo controle.

Os dados serão inseridos em planilhas do programa Excel, em abas específicas para cada análise realizada, para

possibilitar posterior análise estatística em programa específico (GraphPad Prism).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UFMT, em reunião ordinária no dia 03/08/2015. Submetido sob protocolo de Número 23108.087455/2015-13, com o título “Indução experimental de lesão osteocondral por ditiocarbamato em suínos”, sob a responsabilidade do Prof. O Dr. Edson Moleta Colodel/Marcos de Almeida Souza & Col., estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os dados gerados são de propriedade da Universidade podendo, porém, ficar disponíveis em bancos públicos após a publicação dos artigos científicos em revistas especializadas. O acesso aos artigos científicos seguirá os critérios das normas de acesso do periódico.

Os dados serão armazenados no sistema de nuvem Google Drive e nos computadores pessoais dos pesquisadores envolvidos, além de cópias dos conteúdos armazenadas em HD externo.

O acesso ao conteúdo será realizado pelos pesquisadores envolvidos no projeto, através de senha. Os dados poderão ser disponibilizados para todos que tiveram legítimo e comprovado interesse nos dados e solicite acesso a eles.

Todos os dados obtidos serão armazenados, por pelo menos 10 anos, após o final do estudo.

Todos os dados obtidos serão armazenados, por pelo menos 10 anos, após o final do estudo.

Os dados serão compartilhados por meio de apresentações em congressos, pela publicação de artigos científicos e pelo repositório institucional da Universidade Federal de São Paulo.

Os dados poderão ser compartilhados após a publicação dos trabalhos em revistas científicas. É possível que haja alguma restrição no compartilhamento de dados devido o interstício imposto pelo copyright das revistas científicas as quais os dados serão submetidos.

Os pesquisadores envolvidos no projeto serão responsáveis pelos dados.

Os recursos necessários consistem em amplo acesso a plataformas online que permitam a coleta de documentos e a conexão com os interessados.
