



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA - UNIPAMPA
CADASTRO DE PROJETO INSTITUCIONAL



Dados do Projeto

Número de Registro:	2022.PE.UR.1010	Código:	1010
Coordenador:	Francielli Weber Santos Cibir	Controle:	61007
Área:	Pesquisa	Unidade Origem:	CAMPUS URUGUAIANA
Modalidade:	Projeto de Pesquisa	Telefone:	(55)999688269
Título:	Avaliação do efeito de pesticidas sobre a qualidade e função espermática de bovinos		
Execução:	De 13/06/2022 a 17/12/2024	Nº de Registro no SIPPEE:	Não consta
Autoriza Publicação Resumo:	Sim	Área de Conhecimento:	Ciências Biológicas
Grupo de Pesquisa:	Biotecnologia da Reprodução - BIOTECH UNIPAMPA	Possui interação com o setor produtivo:	Não
Cooperação interinstitucional dentro do país:	Não	Cooperação interinstitucional fora do país:	Não
Palavras-chave:	espermatozoides / pesticidas / bovinos / reprodução / fertilização		

Resumo do Projeto

A utilização de pesticidas, em especial os de finalidade herbicida, vem apresentando um vertiginoso aumento ao longo das décadas, no intuito de acompanhar a intensidade da produção econômica. Herbicidas a base de glifosato, 2,4 D e atrazina estão entre as formulações mais utilizadas no Brasil, sendo aplicados isoladamente ou em conjunto, a fim de proporcionar maior eficiência, fato que gera preocupação no campo científico devido as consequências da exposição a esses compostos sobre saúde humana e animal. Nesse âmbito, os efeitos sobre aspectos reprodutivos justificam a necessidade de avaliar a possível participação conjunta desses compostos no comprometimento da reprodução. Dessa forma, o presente estudo pretende analisar os efeitos de concentrações de glifosato, 2,4D e atrazina, sobre a função e qualidade de células espermáticas de bovinos, identificando possíveis mecanismos de ação desses compostos. Para isso, palhetas com sêmen bovino congeladas, de touros com fertilidade comprovada, serão descongeladas e a seleção espermática será realizada por gradiente de Percoll. Então, os espermatozoides bovinos serão expostos a diferentes concentrações ambientais dos pesticidas de forma isolada e sob a forma de misturas, e em seguida avaliados os efeitos destas exposições sobre a viabilidade, funcionalidade, estrutura e parâmetros de estresse oxidativo e dano no DNA. Por fim, verificar os efeitos sobre a capacidade fecundante, através da fertilização *in vitro*. Ao final do estudo, espera-se obter resultados que permitam elucidar quanto aos efeitos provocados pela exposição indireta a compostos de finalidade herbicida, tendo em vista o crescente uso dos mesmos. De particular importância, este estudo trará informações relevantes a respeito do efeito da exposição a misturas de pesticidas, em um contexto muito próximo ao da realidade vivenciada, auxiliando na elucidação sobre o possível papel destes compostos no comprometimento da fertilidade em mamíferos.

Introdução e Justificativa

Atualmente, os herbicidas consistem na categoria de pesticidas agrícolas mais utilizada no mundo em decorrência da demanda econômica. A necessidade de um uso cada vez mais intenso desses

compostos vem de encontro com a preocupação gerada pelo grau de exposição e associação desse fato com a ocorrência de problemas de saúde e impactos no meio ambiente como um todo (MESNAGE et al., 2021).

O Brasil é consumidor significativo de grande número e variedade de pesticidas, inclusive os denominados "extremamente perigosos" (Highly Hazardous Pesticides -HHP), banidos em diversos países (FERNANDES et al., 2020). Entre os pesticidas mais utilizados no país citam-se os herbicidas a base de glifosato, seguidos pelas formulações com ácido diclorofenoxiacético (2,4D) e de atrazina. A aquisição de resistência a pesticidas das espécies vegetais indesejáveis na produção agrícola tem estimulado o manejo através de um volume cada vez maior de herbicidas, sendo aplicados de maneira isolada ou em conjunto para garantia de melhores resultados (BROVINI et al., 2021)

A literatura tem demonstrado ao longo dos anos os efeitos da exposição a estes compostos, verificando mecanismos que permitem associar prejuízos a saúde com a ação dessas substâncias sobre o funcionamento de diversos processos fisiológicos, entre eles, os atrelados ao sistema reprodutivo (SENGUPTA; BANERJEE, 2014). O potencial de pesticidas de atuar como disruptores endócrinos e provocar efeitos adversos por mecanismos de citotoxicidade, tem contribuído para que a exposição contínua a essas substâncias tenha relação com o aumento da infertilidade, abortos espontâneos e, inclusive, com consequências nas gerações seguintes (FUCIC et al., 2021).

Entre os efeitos adversos ao sistema reprodutor masculino, estudos sobre exposição a herbicidas a base de glifosato demonstram sua capacidade de desregulação da enzima aromatase e de promover a diminuição da quantidade e performance de espermatozóides (ANIFANDIS et al., 2018; NEROZZI et al., 2020). A presença de 2,4D no sêmen está associada a diminuição da qualidade do mesmo, motivada por mecanismos que incluem o estresse oxidativo provocado pelo pesticida (TAN et al., 2016). Já a atrazina consiste em um conhecido disruptor endócrino, capaz de elevar níveis de estrógeno circulante, interferir na espermatogênese e promover danos às células espermáticas (KOMSKY-ELBAZ; ROTH, 2017).

No entanto, apesar do grande número de estudos que abordam a exposição a pesticidas e reprodução, ainda existem lacunas no que diz respeito a associação desses compostos em um contexto de misturas que permita mimetizar a realidade (MESNAGE et al., 2021). Nesse sentido, também carecem estudos que utilizem protocolos de exposição com concentrações mais factíveis, próximas às ambientais (ROTH; KOMSKY-ELBAZ; KALO, 2020).

Por essa razão, o presente estudo visa elucidar quanto ao potencial de concentrações baixas dos princípios ativos dos herbicidas glifosato, 2,4D e atrazina, isolados e em conjunto, de promover danos a reprodução através de um modelo de exposição de espermatozóides bovinos, avaliando efeitos sobre a qualidade e função espermática, assim como a capacidade fecundante destes gametas.

Objetivos

- Geral: Avaliar o efeito da exposição a concentrações baixas dos herbicidas glifosato, 2,4D e atrazina, de forma isolada e conjunta, sobre a qualidade e função de espermatozoides bovinos.

- Específicos:

> Analisar efeitos dos tratamentos sobre a viabilidade e funcionalidade espermática.

> Mensurar parâmetros de estresse oxidativo e fragmentação do DNA nos diferentes grupos de estudo.

> Avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides de diferentes grupos de tratamento, através da fertilização *in vitro*.

> Comparar resultados da exposição decorrente dos compostos isolados e em conjunto.

Materiais e Métodos

Amostra e pesticidas:

Sêmen congelado bovino obtido de touros com fertilidade comprovada serão descongelados a 37°C e homogeneizados. Os espermatozóides serão selecionados utilizando a solução do gradiente de Percoll conforme Gonçalves et al. (2018), centrifugados e ressuspensos no meio TALP-FERT (PARRISH et al., 1986), na concentração de 4 x10⁶ espermatozóides/mL.

Os princípios ativos dos herbicidas, glifosato, ácido diclorofenoxiacético (2,4D) e atrazina, serão adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. os quais serão utilizados na exposição dos gametas.

Protocolo experimental:

Experimento 1:

Neste experimento, os princípios ativos dos herbicidas serão testados de forma isolada, em baixas concentrações, a fim de mimetizar níveis de exposição ambiental. Esta etapa tem como objetivo selecionar uma concentração de cada composto, a ser utilizado do experimento 2. O glifosato será utilizado nas concentrações de 5, 36 e 50 µg/mL (ANIFANDIS et al., 2018; NEROZZI et al., 2020). O 2,4D será testado nas concentrações de 0,05 µM, 1 µM e 5 µM (TAN et al., 2016) e a atrazina, será estudada nas concentrações de 0,05 µM; 0,1 µM e 1 µM (KOMSKY-ELBAZ; ROTH, 2017). As diluições dos compostos serão feitas em dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

Dessa forma, os seguintes grupos serão organizados: grupo controle (C1), grupo glifosato (GLI5, GLI36 e GLI50), grupo 2,4D (DA05, DA1 e DA5) e grupo atrazina (AT05, AT01 e AT1). O tempo de exposição será de 1 h, a temperatura de 38 °C. Como parâmetro de avaliação será utilizada a cinética espermática (motilidade total e progressiva) a fim de selecionar as concentrações para o experimento 2.

Experimento 2:

O objetivo deste experimento consistirá em comparar efeitos isolados e na forma de misturas dos princípios ativos dos pesticidas, de acordo com as concentrações definidas no experimento 1. Para isso, os seguintes grupos serão organizados: grupo controle (C1), grupo Gli, grupo DA, grupo AT, grupo Gli+DA, grupo Gli+AT, grupo DA+AT e grupo Gli+DA+AT. Da mesma forma que o experimento 2, para esses grupos serão utilizados o tempo de incubação de 1 hora e temperatura de 38°C.

Com o intuito de atender aos objetivos da pesquisa, serão realizadas análises para verificar os efeitos destes protocolos de exposição que reflitam possíveis danos a integridade e funcionalidade celular.

Parâmetros avaliados:

1. Cinética espermática: Os efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros de movimentação serão avaliados mediante o sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) com o auxílio do software SCA (Sperm Class Analyzer), versão 5.1 (Microptotic, Barcelona/Espanha). Serão avaliados os parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), linearidade (LIN), velocidade em linha reta (VLR), velocidade média do trajeto (VMT) e o percentual de espermatozoides com movimento rápido (hiperatividade).

2. Viabilidade: A análise da viabilidade será realizada a partir das avaliações de integridade da membrana espermática, integridade do acrossoma e do potencial de membrana mitocondrial através do uso de microscopia de fluorescência. Para isso, serão confeccionadas lâminas, previamente adicionando as amostras, 3 µL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL), 6 µL de JC-1 (153 µM), 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL) para imediatamente serem avaliadas por microscopia de epifluorescência (Nikon, model Eclipse 80i) filtro triplo (D / F / R, C58420), nas seguintes configurações: UV-2E / C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E / C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E / C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm) no aumento de 1000 ×. Proceder-se-á com a contagem de 200 células por amostra, verificando e classificando conforme a fluorescência emitida por cada análise (DE ANDRADE et al., 2007).

3. Parâmetros de estresse oxidativo: Serão aplicadas análises a fim de averiguar consequências das exposições das células sobre o status oxidativo a partir dos seguintes testes:

3.1 Espécies Reativas

Os níveis de espécies reativas serão determinados usando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-D). As amostras (10 µL) serão incubadas no escuro com 5 µL de DCF-C (1mM) em meio tampão Tris HCl 10 mM, pH 7,4. Será monitorada a oxidação da DCF-D para diclorofluoresceína (DCF) fluorescente pelas espécies reativas. A emissão da intensidade de fluorescência será realizada em 520 nm (com excitação de 488 nm) 60 minutos após a adição da DCF-DA com o auxílio de espectrofluorímetro (LOETCHUTINAT et al., 2005). Os resultados serão expressos em UF (unidades de fluorescência).

3.2 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica será determinada pela formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrio (TBARS) (OHKAWA et al., 1979), na qual o malondialdeído (MDA), reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo colorido, determinado espectrofotometricamente a 532nm. Na reação será utilizado 100 µL de amostra em meio contendo 200 µL de TBA 0,8 %, 200 µL de tampão HCL-Ácido acético (pH= 1,2) e 25 µL e SDS 0,8 %, incubados a 95 °C por 90 minutos.

3.3 FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

O potencial antioxidante será avaliado a partir da técnica de FRAP de acordo com Benzie & Strains (1996). Neste ensaio, os antioxidantes presentes na amostra são avaliados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pela 2,4,6-Tri(2-piridil)-s- triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ com absorção máxima em 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996). Será utilizado o ácido ascórbico para realização de uma curva-padrão e os resultados serão expressos em µg de equivalentes de ácido ascórbico.

4. Avaliação do Dano no DNA: O dano ao DNA espermático será avaliado a partir do ensaio de dispersão da cromatina denominado kit Halosperm G2® (Halotech DNA SL, Madri/Espanha), conforme as instruções do fabricante. O teste consiste em verificar a presença de halos nos espermatozóides identificando DNA não danificado, enquanto ocorrência de halos pequenos ou sua ausência refletem degeneração das células e DNA fragmentado.

5. Capacidade Fecundante: a avaliação da capacidade fecundante dos espermatozoides será avaliada, considerando as seguintes etapas: obtenção e maturação de oócitos bovinos, fertilização in vitro (FIV) e avaliação da taxa de fertilização.

5.1 Recuperação de oócitos e maturação: Ovários bovinos serão obtidos de abatedouro e transportados ao laboratório em salina fisiológica (0,9%) com antibióticos (100IU/mL de penicilina e 100mg/mL estreptomicina) a 30°C. Os complexos cúmulus-oócito (CCOs) serão aspirados de folículos de 3 a 5 mm de diâmetro, usando uma bomba de vácuo (20mL de água/min). Os CCOs serão recuperados e somente aqueles oócitos com ooplasma homogêneo e com as camadas do cúmulus intactas serão selecionados para maturação. Grupos de CCOs serão transferidos para placas de 3 poços contendo 400 µL de meio TCM-199 com 20% de soro de vacas em estro (Biotech, Uruguiana, RS, Brazil) para a maturação in vitro. Este meio será suplementado com 5µg/mL de FSH de porco, NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 5µg/mL de LH de porco, LH-P (Lutropin-V®, Bioniche Animal Health), e 22 µg/mL de piruvato e gentamicina. Os CCOs serão cultivados por 24 h a 39°C em atmosfera com 5% CO2 e umidade saturada.

5.2 Fertilização *In vitro* (FIV): amostras de sêmen dos diferentes grupos de tratamento serão destinadas para avaliação da capacidade de fertilização de oócitos não tratados. Gotas contendo 150 µL de meio Talp-Fert modificado (Parrish, Krogenaes e Susko-Parrish, 1995), 22 µg/mL de piruvato, 6 mg/mL albumina de soro bovino, 10 µg/mL de heparina, 20 µM/mL de penicilamina, 10 µM/mL de hipotaurina, e 2 µM/mL de epinefrina serão preparadas em placas de 30×10 mm (Corning Incorporated Life Sciences), sob óleo mineral, para a fertilização dos CCOs com 1x106 esperm/mL. O sêmen e oócitos serão co-cultivados a 39°C com umidade saturada e atmosfera de 5% CO2 em ar.

5.3 Taxa de fertilização: A taxa de fertilização será avaliada após 18 h de co-incubação dos oócitos com os espermatozoides. Para a avaliação, zigotos potenciais serão selecionados e marcados com 15 µg/mL de bisbenzimida (Hoechst 33342; Life Technologies, Japan) em salina tamponada. Imagens dos zigotos potenciais serão examinadas em microscópio de epifluorescência em magnificação de 400x com excitação em 365 nm e emissão em 410 nm. As avaliações serão realizadas conforme descrito por Giotto et al., (2015), sendo considerado como taxa de fertilização normal quando os oócitos apresentarem somente dois pró-núcleos ou um núcleo fusionado.

6. Análise estatística

Os dados resultantes serão expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística será realizada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey quando for apropriado. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

Resultados Esperados

A partir dos protocolos a serem adotados durante este experimento espera-se obter resultados que permitam elucidar quanto aos efeitos provocados pela exposição indireta a compostos de finalidade herbicida, tendo em vista o crescente uso dos mesmos na atualidade, mesmo que dentro de limites considerados legais pelos órgãos reguladores. De particular importância, este estudo trará informações relevantes a respeito do efeito da exposição a misturas de pesticidas, em um contexto muito próximo da realidade vivenciada. Além disso, os resultados obtidos com este estudo fornecerão subsídios sobre o possível papel destes compostos no comprometimento da fertilidade em mamíferos.

Ainda, espera-se que o desafio de atingir estes objetivos contribua para o desenvolvimento de habilidades técnicas de professores, corpo técnico e alunos de graduação e pós graduação dentro da área da Bioquímica Toxicológica, fornecendo subsídios para novos estudos e linhas de pesquisa. Este núcleo de pesquisa tem se esforçado no sentido de desenvolver pesquisa científica de qualidade, de forma ética e sustentável, promovendo atividades que potencializem o desenvolvimento local e regional, vislumbrando sempre a projeção nacional e internacional.

Por fim, a geração de artigos e publicações a partir dos resultados gerados neste trabalho é um dos principais objetivos visando a contribuição para comunidade científica, assim como participação em eventos relacionados a temática, com o intuito de disseminação do conhecimento, colaborando com o desenvolvimento científico e maior visibilidade da Unipampa no cenário nacional e internacional.

Relação Ensino, Pesquisa, Extensão

O presente projeto de pesquisa constitui um conjunto de atividades de caráter educativo, técnico, científico e social desenvolvido por docentes e discentes (graduação e pós-graduação). As atividades propostas no presente projeto visam estimular a aproximação entre o ensino, a pesquisa e a extensão na área de reprodução animal, envolvendo, desta forma, atividades de pesquisa diária dos alunos de graduação, através da iniciação científica. Desta forma, o presente projeto visa revigorar as práticas de ensino através da interação entre a teoria e a prática, com a inserção da formação do aluno através do método científico, contribuindo, desta forma, tanto para a formação do futuro profissional egresso desta Instituição, favorecendo a reflexão e a construção do conhecimento, como também para a renovação e aperfeiçoamento do trabalho dos docentes e técnicos participantes da equipe executora deste projeto.

Ainda, essa inserção dos alunos de graduação nas práticas de pesquisa e atividades de aprendizagem da linguagem técnico-científica, a aproximação destes com alunos de Mestrado e Doutorado, e a troca de experiências teóricas e práticas, possibilita ao aluno de graduação (iniciação científica) vislumbrar uma possível trajetória acadêmica direcionada a pós-graduação. A inserção na pesquisa possibilita ao aluno uma visão mais ampla sobre pesquisa, através do método científico, de formas de resolver problemas comuns da sociedade. Neste caso, em especial, a possibilidade de acompanhar a pesquisa do possível envolvimento de compostos pesticidas no comprometimento da qualidade e função dos espermatozoides bovinos.

Espera-se que os resultados obtidos com a execução deste projeto possam fornecer subsídios para a elaboração de futuras propostas de extensão direcionadas a reais necessidades da população, neste caso, em especial, com foco no produtor rural, contribuindo com o compartilhamento de saberes entre a comunidade acadêmica e a sociedade e, assim, alcançar uma maior integração entre as atividades de ensino, pesquisa e extensão, o que é imprescindível para esta universidade, que busca a formação integral e adequada do estudante através de uma articulação entre os três pilares: ensino, pesquisa e extensão.

Considerando o que foi exposto, a participação de alunos de graduação em atividades de pesquisa como as que estão contempladas neste projeto possibilitará a este aluno, bolsista de iniciação científica, a implementação do que é preconizado na política institucional da UNIPAMPA no que diz respeito a ampliação e ao fortalecimento da produtividade científica, através da promoção de atividades

que potencializem o desenvolvimento local e regional de forma ética e sustentável.

Aderência às áreas de Tecnologias Prioritárias do MCTI

O presente projeto pretende avaliar o possível papel de pesticidas isolados ou em misturas, sobre a qualidade espermática de bovinos. Sendo assim, considerando que os resultados obtidos com o desenvolvimento deste projeto poderiam levar ao entendimento do papel que estes pesticidas poderiam desempenhar na redução da fertilidade no rebanho bovino, o presente projeto apoia-se no campo científico-tecnológico transversal de "Produção" (Artigo 2, inciso III) com ênfase no setor do Agronegócio, a qual conforme a Portaria MCTIC nº 5.109, de 16 de agosto de 2021, é uma das tecnologias habilitadoras consideradas prioritárias para o período de 2021 a 2023, uma vez que busca o fortalecimento do agronegócio relacionado a melhorias na produção de bovinos.

Geração de Resíduos

Este trabalho prevê a geração de resíduos biológicos (sêmen de bovinos) e químicos (pesticidas e reagentes utilizados nas avaliações previstas). Estes resíduos serão acondicionados em freezer no Laboratório de Estresse Oxidativo (NUPEVI), no Campus Uruguiana da Unipampa, até o descarte adequado por empresa terceirizada contratada pela Unipampa para este fim. Não é possível estimar de forma precisa a quantidade de resíduos gerados, no entanto, envolvem palhetas e eppendorfs contendo sêmen em pequenas quantidades e em número correspondente aos tratamentos e repetições a serem realizadas.

Referências

ANIFANDIS, G.; KATSANAKI, K.; LAGODONTI, G.; MESSINI, C.; SIMOPOULOU, M.; DAFOPOULOS, K.; DAPONTE, A. The Effect of Glyphosate on Human Sperm Motility and Sperm DNA Fragmentation. *Int J Environ Res Public Health*, v. 15, n. 6, p., 2018.

BENZIE, I. F. F., & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, 70-76, 1996.

BROVINI, E. M.; DE DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, G. R.; CARVALHO, L.; MENDONCA, R. F.; PEREIRA, R. O.; CARDOSO, S. J. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. *Sci Total Environ*, v. 771, n., p. 144754, 2021.

DE ANDRADE, A. F.; DE ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim*, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.

FERNANDES, C. L. F.; VOLCAO, L. M.; RAMIRES, P. F.; MOURA, R. R.; DA SILVA JUNIOR, F. M. R. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. *Environ Sci Process Impacts*, v. 22, n. 2, p. 256-270, 2020.

FUCIC, A.; DUCA, R. C.; GALEA, K. S.; MARIC, T.; GARCIA, K.; BLOOM, M. S.; ANDERSEN, H. R.; VENA, J. E. Reproductive Health Risks Associated with Occupational and Environmental Exposure to Pesticides. *Int J Environ Res Public Health*, v. 18, n. 12, p., 2021.

GIOTTO, A. B.; BRUM, D. S.; SANTOS, F. W.; GUIMARÃES, A. C. G.; GONÇALVES, C. G. M.; PAVIN, C. U. M.; FOLCHINI, N. P.; MOYSES, A. B.; MISSIO, D.; LEIVAS, F. G. Oxygen tension and oocyte density during in vitro maturation affect the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 6, p. 4277-4288, 2015.

KOMSKY-ELBAZ, A.; ROTH, Z. Effect of the herbicide atrazine and its metabolite DACT on bovine sperm quality. *Reprod Toxicol*, v. 67, n., p. 15-25, 2017.

LOETCHUTINAT, C., KOTHAN, S., DECHSUPA, S., MEESUNGNOEN, J., JAY-GERIN, J. P., & MANKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 72, p. 323-331., 2005.

MESNAGE, R.; BRANDSMA, I.; MOELIJKER, N.; ZHANG, G.; ANTONIOU, M. N. Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. *Food Chem Toxicol*, v. 157, n., p. 112601, 2021.

NEROZZI, C.; RECUERO, S.; GALEATI, G.; BUCCI, D.; SPINACI, M.; YESTE, M. Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Sci Rep*, v. 10, n. 1, p. 11026, 2020.

OHKAWA, H., OHISHI, N., & YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.

ROTH, Z.; KOMSKY-ELBAZ, A.; KALO, D. Effect of environmental contamination on female and male gametes - A lesson from bovines. *Anim Reprod*, v. 17, n. 3, p. e20200041, 2020.

SENGUPTA, P.; BANERJEE, R. Environmental toxins: alarming impacts of pesticides on male fertility. *Hum Exp Toxicol*, v. 33, n. 10, p. 1017-1039, 2014.

Possui Bolsistas

Não, mas vou pleitear em alguma chamada

Unidades e Cursos

Unidade	Curso
Campus Uruguaiana	Doutorado em Bioquímica (URDB)
Campus Uruguaiana	Medicina Veterinária (URVET)

Equipe Executora

Nome	E-mail	Tipo	Função	CH Semanal	Período Participação
Alison Henrique Ferreira	alisonferreira.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Voluntário	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Clara de Carvalho Silva	clarasilva.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Voluntário	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Daniela dos Santos Brum	danielabrum@unipampa.edu.br	Docente	Colaborador	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Diogo Ferreira Bicca	diogobicca.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Pesquisador	4	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Fabio Gallas Leivas	fabioleivas@unipampa.edu.br	Docente	Colaborador	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Francielli Weber Santos Cebin	franciellibin@unipampa.edu.br	Docente	Coordenador	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Luiza Gazeta Passos	luizapassos.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Voluntário	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Melina Bucco Soares	melinasoares@unipampa.edu.br	Técnico	Colaborador	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024
Paola Castro Romeiro	paolaromeiro.aluno@unipampa.edu.br	Discente	Discente - Voluntário	2	De 13/06/2022 a 17/12/2024

Cronograma

Data Início	Data Fim	Atividade	Carga Horária	Local	Membros
13/06/2022	17/12/2024	Revisão Bibliográfica	100	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
13/06/2022	31/08/2022	Treinamento técnicas previstas (cinética espermática, viabilidade espermática, estresse oxidativo, avaliação DNA, fertilização in vitro	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
13/06/2022	31/08/2022	Obtenção de amostras de sêmem de touros com fertilidade comprovada para criopreservação.	20	Fazenda escola Unipampa	Alison Henrique Ferreira, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas
15/06/2022	31/08/2022	Descongelamento de sêmen e separação espermática por gradiente de percol para realização do experimento 1.	100	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir
01/08/2022	25/08/2022	Avaliação estatística dos resultados de cinética espermática do experimento 1, a fim de selecionar as concentrações dos pesticidas que serão avaliadas sozinhas e em misturas sobre espermatozoides bovinos	20	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir
05/09/2022	30/09/2022	Realização do Experimento 2 - avaliação da cinética espermática após exposição aos pesticidas (isolados ou em misturas)	30	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir
03/10/2022	28/10/2022	Realização do Experimento 2 - Avaliação de viabilidade espermática	30	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
01/11/2022	30/11/2022	Confecção de resumo para apresentação de resultados parciais em evento da Unipampa	10	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
07/11/2022	30/11/2022	Realização Experimento 2 - Avaliação estresse oxidativo	50	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Diogo Ferreira Bicca, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
08/11/2022	16/05/2023	Avaliação estatística dos dados do Experimento 2	50	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir
05/12/2022	31/01/2023	Realização experimento 2 - Avaliação de dano de DNA	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir
13/02/2023	30/04/2023	Realização Experimento 2 - fertilização in vitro	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
01/05/2023	31/08/2023	Repetição dos ensaios experimentais previstos no Experimento 2	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
04/09/2023	29/09/2023	Análise estatística das repetições	20	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Diogo Ferreira Bicca, Francielli Weber Santos Cibir
01/11/2023	30/11/2023	Confecção de resumo para apresentação de resultados em evento científico da Unipampa	10	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
05/02/2024	05/03/2024	Repetição doe ensaios experimentais relacionados ao Experimento 2 (cinética espermática)	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
11/03/2024	12/04/2024	Repetição dos ensaios experimentais relacionados ao Experimento 2 - avaliação de viabilidade espermática	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Diogo Ferreira Bicca, Luiza Gazeta Passos, Paola Castro Romeiro
06/05/2024	31/05/2024	Repetição dos ensaios experimentais relacionados ao Experimento 2 - avaliação de estresse oxidativo	50	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Diogo Ferreira Bicca, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
03/06/2024	28/06/2024	Repetição dos ensaios experimentais relacionados ao Experimento 2 - avaliação de dano de DNA	30	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Diogo Ferreira Bicca, Luiza Gazeta Passos, Paola Castro Romeiro
01/07/2024	29/08/2024	Repetição dos ensaios experimentais relativos ao Experimento 2 - fertilização in vitro	50	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução - Biotech (Nupevi)	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Diogo Ferreira Bicca, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro
02/09/2024	17/12/2024	Redação artigo científico, revisão do inglês e submissão para periódico científico internacional indexado no Qualis da área.	50	Laboratório de Estresse Oxidativo - Nupevi	Alison Henrique Ferreira, Clara de Carvalho Silva, Daniela dos Santos Brum, Diogo Ferreira Bicca, Fabio Gallas Leivas, Francielli Weber Santos Cibir, Luiza Gazeta Passos, Melina Bucco Soares, Paola Castro Romeiro

Pareceres Solicitados

Parecer

Não necessita parecer

Planejamento de Despesas

Despesas de Custeio	Opção	Valor Estimado (R\$)	Fonte de Financiamento	Especificações
Auxílio a Estudantes (Bolsas)	Necessita	9.600,00	Edital Interno e Externo	Editais PIBIC-CNPq, PROBIC-FAPERGS e PDA-UNIPAMPA
Diárias	Não Necessita	0,00		
Passagens	Não Necessita	0,00		
Material de Consumo	Necessita	10.000,00	Edital Interno e Externo	Necessidade de kit para avaliação de DNA espermático - Halosperm. Participação em editais internos (AGP) ou externos (CNPq e FAPERGS) para pleitear fomento para aquisição
Serviços de Terceiros (Pessoa Física)	Não Necessita	0,00		
Serviços de Terceiros (Pessoa Jurídica)	Não Necessita	0,00		
Outros	Não Necessita	0,00		
Total		19.600,00		

Despesas de Capital	Opção	Valor Estimado (R\$)	Fonte de Financiamento	Especificações
Equipamentos e Material Permanente	Já Possui	200.000,00	Edital Externo	Espectrofluorímetro, Leitor de microplacas, microscópio de fluorescência, CASA. Todos estes equipamentos já foram adquiridos por meio de editais externos

Total Geral de Despesas (R\$): **219.600,00**

Alternativas caso a fonte de financiamento não se confirme: Caso não sejamos contemplados com fomento para a aquisição dos kits Halosperm, o dano de DNA será avaliado por kit menos específico já existente no Laboratório de Estresse Oxidativo. Todos os equipamentos necessários para a execução deste projeto já existem na instituição.

Documento gerado por: Francieli Weber Santos Cebin **Data/Hora:** 03/09/2022 às 18:11:04