

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS – PGCV

EDUARDO VARGAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SELÊNIO ASSOCIADO A
VITAMINA E EM BOVINOS LEITEIROS COM HEMATÚRIA
ENZOÓTICA**

ALEGRE

2021

EDUARDO VARGAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SELÊNIO ASSOCIADO A
VITAMINA E EM BOVINOS LEITEIROS COM HEMATÚRIA
ENZOÓTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Bociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

Orientador: Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes

ALEGRE

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48a Oliveira, Eduardo Vargas de, 1984-
Avaliação da suplementação com selênio associado a vitamina e em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica / Eduardo Vargas de Oliveira. - 2021.
60 f. : il.

Orientadora: Louisiane De Carvalho Nunes.
Coorientador: Rafael Otaviano do Rego.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Hematúria. I. Nunes, Louisiane De Carvalho. II. Rego, Rafael Otaviano do. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619


EDUARDO VARGAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SELÊNIO
ASSOCIADO A VITAMINA E EM BOVINOS LEITEIROS COM
HEMATÚRIA ENZOÓTICA**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

Aprovado em 31 de agosto de 2021.


COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 LOUISIANE DE CARVALHO NUNES
Data: 06/06/2023 15:20:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof (a). Dr (a). Louisiane De Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador (a)

Documento assinado digitalmente
 MARIA APARECIDA DA SILVA
Data: 08/06/2023 15:11:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof (a). Dr (a). Maria Aparecida da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Documento assinado digitalmente
 HEBERTH DE PAULA
Data: 13/06/2023 13:32:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Heberth de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem proporcionado na minha na minha vida.

À minha orientadora Louisiane de Carvalho Nunes, pelo empenho, por todo incentivo, dedicação e pelo conhecimento compartilhado para o crescimento intelectual e pessoal que me proporcionou.

À minha esposa Jeane Nery Miranda e aos meus filhos, Clara N. M. Vargas de Oliveira, Arthur N. M. Vargas de Oliveira e Vitor N. M. Vargas de Oliveira pela alegria em minha vida de tê-los e a ajuda e compreensão nos momentos de tensão, nos momentos difíceis e todo amor e o companheirismo dedicado a mim.

Aos meus pais Valmir Machado de Oliveira e Maria Auxiliadora Vargas de Oliveira (“Dora”) por ser o exemplo de amor e dedicação, por proporcionar momentos que fizeram que eu chegasse até aqui, e por todo amor dedicado a mim e toda a dedicação e incentivo para que minhas escolhas tivessem um proposito para o bem dos que estão a minha volta e que elas se realizassem.

Aos meus irmãos Cristina Vargas de Oliveira e Henrique Vargas Machado de Oliveira pelo carinho, apoio e incentivo em tudo na minha vida.

Aos amigos no decorrer do mestrado, por todo companheirismo e pelos dias de estudos, incentivo e ajuda dedicada.

Aos amigos dos dias divertidos de trabalho em campo e laboratório Marcos Paulo Brinati, Caio Alves e Renata de Paula, pois sem vocês seria praticamente impossível realizar esse projeto.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos ensinamentos compartilhados.

Ao meu co-orientador e amigo Rafael Otaviano do Rêgo pelos ensinamentos e por toda dedicação e ajuda que me proporcionou.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro ao projeto (Edital Universal 21/2018, TO137/2019).

RESUMO

OLIVEIRA, E. V. **Avaliação da suplementação com selênio associado a vitamina E em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alegre, ES, 2021. **RESUMO:** A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma enfermidade relacionada à intoxicação pelo consumo crônico de *Pteridium* sp. (samambaia). Essa doença é comum na região sul do Espírito Santo e não possui tratamento. Assim, o uso de suplementação com minerais e vitaminas poderia ser uma alternativa viável. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a suplementação com selênio e vitamina E em bovinos cronicamente intoxicados por *Pteridium* sp. e com HEB na região Sul do Espírito Santo, bem como, avaliar os níveis de antioxidantes totais, atividade da glutathione peroxidase e biomarcadores teciduais de progressão tumoral nestes animais. Para isto foram selecionados 18 bovinos nos municípios de Divino de São Lourenço e Ibitirama com quadro de HEB. Os animais foram avaliados clinicamente e confirmada a hematúria pela avaliação da urina. O delineamento experimental foi realizado em quatro grupos distribuídos ao acaso em grupo 1 (controle), grupo 2 (dosagem de 0,05 mg/Kg de selênio), grupo 3 (0,10 mg/kg de selênio) e grupo 4 (0,20 mg/kg de selênio). Todos os grupos também foram suplementados com dose de 0,5 mL de vitamina E. A suplementação foi feita por via intramuscular durante 13 semanas. A cada quinze dias os animais foram avaliados quanto à hematúria, ganho de peso, hematócrito, proteína sérica total, fibrinogênio, níveis séricos de glutathione peroxidase e antioxidantes totais. Também foi realizado lavado vesical dos momentos M0, M6 e M14, seguido da imunocitoquímica com os marcadores caspase3 e p53. Verificou-se que não ocorreu diferença significativa da variável peso entre os grupos, mas teve redução do peso em relação ao tempo, no grupo 1 (controle). Para a variável intensidade da hematúria houve diferença significativa no grupo 2 em relação ao grupo 1 (controle) após três semanas de suplementação, porém não houve diferença significativa ao longo do tempo. Houve aumento do hematócrito no grupo 2 em relação ao grupo 1 (controle) após sete semanas de suplementação, no entanto, não houve diferença em relação ao tempo. Para PPT e Fb não foram observadas diferenças significativas nem entre os tratamentos e nem em relação ao tempo. Os níveis de antioxidantes totais revelaram diferença significativa entre o grupo 1 (controle) e o grupo 2 e também teve efeito quanto ao tempo no grupo 1 (controle) e grupo 2. A atividade da glutathione peroxidase não revelou diferença entre os tratamentos, entretanto, houve diferença ao longo do tempo no grupo 4. Em relação à avaliação citológica dos lavados vesicais, apenas cinco animais revelaram lesões, sendo cinco neoplásicas e uma não neoplásica. Os biomarcadores revelaram marcação de fraca a moderada intensidade, no entanto, não foi possível estabelecer relação entre a expressão dos mesmos com a progressão tumoral ou os tratamentos. Conclui-se que a suplementação com selênio associado a vitamina E em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica causa melhora do quadro clínico de hematúria, aumenta os níveis de antioxidantes totais, porém não interfere na atividade da glutathione peroxidase. No entanto, não se estabeleceu relação entre a expressão dos biomarcadores e a progressão tumoral com a suplementação com selênio e vitamina E.

Palavras-chave: bovino; intoxicação; samambaia; selenito de sódio.

ABSTRACT

OLIVEIRA, E. V. **Evaluation of selenium supplementation associated with vitamin E in dairy cattle with enzootic hematuria.** 2021. Dissertation (Master in Veterinary Science) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alegre, ES, Brazil, 2021. **ABSTRACT:** Enzootic bovine hematuria (EBH) is a disease related to intoxication by chronic consumption of *Pteridium* sp. (bracken fern). This disease is common in the southern region of Espírito Santo, Brazil and has no treatment. Thus, the use of supplementation with minerals and vitamins could be a viable alternative. The aim of this work was to evaluate the supplementation with selenium and vitamin E in cattle chronically intoxicated by *Pteridium* sp. and with EBH in the southern region of Espírito Santo, as well as to evaluate the levels of total antioxidants, the glutathione peroxidase activity, and tissue biomarkers of tumor progression in these animals. For this, 18 cattle in the municipalities of Divino de São Lourenço and Ibitirama with EBH were selected. The animals were clinically evaluated and hematuria was confirmed by urine evaluation. The experimental design was carried out in four groups randomly distributed in group 1 (control), group 2 (dose of 0.05 mg/Kg of selenium), group 3 (0.10 mg/Kg of selenium) and group 4 (0.20 mg/Kg of selenium). All groups were also supplemented with a dose of 0.5 mL of vitamin E. Supplementation was given intramuscularly for 13 weeks. Every fifteen days the animals were evaluated for hematuria, weight gain, hematocrit, total serum protein, fibrinogen, serum levels of total antioxidants and glutathione peroxidase. Bladder lavage was also performed at moments M0, M6 and M14, followed by immunocytochemistry with caspase3 and p53 markers. It was found that there was no significant difference in the weight variable between the groups, but there was a reduction in weight over time in group 1 (control). For the variable hematuria intensity, there was a significant difference in group 2 compared to group 1 (control) after three weeks of supplementation, but there was no significant difference over time. There was an increase in hematocrit in group 2 compared to group 1 (control) after seven weeks of supplementation, however, there was no difference in relation to time. For PPT and Fb, no significant differences were observed either between treatments or in relation to time. Total antioxidant levels showed a significant difference between group 1 (control) and group 2 and also had an effect over time in group 1 (control) and group 2. Glutathione peroxidase activity did not show difference between treatments, however, there was a difference over time in group 4. Regarding the cytological evaluation of the vesical washings, only five animals revealed lesions, five of which were neoplastic and one non-neoplastic. The biomarkers revealed marking of discrete to moderate intensity, however, it was not possible to establish a relationship between their expression with tumor progression or treatments. It is concluded that supplementation with selenium associated with vitamin E in dairy cattle with enzootic hematuria improves the clinical condition of hematuria, increases the levels of total antioxidants, but does not interfere with the activity of glutathione peroxidase. However, no relationship was established between the expression of biomarkers and tumor progression with selenium and vitamin E supplementation.

Keywords: bovine; intoxication; bracken fern; sodium selenite.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mapa representativo da área amostral da microrregião do Caparaó, Espírito Santo, com a demarcação das propriedades rurais utilizadas no estudo da avaliação da suplementação com selênio e vitamina E em bovinos com hematúria enzoótica, entre agosto de 2019 a janeiro de 2020. Fonte: adaptado de Ministério do Desenvolvimento Agrário (2015)..... 24
- Figura 2** Variações na intensidade da hematúria dos bovinos com HEB utilizados na avaliação da suplementação com Se e vitamina E, microrregião do Caparaó, entre agosto de 2019 e janeiro de 2020, revelando em (A) Animal V10, grupo 2, revelando hematúria grau 4 (momento 0); B) Animal V10, grupo 2, revelando hematúria grau 1 (momento 6); C) Animal V14, grupo controle, revelando hematúria grau 3 (momento 7) e D) Animal V15, grupo 2, hematúria grau 1 (momento 7)..... 33
- Figura 3** Fotomicrografia de citologia de lavado vesical de bovino com HEB revelando em (A) Imunomarcção positiva fraca de p53 (nuclear), amostra V15, Fazenda C, momento 0; B) Imunomarcção positiva, moderada de caspase-3 (citoplasmática), amostra V19, fazenda E, momento 0. Objetiva de 10x..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação dos animais por propriedade de origem, idade e cidade para avaliação eficácia terapêutica do selênio associado a vitamina E em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica nos municípios de Ibitirama e Divino de São Lourenço (DSL), ES, entre agosto de 2019 e janeiro de 2020.....	25
Tabela 2	Grupos experimentais para avaliação da eficácia terapêutica do Selênio associado a Vitamina E em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica nos municípios de Ibitirama e Divino de São Lourenço, microrregião do Caparaó-ES, de agosto de 2019 a janeiro de 2020.....	26
Tabela 3	Pesos dos animais em quilogramas distribuídos em grupos experimentais em diferentes momentos submetidos à suplementação com Se associado à vitamina E em bovinos com HEB.....	30
Tabela 4	Avaliação semi-quantitativa do grau de hematúria pela avaliação clínica da micção espontânea, classificado em escore variando de 1 a 4 (1= ausente, 2= discreta, 3= moderada e 4= intensa), em bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.....	32
Tabela 5	Avaliação do hematócrito de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.....	35
Tabela 6	Avaliação da proteína plasmática total de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.....	36
Tabela 7	Avaliação do fibrinogênio plasmática de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.....	37
Tabela 8	Níveis de antioxidantes totais de bovinos com HEB suplementados com associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.....	39

Tabela 9	Atividade da enzima glutathiona peroxidase no sangue total de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.....	41
-----------------	---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. <i>Pteridium</i> sp.....	12
2.2. Hematúria enzoótica bovina (HEB).....	15
2.3. Selênio.....	17
2.4. Vitamina E.....	19
2.5. Glutaciona peroxidase	20
2.6. Antioxidantes totais.....	21
2.7. Lavado vesical e biomarcadores teciduais.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Comissão de ética	23
3.2. Local de estudo.....	23
3.3. Seleção dos animais.....	25
3.4. Protocolo experimental	26
3.5. Avaliações clínicas e coleta das amostras.....	27
3.6. Processamento das amostras.....	28
3.7. Análise estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Peso.....	30
4.2. Intensidade da hematúria.....	31
4.3. Hematócrito, proteína sérica total e fibrinogênio.....	34
4.3.1 Hematócrito.....	35
4.3.2 Proteína Plasmática Total.....	35
4.3.3 Fibrinogênio	36
4.4. Antioxidantes totais.....	37
4.5. Glutaciona peroxidase	40
4.6. Lavado vesical e biomarcadores.....	42
5 CONCLUSÕES	44

1. INTRODUÇÃO

As samambaias, plantas pertencentes ao gênero *Pteridium*, por ter alta resistência natural a diversas condições ambientais, são altamente invasoras, associadas ao manejo geralmente inadequado utilizado por proprietários (THOMSON *et al.*, 2008; DER *et al.*, 2009). É uma das plantas tóxicas de maior preocupação em vários países do mundo por causar enfermidades em rebanhos de bovinos (NIERO *et al.*, 1991; TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000; MARÇAL *et al.*, 2001).

A planta *Pteridium* sp. possui diferentes princípios tóxicos com ação carcinogênica, entre os quais: tanino; quercetina; ácido chiquímico; prumasina; ptaquilosídeo; aquilídeo A e canferol (HOPKINS, 1986). A principal substância tóxica identificada é o ptaquilosídeo (PTA), glicosídeo norsesquiterpeno com capacidades mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas (YAMADA *et al.*, 2007).

A intoxicação por *Pteridium* sp. se manifesta de três formas diferentes em bovinos. Sendo uma de quadro agudo, conhecida como diátese hemorrágica ou síndrome hemorrágica (MARÇAL *et al.* 2002, ANJOS *et al.* 2008, 2009), e dois quadro crônicos caracterizados por neoplasias do trato digestivo superior (TAS) e por lesões na vesícula urinária chamada de hematúria enzoótica bovina (HEB) (DÖBEREINER *et al.* 1967, TOKARNIA *et al.* 1969, SOUTO *et al.* 2006)

Peixoto *et al.* (2003) descreveu que a hematúria enzoótica bovina é ocasionada por lesões neoplásicas e não neoplásicas, observando em lesões não neoplásicas as lesões inflamatórias, hiperplásicas e metaplásicas. As lesões neoplásicas causam alterações vesicais ocasionando carcinoma de células escamosas, hemangiossarcomas, carcinoma *in situ*, carcinoma de células de transição, papiloma e/ou alterações neoplásicas relacionadas ao epitélio de transição (PEIXOTO *et al.* 2003, GABRIEL *et al.* 2009).

As principais características clínicas da hematúria enzoótica são a evolução crônica e a incontinência urinária. Pode ocorrer a anemia aplástica, pela perda de sangue sem reposição pela medula podendo causar abortos em vacas prenhes (MARÇAL *et al.*, 2001), hematúria contínua ou intermitente, emaciação e podendo levar a morte (FRANÇA *et al.*, 2002).

Segundo Polack (1990), por não existir tratamento terapêutico para HEB que expresse melhora clínica consistente nos animais, o empenho tem sido voltado para o controle e erradicação da planta nas áreas de pastejo dos animais. Tanto os quadros

agudos quanto os crônicos da doença causam grandes prejuízos econômicos para os produtores (MARÇAL, 2003).

Para Paschoal (2003) a suplementação com minerais e vitaminas pode ser uma alternativa para melhorar a saúde dos animais e a administração de selênio e vitamina E possui efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa (NICHOLSON *et al.*, 1991), essa suplementação pode melhorar o *status* antioxidante melhorando a função imune do organismo (GOFF, 2006). Uma vez que o selênio é fundamental na formação da glutathiona peroxidase, que atua no controle de radicais livres que podem causar danos no DNA celular potencializando formação de neoplasias (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

De acordo com Campo (1994 e 1997) e Anderson (1997) o ptaquilosídeo presente na samambaia seria o responsável por promover um estado imunossupressivo linfopênico crônico e persistente nos animais que ingerem a samambaia.

Os biomarcadores teciduais também podem ser ferramentas de diagnóstico úteis auxiliando nos processos de avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognósticos (COOMBES *et al.*, 1982).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com selênio associado a vitamina E em animais naturalmente intoxicados por *Pteridium* sp. e com quadro de hematuria enzoótica bovina (HEB). Bem como, avaliar os níveis de glutathiona peroxidase, antioxidantes totais e biomarcadores teciduais de progressão tumoral nestes animais na região Sul do Espírito Santo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Pteridium* sp.

O gênero *Pteridium* possui várias classificações botânicas, e essas diferenças acontecem por três motivos, primeiro devido a plasticidade fenotípica, segundo pela presença de intermediários morfológicos entre esses táxons e em terceiro a escassez de diagnóstico confiável para distinção dos táxons (THOMSON, 2000).

Outrora, o gênero *Pteridium* havia sido classificado como pertencente à família Polypodiaceae e foi considerado com apenas uma espécie, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn mas com 12 variedades (TRYON; TRYON, 1982). No entanto, após a realização de estudos biomoleculares, o gênero *Pteridium* passou a pertencer à família Dennstaedtiaceae, e outras espécies foram reconhecidas (THOMSON, 2000). Segundo a classificação proposta por DER et al. (2009), as espécies existentes na América do Sul são *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Figura 1) e *Pteridium caudatum* (L.) Maxon (YANEZ et al., 2016).

As espécies classificadas segundo a proposta por DER et al. (2009) na América do Sul são *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon e *Pteridium caudatum* (L.) Maxon (YANEZ et al., 2016).

A planta da família Polypodiaceae conhecida popularmente como samambaia ou samambaia-do-campo, *Pteridium aquilinum* é uma pteridófita rasteira encontrada em todo o Brasil (BRANDAO et al., 2017). A espécie apresenta rizoma profundo e ramificado, tendo folhas de 1,5 a 3 m de comprimento (SCHWARTSBURD et al., 2014).

A espécie *Pteridium aquilinum* foi considerada como única por muito tempo, porém estudos mostraram variações, devido à dificuldade de classificar, como espécie, subespécie, variedade e forma (SCHWARTSBURD; MORAES; LOPES-MATOS, 2014).

Uma subespécie da América do Sul que não havia sido nomeada foi identificada por Schwartsburd (2017) como *P. esculentum* subsp. *gryphus* Schwartsb. Para Schwartsburd et al. (2018), *P. esculentum* é equivalente a espécies *P. arachnoideum*, *P. aquilinum* var. *arachnoideum* por Tryon (1941), ou *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* de Thomson (2012). Desse modo, Schwartsburd et al. (2018) classificou a samambaia em 6 subespécies, de acordo com a morfologia em, *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*, *P. esculentum* subsp. *campestre*, e *P. esculentum* subsp. *gryphus*, que são bem distribuídas, e *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* var. *paedomorphicum*, *P. esculentum* subsp. *gryphus* var. *harpianum* e um híbrido das subs. *campestre* e *arachnoideum*, sendo os três últimos mais raros.

Pteridium pertence a um grupo de plantas que está difundido em todos os continentes com exceção da Antártica (TAYLOR, 1989) e, nas Américas, não está presente no Chile (HOJO-SOUZA et al., 2010).

As samambaias possuem facilidade de propagação muito alta por dispersar os esporos no ambiente e, assim, se tornar muito invasivas. Em épocas secas existe facilidade de ir a distâncias de centenas de quilômetros infestando várias áreas (CRUZ; BRACARENSE, 2004).

A predileção dessa planta é por áreas onde o solo é de baixa fertilidade e ácido, sendo facilmente encontradas em lavouras recentes e em áreas de desmatamento usadas para a pecuária (HOJO-SOUZA *et al.*, 2010).

A samambaia possui componentes tóxicos em toda sua estrutura, porém os brotos são as partes que possuem maior concentração desses compostos (MARÇAL *et al.*, 2001), e sua capacidade de intoxicação não se perde mesmo após dessecada (TOKARNIA *et al.*, 2012).

São conhecidos dois princípios tóxicos na samambaia, a tiaminase tipo I e o ptaquilosídeo que possui ação radiomimética. A tiaminase tipo I inativa a tiamina promovendo quadro clínico neurológico, neuromuscular e arritmias cardíacas acometendo principalmente equinos. Enquanto o glicosídeo norsesquiterpeno ptaquilosídeo (PTA) é responsável por efeito anti-hematopoético e carcinogênico em ruminantes (HIRONO *et al.*, 1984, TOKARNIA *et al.*, 2012).

O princípio tóxico considerado de maior relevância é o ptaquilosídeo (PTA) (TOKARNIA *et al.*, 2012). Pode-se encontrar nos brotos concentração de aproximadamente 40,000 µg/g. Normalmente as concentrações de PTA estão entre 500 e 5.000 µg/g, pois mesmo sabendo que as concentrações podem ser variáveis, geralmente são mais altas nas plantas recém-emergidas (ARANHA *et al.*, 2019).

Pteridium sp. tem o efeito carcinogênico variado em função da espécie animal que é intoxicada por ela, observando que bovinos desenvolvem neoplasias no trato digestório superior e na bexiga (TOKARNIA *et al.* 2012), enquanto ovelhas intoxicadas cronicamente podem apresentar tumores intestinais (EVANS, 1968).

Os bovinos em épocas de escassez alimentar acabam se alimentando de samambaias mesmo não sendo palatável, isso devido à fome, e por essa planta ter resistência a épocas de seca favorecendo o consumo pelos animais (MARÇAL, 1990). Tokarnia *et al.* (2012) relatam que os bovinos que consomem a samambaia acabam “viciados”, devido a ingestões repetidas e compulsivas, caracterizando-se assim o vício como segundo fator para intoxicar.

Bovinos intoxicados por samambaia podem desenvolver a Diátese Hemorrágica (DH), Hematúria Enzoótica Bovina (HEB) e Carcinoma das Vias

Digestivas Superiores (TAS). Porém a forma clínica desenvolvida vai depender de acordo com a quantidade de planta ingerida e com o tempo de ingestão, e com isso, a intoxicação por *Pteridium* sp. causa grande impacto na bovinocultura (TOKARNIA *et al.* 2012).

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma das formas de apresentação clínica da intoxicação crônica por *Pteridium arachnoideum*, causada pelo consumo prolongado de pequenas quantidades da planta (TOKARNIA *et al.*, 1969). O princípio ativo tóxico induz a formação de neoplasmas na vesícula urinária, que podem ser tanto epiteliais, quanto mesenquimais, mas comumente mistos (MEUTEN, 2016). Clinicamente a doença se caracteriza por hematúria contínua ou intermitente, anemia, prostração e emagrecimento, podendo levar alguns animais ao óbito (FRANÇA *et al.*, 2002).

Para causar a HEB, os bovinos devem ingerir quantidades menores que 10g/kg/dia de *Pteridium* sp. durante um ou mais anos. Para ocorrer o carcinoma das vias digestivas superior, o consumo seria de quantidades diárias ainda menores de *Pteridium* sp., mas o consumo seria por período mais longo de tempo, enquanto para acontecer a diátese hemorrágica os animais ingerem quantidades superiores a 10g/kg/dia da planta durante algumas semanas ou meses (TOKARNIA *et al.*, 2000).

2.2. Hematúria enzoótica bovina (HEB)

No sul do Espírito Santo, na microrregião do Caparaó o clima e a altitude são propícios para o desenvolvimento da samambaia facilitando o consumo pelos bovinos causando assim casos de hematúria enzoótica bovina e chegando a ter prevalência de 56,4% (SILVA *et al.*, 2009).

A HEB é uma síndrome caracterizada pelo desenvolvimento de alterações vesicais que estão principalmente associadas ao epitélio de transição, de origem neoplásica e não neoplásicas como metaplasia glandular, displasia, cistite cística, hiperplasia, proliferação vascular, dentre outras (PEIXOTO *et al.* 2003, GABRIEL *et al.* 2009) que levam à hematúria que é caracterizada pela presença de sangue na urina (RAJENDRAN *et al.*, 1983).

A hematúria intermitente ou contínua, emagrecimento, mucosas pálidas são as principais características da HEB descritas por Gava (1994) e Souto (2006). Em vacas que estão em produção percebe-se ainda a diminuição da produção leiteira (GAVA, 1994). Inicialmente os animais desenvolvem microhematúria muitas vezes antes do aparecimento de lesões macroscópicas e em seguida ocorre a macrohematúria (MAXIE; NEWMANN, 2007).

Podem ser observados como sinais clínicos também a incontinência urinária (TOKARNIA *et al.*, 2012), obstrução e debilidade do trígono vesical por neoplasmas ou da uretra por coágulos sanguíneos (SCHOTT *et al.*, 2002). Além disso pode se observar animais com a pelagem sem brilho e ocorrer infecções secundárias no trato urinário (DOBEREINER *et al.*, 1967). O animal pode perder junto com a urina de 0,01 a 1,0 litros de sangue por dia levando o animal a severa anemia e caquexia (DAWARA *et al.*, 1999).

É possível notar que animais cada vez mais jovens apresentam o quadro clínico de hematúria sem distinção de sexo ou raça e isso tem sido observado em animais com apenas 18 meses de idade (MARÇAL, 2001).

Podem ser subdivididas em três fases distintas os sintomas clínicos da HEB, pré-clínica, clínica e terminal. Na fase pré-clínica não são observadas alterações clínicas, são observados apenas alguns eritrócitos ao se avaliar o sedimento urinário, caracterizando a microhematúria. Na fase clínica observa-se a urina de coloração vermelho vivo e ao se fazer o teste de sedimentação nota-se uma quantidade considerável de eritrócitos intactos, diferentemente de outras enfermidades que causam hemoglobinúria. Em casos de hemoglobinúria não se encontra eritrócitos intactos na avaliação de sedimentação da urina, a coloração e o brilho são diferentes de casos de HEB. E os animais não apresentam icterícia nos casos de HEB. Na fase terminal os animais entram muitas vezes em estado de caquexia, hipoproteinemia e grandes coágulos de sangue na urina (ROSENBERGER, 1971, citado em DAWRA e SHARMA, 2001).

É importante para o estabelecimento do diagnóstico a obtenção de dados epidemiológicos como a verificação da existência da planta nas áreas de pastejo. Porém em casos crônicos como a hematúria podem acontecer atendimentos em propriedades onde não exista a planta na propriedade, por isso é necessário ter o histórico de origem dos animais acometidos e investigar as condições de pastejo desses animais (MARÇAL, 2003).

Nos animais que são adquiridos de áreas que a enfermidade é recorrente seria necessária a verificação destes, coletando a urina e encaminhando ao laboratório para identificar a possível microhematúria pela técnica de sedimentação antecedendo o quadro clínico. Assim seria possível, retirá-los de áreas que contribuem para o desenvolvimento da enfermidade. Outra forma de confirmação da intoxicação em animais com quadro clínico seria necropsiar um animal para servir de diagnóstico perante todos os animais (MARÇAL, 2000).

A prevenção é a única forma conhecida de controle para casos de HEB. A fim de prevenir, não se deve colocar animais em áreas que as pastagens estejam contaminadas, bem como retirar os animais que estão nessas áreas, fazer a extirpação da planta dessas áreas podendo utilizar várias técnicas como uso de herbicidas, cortes da planta no período do inverno, dentre outras formas (PESSOA *et al.*, 2019).

De acordo com Ribeiro (2020) não existe tratamento eficaz para animais acometidos pela hematúria enzoótica bovina pelo consumo de *Pteridium* sp. com isso a principal forma é ainda a prevenção.

Além do consumo de *Pteridium* sp. por período prolongado outros fatores podem estar relacionados de forma direta ou indiretamente na formação de neoplasias vesicais observados na HEB. Pode-se atribuir a falhas nos mecanismos intracelulares que previnem ou reparam lesões causadas ao DNA induzidas por xenobióticos ou por excessos de radicais livres. Entre os mecanismos reparadores pode-se destacar as selenoproteínas como a glutathione peroxidase, sendo esta uma indicadora de selênio no organismo (KEEN e GRAHAM, 1989; ZHUO e DIAMOND, 2009).

De acordo com Lanna Neta (2017) a suplementação com selênio e vitamina E em animais intoxicados cronicamente por *Pteridium* sp. demonstraram melhora no quadro clínico de HEB sugerindo que esta suplementação pode ser uma alternativa de tratamento.

2.3. Selênio

O selênio (Se) é um micromineral essencial, com papel importante na saúde de animais e humanos. De acordo com Stagsted *et al.* (2005), o selênio exerce a função

de antidepressivo e de proteção contra o câncer, funcionando como reforço no sistema imune. De acordo com Miller e Brzezinska-Slebodzinska (1993) o selênio está envolvido no sistema antioxidante do organismo por meio da glutathiona peroxidase (GSH-px). Enzima essa que converte peróxidos de hidrogênio em água, também está implicado no metabolismo do ácido araquidônico via GSH-px. Com a suplementação de selênio acontece a melhora da habilidade dos neutrófilos devido a relação com o metabolismo do ácido araquidônico reduzindo a severidade de infecções no organismo (HOGAN *et al.*, 1993).

Em vários solos contêm entre 0,1 e 2 ppm de selênio porém uma pequena porção está disponível para a vegetação, também existem solos que contem de 6 a 5 ppm de selênio porém não produzem plantas com concentrações altas de selênio por se tratarem de solos ácidos, com presença de oxido de ferro, que tornam o selênio indisponível para as plantas. Porém em solos alcalinos o selênio tende a formar o selenato que é muito disponível para as plantas podendo levar a concentrações altas nas forragens (McDOWELL, 1992).

O selênio tem efeito positivo na função do sistema imunológico animal (GERLOFF, 1992). Em estudos realizados com vacas suplementadas no pré-parto e em lactação, com o dobro da dose de selênio recomendada para esta categoria animal verificou-se a diminuição na contagem de células somáticas no leite (PASCHOAL *et al.*, 2003).

Entretanto, em ruminantes a absorção de selênio é menor que em outras espécies, pois é realizada no duodeno e o selênio pode ser reduzido a compostos insolúveis ao chegar ao rúmen (McDOWELL, 1992).

De acordo com NRC (2001) a quantidade de selênio deve ser de 0,3 mg de Se/kg de matéria seca para todas as categorias de bovino de leite. Assim, quando vacas são suplementadas com selênio a concentração desse mineral é aumentada no leite proporcionando efeito positivo na saúde dos bezerros e dos humanos que o consome também (NRC, 2005).

O uso de soluções de selênio utilizando selenito de sódio administradas através de injeções intramuscular ou subcutânea, ou suplementação oral, tem se demonstrado eficientes na prevenção de doenças relacionadas com a deficiência de selênio em ruminantes em regime de pastejo segundo o NRC (1983).

A retenção de selênio é aumentada pela vitamina E que também previne a auto-oxidação de lipídeos no interior das membranas celulares evitando a formação de

peróxidos, porém a destruição de peróxidos previamente formados só a glutathione peroxidase pode realizar.

O selênio e a vitamina E demonstraram associação no metabolismo de lipídeos. Os dois em conjunto agem no equilíbrio da glutathione reduzida (gsh) e glutathione oxidada (gssg) por fazer parte da glutathione peroxidase (GOFF, 2006).

O selênio está presente na síntese de DNA, na qual a enzima tioredoxina reductase (TrxR) depende da presença do selênio no seu sítio catalítico, notando que várias funções biológicas do selênio são concedidas a presença nas selenoproteínas (PAPP *et al.*, 2007).

Surai (2006) citou que o selênio tem atuação como antioxidante hidrossolúvel e a vitamina E como antioxidante lipossolúvel. Assim atuam na proteção celular agindo contra ataques de espécies reativas de oxigênio. Sugere também que em relação a complementaridade de suas funções que suplementando com um dos elementos pode reduzir, mas não eliminar o requerimento do outro.

As funções exercidas pelo selênio são através das selenoproteínas, em que aproximadamente a metade das selenoproteínas reconhecidas possui função antioxidante e o em maior número, entre os diferentes grupos, é o GPX (COMINETTI *et al.* 2011).

2.4. Vitamina E

A vitamina E é um dos antioxidantes lipossolúveis mais abundantes encontrados no plasma de células dos mamíferos superiores (RIGOTTI, 2007).

Essa vitamina possui efeitos antioxidantes juntamente com a glutathione, a vitamina C e os carotenóides e podem inibir os danos oxidativos formando um dos principais sistemas endógenos de defesa do organismo (RILEY, 1994). A vitamina E está presente em grandes quantidades nos lipídios e é sugerido que essa vitamina impede ou minimiza os efeitos danosos provocados por radicais livres, incluído artrites, catarata, envelhecimento e o câncer (MORRISSEY *et al.*, 1994; HEINONEN *et al.*, 1998).

A vitamina E atua como antioxidante em sistemas biológicos, nas células musculares é um componente estrutural, tem participação na biossíntese da prostaglandina e melhora a resposta imune (ZEOULA; GERON, 2006). A retenção de

selênio é promovida pela vitamina E que também previne a auto oxidação de lipídeos no interior das membranas celulares, evitando a formação de peróxidos. O selênio e a vitamina E e suas ações bioquímicas se complementam no mecanismo de defesa normal do organismo (MURRAY *et al.*, 1998).

2.5. Glutathione peroxidase

O organismo animal possui vários sistemas de defesa contra o aumento de radicais livres e um dos mais importantes é o sistema enzimático regido pela glutathione peroxidase (GPX) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A glutathione peroxidase é uma enzima selênio dependente que degrada os hidroperóxidos (MANSON e AKESSON, 2000). Quando os antioxidantes não estão sendo eficientes pode ocorrer o quadro de estresse oxidativo ocasionando o surgimento de doenças (LAUZON *et al.*, 2006).

Mills em 1957 descreveu a glutathione peroxidase se tratando de uma enzima antioxidante formada por cisteína ligada covalentemente ao selênio. É catalisada pela GPX a redução de peróxidos de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois a custas da conversão de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) (SURAI, 2006).

Os antioxidantes impedem a geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) ou sequestram essas espécies sendo capazes de prolongar a fase de iniciação, como é o caso da glutathione peroxidase, ou removendo os radicais peroxilas inibindo a fase de propagação da oxidação, porém não previnem completamente esse evento (JORDÃO *et al.*, 1998).

É demonstrado por meio de estudos os antioxidantes, por exemplo, o selênio e vitamina E, como potentes ativadores do fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (NFE2L2) (NUMAKAWA *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2009; DWORSKI *et al.*, 2011; BRIGELOUS-FLOHÉ *et al.*, 2012; NITURE *et al.*, 2014). A produção de glutathionas bem como a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e xenobióticos está relacionada ao NFE2L2, o regulador mestre da resposta antioxidante (HYBERTSON *et al.*, 2011).

A baixa atividade da glutathiona peroxidase deixa as células expostas à ação nocivas das EROs promovendo alterações na estrutura de polissacarídeos, proteínas, lipídeos, DNA e outras moléculas celulares (INSTITUTO OF MEDICINE, 2000).

2.6. Antioxidantes totais

O organismo possui um eficiente sistema de antioxidante para estabelecer o equilíbrio durante os processos metabólicos que produzem EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outras que são observadas em diversas condições fisiológicas. Assim como na fagocitose, as EROs e ERNs possuem importante função biológica, em que essas são produzidas para eliminar o agente agressor. Quando a produção desses é exacerbada o organismo utiliza esse sistema que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (SCHAFER *et al.*, 2001; FINKEL *et al.*, 2000).

Nos processos metabólicos ocorre constantemente a produção de radicais livres e o organismo desenvolveu muitos mecanismos de defesa antioxidante limitando os níveis intracelular para impedir a indução de danos (SIES, 1993, BIANCHI *et al.*, 1999).

Neste sentido as vacas leiteiras possuem vários desafios metabólicos em seu ciclo reprodutivo e produtivo podendo ocorrer balanços energéticos negativos (BEN) e déficit de vitaminas e minerais. Entre esses os com propriedades antioxidantes como o selênio e vitamina E, dentre outros. Quando acontece a redução sérica desses nutrientes ocorre aumento do estresse oxidativo ocorrendo comprometimento do sistema imunológico aumentando os riscos de contrair enfermidades (SAMÓRA, 2014).

Os antioxidantes são essenciais ao se promover uma melhor resistência imunológica, reduzindo a intensidade de infecções em animais, em que se tem utilizado na suplementação de animais sendo muito importante em pesquisas (SCALETTI *et al.*, 1999).

Uma pequena parcela de O₂ é reduzida em EROs como grupos hidroxila livres (OH⁻), superóxidos (O₂⁻) e peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL., 1995), que são os radicais livres produzidos pelo catabolismo dos nutrientes ingeridos possuindo o seu alvo celular de acordo com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU;

ANDERSON, 1997). Mesmo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não sendo considerado um radical livre ele é capaz de atravessar a barreira celular nuclear e por meio de reações enzimáticas pode induzir danos à molécula de DNA (ANDERSON, 1996). As EROS em excesso causam também oxidação dos lipídios insaturados, formação de resíduos químicos e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (HALLIWELL; GUTTERIDGE., 1989).

Quando está em excesso de radicais livres, o organismo possui sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os não enzimáticos são por exemplo o selênio, zinco, vitamina E e vitamina A, sendo absorvidos pela dieta na grande maioria. No entanto, os enzimáticos são produzidos pelo próprio organismo como o superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (KUSS, 2005).

A suplementação dos animais com selênio e vitamina E reduz o estresse oxidativo pela retirada dos peróxidos e redução peroxidação dos ácidos graxos das células e também melhorando o efeito positivo no mecanismo de defesa dos animais (SMITS *et al.*, 1997; WEISS; WYATT, 2002).

2.7. Lavado vesical e biomarcadores teciduais

O lavado vesical tem sido uma técnica amplamente utilizada para exames de citopatologia em diagnóstico de neoplasias em bexiga de humanos (POMPEO *et al.*, 2008), porém na medicina veterinária é mais utilizado na clínica de cães e gatos (RASKIN; MEYER, 2011). Azevedo *et al.* (2015) utilizaram essa técnica em bovinos leiteiros com HEB e obtiveram resultados satisfatórios.

Biomarcadores teciduais são utilizados como indicadores do estado fisiológico e de alterações que acontecem no decorrer do processo neoplásico. Podem ser refletidos através da expressão dos marcadores, diversos processos em desenvolvimento nas células tumorais, por exemplo a hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros (SRINIVAS *et al.*, 2001).

É necessário que se tenha sensibilidade e especificidade elevadas para que um teste seja ideal para rastrear uma doença. Os marcadores tumorais vêm sendo

pesquisados e contribuindo para diagnóstico e acompanhamento dos tumores de bexiga (AZEVEDO *et al.*, 2015).

O biomarcador p53 é uma proteína que ao se expressar provoca várias respostas celulares (VOUSDEN; LU, 2002). Por meio de métodos de imunocitoquímica foram realizadas pesquisas sobre a acumulação da p53 mutada em tumores de bovinos (CARVALHO *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009) e utilizado em casos de hematúria enzoótica bovina por Azevedo (2013).

A avaliação de algumas enzimas que estão ligadas diretamente nos processos de apoptose das células é utilizada como método para quantificar a frequência de células tumorais em apoptose, enzimas essas chamadas caspases. Essas enzimas estão presentes no citoplasma da maioria das células, apresentando em formas inativas uma única cadeia polipeptídica, e são ativadas quando essa cadeia é quebrada levando a apoptose (ROBERT; FRIEDLANDER 2003).

As caspases possuem mais de uma dúzia de isoformas e cerca de dois terços apresentam função no processo de apoptose. São denominadas as caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e as caspases executoras (caspases 3, 6 e 7) atuando na via de sinalização da apoptose (THORBERRY; LAZEBNIK 1998). Dentre essas, a mais estudada é a caspase-3 (DONOGHUE *et al.* 1999; DUKERS *et al.* 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comissão de ética

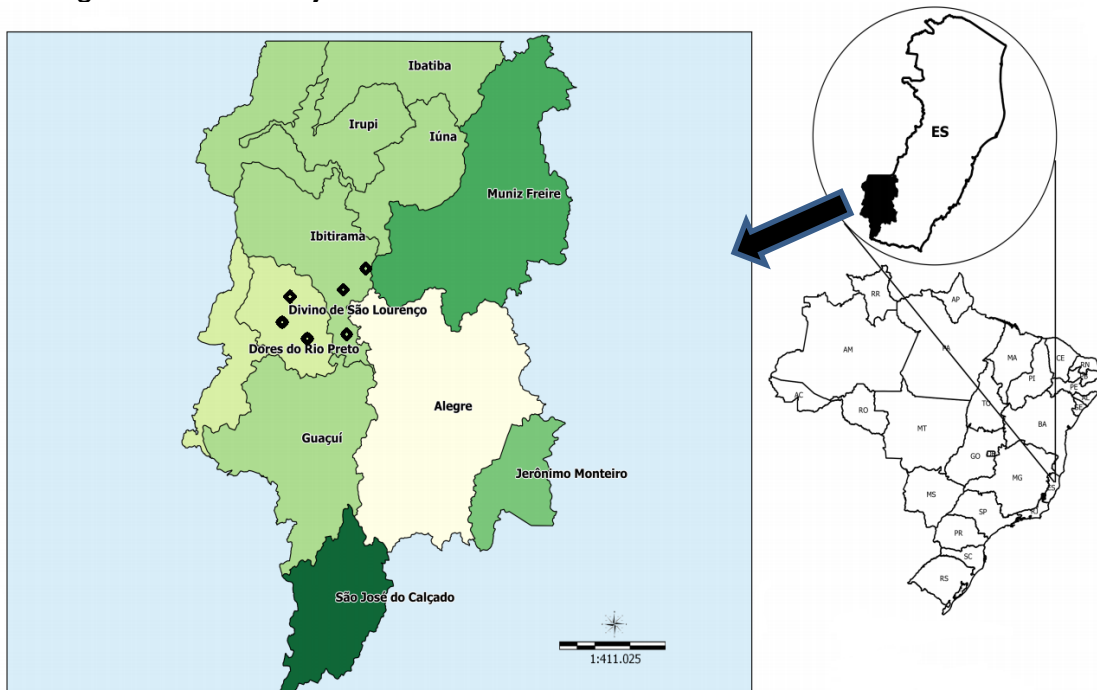
Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES-Alegre), sob números 03/2017 e 025/2020.

3.2. Local de estudo

O local de realização do estudo foi a microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, e incluiu os municípios de Ibitirama e Divino de São Lourenço (DSL) entre agosto de 2019 a janeiro de 2020.

Foram identificadas e selecionadas seis propriedades rurais, por meio de visitas nos municípios de Ibitirama-ES e Divino de São Lourenço-ES, com histórico de hematúria enzoótica bovina nos últimos dois anos e que possuíam a planta *Pteridium* sp. nas áreas de pastejo. Todos os proprietários concordaram em participar deste estudo sob termo de consentimento livre e esclarecido. As propriedades foram identificadas e georreferenciadas por meio de sistema de posicionamento global (GPS portátil Garmin eTREX 10), a saber: Fazenda A ($20^{\circ}31'49.2''\text{S}$ $41^{\circ}39'23.6''\text{W}$) em Ibitirama-ES, Fazenda B ($20^{\circ}32'16.6''\text{S}$ $41^{\circ}37'10.9''\text{W}$) em Ibitirama-ES, Fazenda C ($20^{\circ}36'38.6''\text{S}$ $41^{\circ}44'37.0''\text{W}$) em Divino de São Lourenço-ES, Fazenda D ($20^{\circ}37'43.8''\text{S}$ $41^{\circ}43'00.9''\text{W}$) em Divino de São Lourenço-ES, Fazenda E ($20^{\circ}35'20.5''\text{S}$ $41^{\circ}41'27.6''\text{W}$) em Divino de São Lourenço-ES e Fazenda F ($20^{\circ}34'56.5''\text{S}$ $41^{\circ}38'21.8''\text{W}$) em Ibitirama-ES (Figura1).

Figura 1 - Mapa representativo da área amostral da microrregião do Caparaó, Espírito Santo, com a demarcação das propriedades rurais utilizadas no estudo da avaliação da suplementação com selênio e vitamina E em bovinos com hematúria enzoótica, entre agosto de 2019 a janeiro de 2020.



Fonte: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2015 (Adaptado).

3.3. Seleção dos animais

Para a seleção dos animais, foram observados, após indicação dos proprietários, todos os animais com quadro clínico de HEB ou se haviam apresentado nos dois últimos anos, confirmando ao analisar amostras de urina comprovando a hematúria ou microhematúria. Foram selecionados todos os bovinos confirmados com HEB, totalizando 18 bovinos, fêmeas, com idade variando de quatro a 12 anos. Os animais foram identificados por meio de brincos colocados na orelha direita contendo os dados de: nome, seguido da letra V com numeração sequencial de 01 ao 22 (Tabela 1). Todos os animais foram alimentados durante todo o tratamento, seguindo a rotina das propriedades, da mesma forma recebendo cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) picada, *Brachiaria* sp. e foram mantidos nas mesmas áreas de pastejo em que foram identificadas com hematúria, conforme rotina de manejo alimentar das propriedades.

Tabela 1. Identificação dos animais por propriedade de origem, idade e cidade para avaliação eficácia terapêutica do selênio associado a vitamina E em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica nos municípios de Ibitirama e Divino de São Lourenço (DSL), ES, entre agosto de 2019 e janeiro de 2020.

Propriedade	Município	Identificação	Idade
Fazenda A	Ibitirama	V1	6 anos
Fazenda A	Ibitirama	V2	7 anos
Fazenda A	Ibitirama	V4	6 anos
Fazenda A	Ibitirama	V6	7 anos
Fazenda A	Ibitirama	V7	5 anos
Fazenda A	Ibitirama	V8	7 anos
Fazenda B	Ibitirama	V10	5 anos
Fazenda B	Ibitirama	V11	11 anos
Fazenda B	Ibitirama	V12	12 anos
Fazenda C	DSL	V14	4 anos
Fazenda C	DSL	V15	5 anos
Fazenda D	DSL	V16	10 anos
Fazenda D	DSL	V17	6 anos
Fazenda E	DSL	V18	12 anos
Fazenda E	DSL	V19	11 anos
Fazenda F	Ibitirama	V20	6 anos
Fazenda F	Ibitirama	V21	6 anos
Fazenda F	Ibitirama	V22	7 anos

3.4. Protocolo experimental

Os 18 bovinos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, denominados grupo 1, grupo 2, grupo 3 e grupo 4, separando por sorteio um animal em cada fazenda para ser o controle e foram avaliados em 14 momentos experimentais semanais, em que cada momento determinado como M0 (momento inicial) até o momento 14(M14). Os momentos corresponderam a avaliação dos animais no momento inicial do experimento, durante as 13 semanas de suplementação e o momento após o último tratamento.

Os animais foram submetidos a suplementação parenteral via intramuscular com selênio (FOSFOSAL® - VIRBAC) uma vez por semana, por 13 semanas, segundo Gierus (2007), associado a administração semanal de vitamina E (VITAMINA E®, Laborvet) pelo mesmo período seguindo o protocolo experimental realizado por LANNA NETA (2017) (Tabela 2).

O selênio utilizado na forma de selenito de sódio contido na formulação do produto comercial FOSFOSAL® foi escolhido devido à concentração ser a maior encontrada em produtos comerciais com o menor volume a ser administrado de forma intramuscular.

Tabela 2. Grupos experimentais para avaliação da eficácia terapêutica do Selênio associado a Vitamina E em bovinos leiteiros com hematúria enzoótica nos municípios de Ibitirama e Divino de São Lourenço, microrregião do Caparaó-ES, de agosto de 2019 a janeiro de 2020.

Grupos experimentais	Número de animais	Selenito de sódio	Vitamina E*
Grupo 1 (controle)**	6	-	500 mg/ animal
Grupo 2	4	0,05 mg/Kg	500 mg/ animal
Grupo 3	4	0,10 mg/Kg	500 mg/ animal
Grupo 4	4	0,20 mg/Kg	500 mg/ animal

® Fosfosal (Glicerofosfato de sódio 5.5H₂O -14g, Fosfato monossódico 2H₂O -20,1g, Cloreto de cobre 2H₂O -0,4g, Cloreto de potássio -0,6g, Cloreto de magnésio -2,5g, Selenito de sódio -0,24g) Virbac do Brasil Indústria e comércio Ltda- Av. Queiroz Filho, 1560 - Vila Leopoldina, São Paulo - SP, 05317-000.

*Vitamina E (Acetato de alfa-tocoferol -2g) Laborvet Produtos Veterinários, Avenida banco do nordeste-22, centro, centro industrial Subaé, Feira de Santana, Bahia CIS- Cep 4410-665, caixa postal 363.

**O grupo controle recebeu por via parenteral i.m. a dose de 5mL/animal de solução fisiológica.

A dose de selênio foi calculada com base na concentração de selênio do produto (vide bula nos anexos) em relação ao peso do animal em quilogramas conforme fórmula $(S \cdot 100 / 240) \cdot P = D$. Em que “S” representa a dosagem de selênio por grupo experimental (0,05mg/Kg; 0,10 mg/Kg ou 0,20 mg/Kg), P é o peso do animal e D é a dose em mililitros a ser administrada.

3.5. Avaliações clínicas e coleta das amostras

Inicialmente, os animais foram examinados clinicamente segundo Dirksen; Grunder; Stober (1993) e foi realizada a coleta da urina nos momentos M0, M6 e M14 por micção espontânea em tubos de vidro de 5 mL, devidamente identificados e acondicionados em caixas de isopor contendo gelo reciclável. Em seguida encaminhados para o Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário (HOVET) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para a avaliação de macro e microhematúria conforme Falbo *et al.* (2005).

Além disso, foi obtido o peso por meio de fita de pesagem própria para bovinos e, depois, a cada sete dias, para o cálculo da dose da suplementação e para avaliação do ganho de peso. Os bovinos também foram avaliados em relação à intensidade da presença de sangue na urina, por observação da micção espontânea por método semiquantitativo subjetivo baseado em escore variando de 1 ao 4 (1 = ausente, 2= discreta, 3 moderada e 4= intensa).

Foram coletadas amostras de sangue no momento inicial e a cada 15 dias por punção da veia caudal em tubos a vácuo de 5 mL com anticoagulante (heparina e EDTA) e sem anticoagulante. As amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável e transportadas até o Laboratório de Patologia Animal do HOVET-UFES. Essas amostras foram utilizadas para as análises de hematócrito, proteína sérica total, fibrinogênio, selênio, glutathione peroxidase e antioxidantes totais.

As análises de sangue foram realizadas nos momentos M0, M2, M4, M6, M8, M10, M12 e M14, que correspondem às coletas de material quinzenais.

Nos momentos inicial (M0), momento 6 (semana 6) e no momento 14 (semana 14) foram realizados ainda lavado vesical para realização do exame citológico, segundo Azevedo *et al.* (2015). Bem como, para a técnica de imunocitoquímica com a utilização dos biomarcadores anti-caspase3 e anti-p53.

3.6. Processamento das amostras

Para a avaliação da existência de microhematúria colocou-se uma gota de urina, centrifugada a 10 mil rpm por 5 minutos, na câmara de Neubauer sob microscópio óptico classificando conforme Falbo *et al.* (2005).

A determinação do hematócrito foi realizada com as amostras coletadas com anticoagulante EDTA por meio do preenchimento de tubos capilares por gravidade em 3/4 de sua capacidade e em seguida centrifugados em microcentrífuga a 3.000 rotações por minuto, durante 10 minutos e realizado em seguida a leitura em tabela própria.

Como descrito por Falbo *et al.* (2005) foi realizado a determinação de proteína plasmática total, proteína plasmática e calculado por meio da subtração de uma pela outra o fibrinogenio.

As amostras de sangue com heparina foram utilizadas para a determinação dos níveis de selênio e de glutathiona peroxidase e foram transferidas para microtubos de 1,5 mL (tipo criotubos) e acondicionados em freezer -80°C até o processamento.

A fim de realizar os exames para glutathiona peroxidase foram utilizadas as amostras de sangue descongeladas em banho-maria a temperatura de 36°C e utilizando-se o kit comercial (RANDOX, RS 505, SC692 Crumlin, UK), e seguindo a técnica descrita pelo fabricante.

As amostras de sangue sem anticoagulante foram utilizadas para a determinação dos níveis de antioxidantes totais e selênio. Para isto, foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto durante 10 minutos em centrífuga de tubos (centrífuga). Em seguida, o soro foi transferido para microtubos de 1,5 ml (tipo criotubos) e acondicionados em freezer -80°C até o processamento.

Os níveis de antioxidantes totais foram mensurados utilizando o kit comercial (SIGMA-ALDRICK, MAK334, St. Louis. MO. USA), e seguindo a técnica conforme o fabricante.

As amostras de lavado vesical foram submetidas a centrifugação em citocentrífuga (Citocentrífuga TekLab® Citológica CT1) durante cinco minutos sob rotação de 1500 rpm para confecção das lâminas. Foram utilizados 50 µL de lavado vesical para cada citofunil, obtendo-se um total de cinco lâminas por animal por momento. Uma das lâminas foi corada pelo método de Giemsa e avaliadas quanto à celularidade e presença ou não de neoplasias. As demais lâminas foram utilizadas para a técnica de imunocitoquímica padronizada no Laboratório de Patologia Animal do CCAE-UFES utilizando-se os anticorpos anti-caspase 3 e anti-p53.

3.7. Análise estatística

A realização da análise estatística de todas as variáveis estudadas utilizou-se o programa estatístico Graphpad prism 9.0.0 aplicando, simultaneamente, os testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis e Friedman e foram aplicados com nível de significância de 5%. O teste de Kruskal-Wallis foi para avaliar o efeito tratamento, enquanto o teste de Friedman, para avaliar o efeito tempo dentro de cada tratamento. Ambos os testes foram seguidos pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Estatisticamente foram avaliadas as variáveis quanto ao efeito tratamento e efeito tempo. Para a análise do efeito tratamento, os dados obtidos de cada momento amostral foram comparados entre os diferentes grupos. Para avaliação do efeito tempo foram comparados dentro de cada grupo os dados dos diferentes tempos amostrais.

Para a avaliação citopatológica do lavado vesical e os biomarcadores foi utilizada estatística descritiva baseada em percentuais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Peso

Em relação ao peso corporal dos animais, verificou-se que não houve diferença no ganho de peso entre os grupos experimentais. Porém, houve diferença significativa ao se avaliar o efeito tempo dos animais do grupo 1 entre o momento 2 e 8 demonstrando peso maior no momento 2 em relação ao momento 8 (Tabela 3).

Tabela 3 - Pesos dos animais em quilogramas distribuídos em grupos experimentais em diferentes momentos submetidos à suplementação com Se associado à vitamina E em bovinos com HEB.

Peso dos animais				
Momento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
M0	434,0 ^{Aa}	409,5 ^{Aa}	405,5 ^{Aa}	385,5 ^{Aa}
	(326,3 - 506,0)	(382,0 - 551,0)	(332,5 - 499,5)	(358,0 - 422,0)
M2	405,0 ^{Aab}	388,5 ^{Aa}	376,0 ^{Aa}	379,5 ^{Aa}
	(335,0 - 467,8)	(361,0 - 503,8)	(308,5 - 442,8)	(309,3 - 422,0)
M4	385,5 ^{Aa}	394,5 ^{Aa}	370,0 ^{Aa}	364,5 ^{Aa}
	(330,3 - 460,5)	(364,0 - 484,3)	(301,0 - 436,0)	(306,5 - 412,8)
M6	398,0 ^{Aa}	367,0 ^{Aa}	382,5 ^{Aa}	367,0 ^{Aa}
	(331,0 - 472,5)	(362,5 - 472,0)	(318,3 - 440,8)	(311,5 - 453,3)
M8	378,5 ^{Aac}	391,0 ^{Aa}	382,0 ^{Aa}	376,0 ^{Aa}
	(330,3 - 449,0)	(340,8 - 470,5)	(319,8 - 430,0)	(358,0 - 394,0)
M10	395 ^{Aa}	373 ^{Aa}	364 ^{Aa}	361,5 ^{Aa}
	(328,8 - 454,5)	(358 - 443,5)	(309,3 - 430)	(317 - 394)
M12	394,0 ^{Aa}	394,0 ^{Aa}	357,0 ^{Aa}	376,0 ^{Aa}
	(333,8 - 456,0)	(351,3 - 452,5)	(314,8 - 428,5)	(321,3 - 397,0)
	391,5 ^{Aa}	379,0 ^{Aa}	385,0 ^{Aa}	367,0 ^{Aa}
M14	(325,5 - 448,5)	(361,0 - 489,0)	(373,0 - 441,0)	(348,3 - 400,8)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%.

Esses dados corroboram com os obtidos por Lawer *et al.* (2004) em estudo com diferentes fontes de selênio por via oral para suplementação de novilhos que não observaram relação da suplementação com o ganho de peso dos animais e a eficiência alimentar, já que os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas.

Contudo, não foram observados os mesmos resultados obtidos por Lanna Neta (2018) obtendo em seus resultados ganhos de peso em seus experimentos nos animais tratados com diferentes doses de Selênio. O estudo realizado por Lanna Neta (2018) foi desenvolvido com as mesmas características deste, porém com animais e propriedades que se diferem deste e por não informar o período do ano realizado, pode ter sido em época que a disponibilidade de matéria verde nas pastagens poderia ter sido mais abundante justificando o ganho de peso.

Lawler et al. (2004) em seus estudos suplementando novilhos com diferentes fontes de selênio não observou relação com a eficiência alimentar e o ganho de peso corroborando com este trabalho.

Por outro lado, em estudo realizado por Meirelles (2009) com diferentes fontes de selênio na suplementação de bovinos da raça Brangus foram encontradas diferenças significativas do ganho de peso e rendimento de carcaça entre as diferentes dosagens de selênio administradas em relação ao grupo controle. Porém, esse mesmo estudo não identificou diferença entre as diferentes fontes de selênio utilizadas, ou seja, não houve diferença entre a utilização de selênio orgânico ou inorgânico.

Analisando as diferenças de peso entre os momentos 2 e 8 do grupo controle, pensa-se que fatores como o período de realização do experimento por ser em sua maioria na época de seca na região, animais gestantes e mudanças de áreas de pastagens podem ter contribuído para esse resultado.

O fato de o inverno ter iniciado à época do estudo pode explicar o comprometimento da qualidade das forrageiras, radiação solar, disponibilidade de água e temperaturas mais baixas conforme citado por Santos, Gomes e Fonseca (2014). Desta forma a diferença de peso percebida pode ser justificada pela qualidade e oferta de alimento que se encontrava diminuída. Somado a isso os animais gestantes necessitam de maior aporte nutricional e levando em consideração as condições alimentares esclarecidas pode ter favorecido para a diferença de peso observada entre os momentos do grupo controle em relação ao tempo.

4.2. Intensidade da hematúria

O quadro clínico de hematúria observado nos diferentes grupos e em diferentes momentos nos revela diferença significativa na redução da hematúria entre o grupo controle e o grupo 1 demonstrados nos momentos 4, 6, 14. Contudo, ao se analisar ao longo do tempo, esta variável não se obtém diferença significativa em nenhum dos grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação semi-quantitativa do grau de hematúria pela avaliação clínica da micção espontânea, classificado em escore variando de 1 a 4 (1= ausente, 2= discreta, 3= moderada e 4= intensa), em bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.

Momento	Hematúria			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
M0	4,00 ^{Aa} (1,75 - 4,00)	1,50 ^{Aa} (1,00 - 3,50)	2,00 ^{Aa} (1,25 - 3,50)	3,00 ^{Aa} (2,00 - 4,00)
M4	3,00 ^{AaB} (1,75 - 4,00)	1,00 ^{AaC} (1,00 - 1,75)	1,50 ^{Aa} (1,00 - 3,50)	3,00 ^{Aa} (2,25 - 3,00)
M6	3,50 ^{AaD} (2,00 - 4,00)	1,00 ^{AaE} (1,00 - 1,00)	2,50 ^{Aa} (1,25 - 3,00)	2,00 ^{Aa} (1,25 - 3,50)
M8	3,50 ^{Aa} (2,00 - 4,00)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 1,00)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 3,25)	3,00 ^{Aa} (2,25 - 3,75)
M10	2,25 ^{Aa} (1,00 - 4,00)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 1,00)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 3,25)	3,00 ^{Aa} (2,25 - 3,00)
M12	2,25 ^{Aa} (1,75 - 4,00)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 1,00)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 3,25)	3,00 ^{Aa} (1,50 - 3,75)
M14	3,50 ^{AaF} (1,75 - 4,00)	1,00 ^{AaG} (1,00 - 1,75)	1,00 ^{Aa} (1,00 - 3,25)	4,00 ^{Aa} (2,50 - 4,00)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%. O momento 2 foi considerado como parcela perdida devido ao baixo número de amostras.

Os resultados encontrados corroboram com os obtidos por Lanna Neta (2018), que avaliou bovinos intoxicados por *Pteridium* sp. e com hematúria enzoótica na mesma região geográfica e suplementou animais com vitamina E e Se.

Os resultados observados revelam redução da hematúria após a terceira semana de suplementação no grupo 2 que utiliza a menor dose de Se corroborando com os resultados obtidos por Lanna Neta (2018) que ao avaliar bovinos intoxicados por *Pteridium* sp. e com hematúria enzoótica na mesma região geográfica também obteve redução da hematúria nos grupos suplementados com vitamina E e selênio em relação ao grupo controle (Figura 2).

Figura 2 - Variações na intensidade da hematúria dos bovinos com HEB utilizados na avaliação da suplementação com Se e vitamina E, microrregião do Caparaó, entre agosto de 2019 e janeiro de 2020, revelando em A) Animal V10, grupo 2, revelando hematúria grau 4 (momento 0); B) Animal V10, grupo 2, revelando hematúria grau 1 (momento 6); C) Animal V14, grupo controle, revelando hematúria grau 3 (momento 7) e D) Animal V15, grupo 2, hematúria grau 1 (momento 7).



Para a caracterização dos animais como cronicamente intoxicados pela samambaia, a existência da macrohematúria é um dos sinais mais importantes, que se caracteriza pela presença de sangue na urina visível macroscopicamente. Por outro lado, a microhematúria encontrada nos animais pode estar relacionada aos períodos de remissão da doença, podendo o quadro não ser observado durante dias, semanas ou meses sem sangramento, levando a acreditar que ainda não houve o acometimento neoplásico da bexiga, mas pode cursar com petéquias e equimoses na mucosa vesical como citado por Tokarina *et al.* (2012).

De acordo com Silva *et al.* (2009) em estudo realizado em propriedades leiteiras, na mesma região do Caparaó no Sul do Espírito Santo, verificou-se

prevalência de 56,4% de hematúria enzoótica nos animais avaliados com 100% revelando macrohematúria.

Neste estudo a microhematúria foi pouco observada nos animais, porém, não menos importante que os quadros de macrohematuria, pois estão associados aos tipos de lesões vesicais, se neoplásicas ou não neoplásicas. Neste sentido, pode-se supor que os quadros de microhematuria são menos prejudiciais em um contexto geral para o organismo animal devido a causar menos perda de sangue e, conseqüentemente, menos anemia.

4.3. Hematócrito, proteína sérica total e fibrinogênio

4.3.1 Hematócrito

Na análise estatística do hematócrito nesse estudo pode-se observar diferenças significativas entre o grupo 1 e 2 nos momentos 8 e 14 demonstrando melhora no quadro de anemia pelo aumento perceptível das taxas de hematócrito. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ao longo do tempo (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação do hematócrito de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.

Hematócrito %				
Momento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4

M0	20,50 ^{Aa} (17,25 - 24,50)	28,00 ^{Aa} (22,00 - 33,25)	24,00 ^{Aa} (21,75 - 27,00)	23,00 ^{Aa} (12,00 - 28,00)
M2	18,00 ^{Aa} (15,25 - 20,75)	26,50 ^{Aa} (13,75 - 33,25)	26,00 ^{Aa} (18,50 - 27,50)	19,25 ^{Aa} (11,63 - 23,5)
M4	22,25 ^{Aa} (17,25 - 24,00)	26,50 ^{Aa} (25,00 - 32,50)	24,50 ^{Aa} (21,50 - 29,75)	21,50 ^{Aa} (15,25 - 25,50)
M6	21,50 ^{Aa} (18,50 - 23,75)	24,50 ^{Aa} (23,25 - 31,00)	22,50 ^{Aa} (21,25 - 27,50)	23,00 ^{Aa} (17,50 - 26,25)
M8	20,00 ^{AaB} (16,75 - 23,25)	26,00 ^{AaC} (25,25 - 32,00)	23,00 ^{Aa} (22,00 - 27,75)	21,50 ^{Aa} (17,50 - 24,00)
M10	20,50 ^{Aa} (18,75 - 25,25)	26,00 ^{Aa} (24,25 - 30,00)	25,00 ^{Aa} (22,00 - 25,75)	20,00 ^{Aa} (10,50 - 27,25)
M12	20,00 ^{Aa} (17,75 - 21,25)	25,00 ^{Aa} (24,00 - 30,50)	23,50 ^{Aa} (20,00 - 25,50)	20,50 ^{Aa} (13,25 - 26,25)
M14	20,00 ^{AaD} (18,25 - 21,5)	26,00 ^{AaE} (23,50 - 31,50)	22,50 ^{Aa} (17,50 - 23,38)	17,00 ^{Aa} (12,25 - 24,75)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%.

Para bovinos que são acometidos pela hematúria enzoótica bovina se observa como um dos sinais clínicos a anemia e, ao se fazer exames laboratoriais, percebe-se o hematócrito abaixo do limite comparado com os valores considerados normais para a espécie, além da fragilidade eritrocitária aumentada e anemia progressiva (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO-SOTO BLANCO, 2020; SILVA et al 2009).

Considerando os valores de 24% de hematócrito como o limiar para considerar o bovino como anêmico ou não podemos notar neste estudo que no grupo 2 em relação ao 1 os valores que estavam abaixo de 24% se elevaram, ou seja, verificaram-se valores entre 24% e 46% o que é considerado normal para a espécie de acordo com Jain (1993).

Segundo Thrall (2015), dentre as causas da anemia nos animais estão as perdas de sangue por hemorragias e os resultados encontrados neste estudo revelaram que a suplementação com o selênio na menor dose contribuiu para redução da anemia após sete semanas de tratamento.

4.3.2 Proteína Plasmática Total

Ao se analisar os resultados de proteína plasmática notou-se que os valores estavam dentro da normalidade para a espécie bovina (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação da proteína plasmática total de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.

Proteínas plasmáticas totais g/L				
Momento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
M0	6,95 ^{Aa} (6,30 - 7,55)	8,20 ^{Aa} (7,45 - 8,35)	7,90 ^{Aa} (7,20 - 8,15)	7,00 ^{Aa} (6,20 - 7,90)
M2	7,05 ^{Aa} (6,12 - 7,40)	7,90 ^{Aa} (6,22 - 8,60)	7,70 ^{Aa} (7,60 - 8,10)	7,05 ^{Aa} (6,50 - 7,35)
M4	6,90 ^{Aa} (5,90 - 7,35)	7,60 ^{Aa} (7,40 - 7,95)	7,40 ^{Aa} (6,75 - 8,05)	6,70 ^{Aa} (5,45 - 7,35)
M6	6,65 ^{Aa} (6,87 - 7,25)	7,65 ^{Aa} (7,05 - 8,02)	7,30 ^{Aa} (6,47 - 7,90)	6,85 ^{Aa} (5,82 - 7,35)
M8	7,00 ^{Aa} (6,25 - 7,60)	7,90 ^{Aa} (7,35 - 8,30)	7,50 ^{Aa} (6,80 - 7,90)	6,90 ^{Aa} (6,65 - 7,90)
M10	6,90 ^{Aa} (6,55 - 8,10)	7,40 ^{Aa} (7,20 - 8,50)	7,50 ^{Aa} (7,10 - 8,20)	6,80 ^{Aa} (6,30 - 8,20)
M12	6,80 ^{Aa} (6,25 - 7,10)	8,00 ^{Aa} (7,70 - 8,15)	7,30 ^{Aa} (7,00 - 8,00)	6,70 ^{Aa} (5,60 - 7,95)
M14	7,00 ^{Aa} (6,50 - 7,40)	8,00 ^{Aa} (7,70 - 8,15)	6,80 ^{Aa} (6,52 - 7,60)	6,70 ^{Aa} (5,65 - 7,75)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%.

4.3.3 Fibrinogênio

Não foram encontradas alterações significativas para a valores do fibrinogênio em nenhum dos momentos dos tratamentos aplicados, ficando a média geral dentro da normalidade 300 a 700 mg/dL, segundo Schalm e Jain (1986) (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação do fibrinogênio plasmática de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.

Fibrinogênio plasmático mg/dL				
Momento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
M0	600 ^{Aa} (350 - 800)	400 ^{Aa} (125 - 1050)	600 ^{Aa} (525 - 600)	600 ^{Aa} (100 - 800)
M2	450 ^{Aa} (275 - 900)	550 ^{Aa} (-875 - 100)	600 ^{Aa} (250 - 950)	150 ^{Aa} (25 - 650)
M4	400 ^{Aa} (275 - 450)	100 ^{Aa} (150 - 200)	200 ^{Aa} (100 - 500)	200 ^{Aa} (0 - 400)

M6	300 ^{Aa} (200 - 975)	600 ^{Aa} (425 - 850)	400 ^{Aa} (225 - 500)	200 ^{Aa} (25 - 750)
M8	400 ^{Aa} (200 - 1000)	400 ^{Aa} (250 - 400)	500 ^{Aa} (400 - 600)	400 ^{Aa} (250 - 550)
M10	600 ^{Aa} (350 - 825)	250 ^{Aa} (200 - 675)	400 ^{Aa} (325 - 850)	200 ^{Aa} (200 - 500)
M12	600 ^{Aa} (500 - 725)	500 ^{Aa} (400 - 600)	500 ^{Aa} (100 - 675)	300 ^{Aa} (225 - 375)
M14	350 ^{Aa} (200 - 400)	250 ^{Aa} (200 - 675)	250 ^{Aa} (50 - 375)	400 ^{Aa} (250 - 400)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%.

O fibrinogênio é a proteína mais usada para avaliar a reação de fase aguda nos bovinos. Além disso, a concentração do ferro sérico ou plasmático diminui rapidamente em resposta a inflamação (MURATA *et al.*, 2004; DETIVAUD *et al.*, 2005). O ferro, por sua vez, é um nutriente essencial a homeostasia, uma vez que participa na síntese da hemoglobina, no transporte de elétrons, na síntese do DNA e em outras reações enzimáticas. A atuação dele como cofator de enzimas na síntese de DNA torna os tecidos com atividade proliferativa vulnerável ao estado de deficiência, em especial aqueles com intensa atividade de divisão celular, como o sistema hematopoiético (formação e desenvolvimento das células sanguíneas), tornando os animais mais suscetíveis ao desenvolvimento da anemia (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Neste estudo verificou-se melhora da reação inflamatória no decorrer do experimento o que pode sugerir que também tenha ocorrido melhora na resposta hematológica. Este fato aconteceu também com o grupo controle que não foi suplementado com selênio, o que leva a crer que nessa situação houve influência da vitamina E.

Ao se correlacionar com os valores obtidos com a proteína plasmática total observou-se que no momento 0 (M0) o grupo 1 apresentava valor médio de 11,0895:1, no grupo 2 valor de 15,2381:1, grupo 3 valor de 13,4782:1 e no grupo 4 valor de 10,55:1. Esses dados sugerem que os grupos 1, 3, e 4 apresentavam reação inflamatória no momento inicial (M0) e, no momento 14, isso não foi mais observado.

4.4 Antioxidantes totais

Para os níveis antioxidantes totais (AT) avaliados pode-se perceber diferença significativa para o efeito tempo no grupo controle entre M8 e M12 com concentrações mais baixas no momento M12. Foi observado também diferença significativa para o efeito tempo no grupo 2, entre os momentos M0 e M14 e M12 e M14, com níveis mais acentuados no momento M14. Ao avaliar o efeito tratamento, observou-se diferença significativa entre o grupo 1 e grupo 2, no momento M14, apontando para maiores concentrações de AT no grupo 2 (Tabela 8).

Tabela 8 – Níveis de antioxidantes totais de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.

Níveis de antioxidantes totais				
Momento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	0,065 ^{Aa}	0,082 ^{Aae}	0,086 ^{Aa}	0,072 ^{Aa}
M0	(0,058 - 0,078)	(0,067 - 0,092)	(0,078 - 0,094)	(0,065 - 0,090)
	0,090 ^{Aa}	0,100 ^{Aa}	0,090 ^{Aa}	0,087 ^{Aa}
M2	(0,078 - 0,102)	(0,090 - 0,113)	(0,082 - 0,102)	(0,083 - 0,131)
	0,084 ^{Aa}	0,091 ^{Aa}	0,076 ^{Aa}	0,083 ^{Aa}
M4	(0,072 - 0,095)	(0,074 - 0,099)	(0,068 - 0,089)	(0,062 - 0,104)
	0,081 ^{Aa}	0,088 ^{Aa}	0,082 ^{Aa}	0,094 ^{Aa}
M6	(0,068 - 0,091)	(0,071 - 0,093)	(0,068 - 0,092)	(0,076 - 0,094)
	0,097 ^{Aab}	0,096 ^{Aa}	0,090 ^{Aa}	0,087 ^{Aa}
M8	(0,081 - 0,102)	(0,093 - 0,096)	(0,084 - 0,094)	(0,081 - 0,091)
	0,078 ^{Aa}	0,100 ^{Aa}	0,086 ^{Aa}	0,085 ^{Aa}
M10	(0,074 - 0,104)	(0,090 - 0,110)	(0,078 - 0,103)	(0,074 - 0,097)

	0,063 ^{Aac}	0,072 ^{Aaf}	0,078 ^{Aa}	0,073 ^{Aa}
M12	(0,058 - 0,073)	(0,068 - 0,080)	(0,059 - 0,087)	(0,057 - 0,092)
	0,078 ^{Aad}	0,101 ^{Aag}	0,088 ^{Aa}	0,084 ^{Aa}
M14	(0,076 - 0,085)	(0,100 - 0,116)	(0,078 - 0,111)	(0,070 - 0,094)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%.

Modificações de proteínas celulares, lipídios, e ácidos nucleicos são consequências do estresse oxidativo que ocorre pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Desta forma, ocorrem lesões irreversíveis e modificações nos componentes celulares (GARREL *et al.*, 2010). Assim, manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos é o objetivo do sistema de defesa antioxidante impedindo que se multipliquem e causem danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA, 2010) os quais são responsáveis por muitos processos patológicos (SOCHOR *et al.*, 2010).

A redução dos níveis de antioxidantes totais ao longo do tempo observado no grupo 1 nos leva a crer que são devido aos mesmos fatores relatados para a variável peso, devido ao período de seca que foi realizado o estudo, pois é quando possui baixa qualidade nutricional das forrageiras utilizadas na alimentação desses animais, assim como a gestação de alguns animais e a mudança de áreas de pastagem.

Segundo Samóra (2014), vacas leiteiras em seu ciclo reprodutivo e produtivo possuem vários desafios metabólicos podendo ocorrer déficit de vitaminas e minerais, isso por balanços energéticos negativos que podem ocorrer e esses deficit pode ser dos componentes com propriedades antioxidantes como o selênio e vitamina E.

Como consequencia do estresse oxidativo segundo Finkel e Holbrook (2000), ocorrem as modificações de proteínas celulares, lipídios, e ácidos nucleicos, isso devido à disparidade entre a formação de radicais livres e as defesas antioxidantes. Com isso, acontecem modificações nos componentes celulares e lesões irreversíveis (GARREL *et al.*, 2010). Então, a principal função do sistema de defesa antioxidante é manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos não permitindo a produção exacerbada de radicais livres e como consequência os danos sistêmicos e processos patológicos causados por esses ao organismo (Barbosa 2010, Sochor *et al.* 2010).

A suplementação com Se. associado com vitamina E na dose de 0,05 mg/ Kg (grupo 2) acarretou aumento dos níveis de antioxidantes totais ao longo do experimento indicando para maiores níveis de antioxidantes após 13 semanas de suplementação, demonstrando a efetividade das propriedades antioxidantes do Se e vitamina E. Ao se avaliar conjuntamente o efeito sobre as variáveis hematúria e hematócrito, o grupo 2 também apresentou os melhores resultados clínicos para a redução da hematúria e aumento do hematócrito. Assim, é possível sugerir que o efeito antioxidante do Se associado a vitamina E foram responsáveis pelas melhoras clínicas observadas.

4.5 Glutaciona peroxidase

Ao analisar a atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase pelo efeito tempo pode-se notar diferença significativa no grupo 4 entre os momentos M8 e M14, com atividade superior no momento M8. Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 9).

Tabela 9 – Atividade da enzima glutaciona peroxidase no sangue total de bovinos com HEB suplementados com Se associado à vitamina E em diferentes momentos experimentais.

Glutaciona peroxidase				
Momento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	142,5 ^{Aa}	169,5 ^{Aa}	168,5 ^{Aa}	135,5 ^{Aa}
M0	(142,8 - 172,5)	(160,8 - 236,0)	(141,3 - 183,0)	(128,0 - 182,0)
	129,0 ^{Aa}	140,5 ^{Aa}	127,5 ^{Aa}	157,5 ^{Aa}
M4	(120,3 - 153,0)	(117,0 - 205,3)	(117,8 - 132,8)	(118,0 - 172,3)
	122,5 ^{Aa}	163,5 ^{Aa}	144,5 ^{Aa}	187,0 ^{Aa}
M6	(100,5 - 154,0)	(129,0 - 237,8)	(127,8 - 169,5)	(155,0 - 227,3)
	183,5 ^{Aa}	227,5 ^{Aa}	217,5 ^{Aa}	246,5 ^{Aab}
M8	(168,3 - 257,5)	(179,3 - 266,8)	(154,8 - 254,8)	(190,5 - 265,0)
	120,0 ^{Aa}	134,5 ^{Aa}	159,5 ^{Aa}	77,5 ^{Aa}
M12	(75,0 - 205,8)	(75,0 - 283,3)	(59,5 - 269,3)	(62,5 - 182,5)

	184,5 ^{Aa}	199,0 ^{Aa}	182,0 ^{Aa}	71,00 ^{Aac}
M14	(159,0 - 208,5)	(83,5 - 261,3)	(89,25 - 247,8)	(38,5 - 182,3)

Medianas (1º quartil |-| 3º Quartil). As medianas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis. As medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Friedman. Ambos os testes com nível de significância de 5%. Os momentos 2 e 10 foram considerados como parcela perdida devido ao baixo número de amostras.

Nota-se neste estudo um aumento na atividade enzimática da glutathiona peroxidase após a sétima semana de suplementação, reduzindo após a última aplicação que ocorre na décima terceira semana de realização do trabalho. Nesta pesquisa observou-se diferenças significativas para o aumento da atividade da glutathiona peroxidase nos grupos que receberam suplementação com Se em relação ao grupo controle.

O controle das reações oxidativas prejudiciais ao organismo é realizado por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (EREL, 2004). Dos enzimáticos podemos citar os antioxidantes que eliminam os radicais livres formados de outras moléculas no qual a glutathiona peroxidase está incluída (NEMEC et al. 2000).

A determinação da quantidade separadamente dos diferentes antioxidantes é difícil, isso pela possibilidade das interações entre eles no organismo, podendo representar quantidade menor em relação ao estado antioxidante geral (PRIOR; CAO, 1999).

Com isso a capacidade antioxidante representa uma das maneiras de como o organismo pode se proteger contra os radicais livres inibindo ou evitando reações oxidativas nas biomoléculas (EREL, 2004)

A utilização de selênio e vitamina E em suplementos na produção animal tem sido bastante empregado, pois estes associados possuem vários efeitos benéficos na reprodução, como a influência da viabilidade dos espermatozoides em machos e efeitos antioxidantes nos ovários e útero nas fêmeas. Também tem efeitos nas glândulas mamárias melhorando o mecanismo de defesa diminuindo o índice de mastite (SMITH *et al.*, 1984; WILD, 2006; SMITH, 2000; SANTOS, 1999). Porém, os efeitos do selênio precisam ter maiores estudos quanto aos efeitos em animais intoxicados cronicamente por *Pteridium* sp.

Os níveis essenciais e tóxicos do selênio tem seus limites bastante estreitos, variando de acordo com a via de administração, dessa forma, por via oral os níveis

ideais de selênio estão por volta de 0,1ppm, e no máximo 0,5ppm, enquanto, na administração por via intramuscular, a dosagem indicada é de 0,1mg/Kg de aplicação, sendo a dosagem tóxica a partir 0,3mg/Kg (GONZÁLEZ, 2000). Neste estudo as dosagens utilizadas foram de acordo com Gerius (2007) e não foram verificados sinais de toxidez nos animais avaliados.

A vitamina E tem a capacidade de diminuir a formação de peróxidos por meio da quelação de espécies reativas de oxigênio, protegendo assim a membrana lipídica, receptores e outros componentes celulares que envolvem a modulação da resposta imunológica (MEYDANI, 1995). Com isso, foi demonstrado por Nidiweni e Finch (1996) que a suplementação com vitamina E e o selênio aumenta a quimiotaxia, a migração e a fagocitose dos neutrófilos de bovinos contra *Staphylococcus aureus*. Porém, pouco se sabe ainda sobre mecanismos de estimulação da resposta imunológica em bovinos.

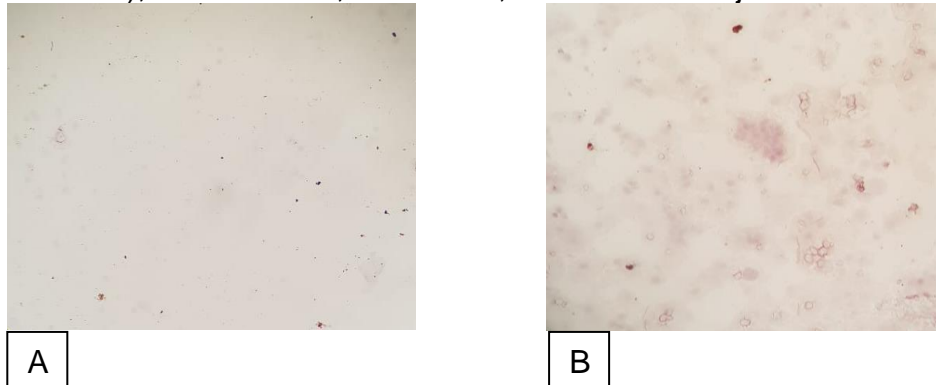
Conforme citado por McDowell (1992) pequena parte do selênio do solo está disponível para a vegetação, entretanto, em solos ácidos essa disponibilidade se torna ainda mais reduzida o que faz com que as plantas desses locais, que são utilizadas para a alimentação dos bovinos, apresentem baixas concentrações deste mineral. Assim, é importante salientar que a hematúria enzoótica bovina ocorre mais em regiões de solos ácidos (SILVA *et al.*, 2009; LANNA NETA, 2017) corroborando com a característica principal da região em que se realizou este estudo, ou seja, a de baixa concentração de selênio nas vegetações.

4.6 Lavado vesical e biomarcadores

Dos animais avaliados, somente cinco revelaram lesões vesicais do tipo neoplásicas e uma lesão não neoplásica do tipo inflamatória. Dentre os animais que apresentaram lesões neoplásicas verificou-se a expressão do biomarcador p53 em três animais, enquanto caspase-3 foi verificada em quatro animais. Os biomarcadores revelaram marcação de fraca a moderada intensidade, porém sempre com baixa celularidade nas amostras. Devido a isso, não foi possível estabelecer relação entre a expressão dos biomarcadores e a progressão tumoral, entretanto, houve uma

tendência de marcação mais fraca nas amostras dos animais no decorrer dos tratamentos (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografia de citologia de lavado vesical de bovino com HEB revelando em A) Imunomarcacão positiva fraca de p53 (nuclear), amostra V15, Fazenda C, momento 0; B) Imunomarcacão positiva, moderada de caspase-3 (citoplasmática), amostra V19, fazenda E, momento 0. Objetiva de 10x.



Para se detectar a hematúria, Azevedo *et al.* (2015) testaram diferentes técnicas de diagnóstico por meio de coleta do lavado vesical recuperando todo o líquido vesical infundido ou recuperando apenas o último lavado. Estes autores observaram células epiteliais em 60% dos casos, não sendo possível classificar nenhuma amostra como hiperplásica ou neoplásica. Esta técnica, utilizada de forma isolada, pode não trazer resultados significativos, porém, pode ser uma ferramenta importante quando existe microhematúria. Neste presente estudo através desta técnica pode-se identificar que cinco animais revelaram lesões vesicais do tipo neoplásicas e uma lesão não neoplásica do tipo inflamatória.

Azevedo *et al.* (2015) também citaram algumas desvantagens desta técnica em que as amostras obtidas por meio do lavado vesical podem muitas vezes não revelar o acometimento neoplásico desses animais.

As lesões não neoplásicas da HEB são caracterizadas principalmente por ectasias e dilatações vasculares. Seguindo neste contexto, existem vários estudos que comprovam o envolvimento do estresse oxidativo na aterogênese e sugerem que o consumo de alguns antioxidantes possa ter resultados importantes no tratamento de doenças cardiovasculares (THOMSON *et al.*, 2007). Sabendo disso, é possível que o selênio associado a vitamina E possam causar redução de vasodilatação na vesícula urinária de bovinos com HEB.

A utilização do selênio neste trabalho como alternativa para diminuir a intensidade de hematuria nos animais cronicamente intoxicados demonstrou-se como boa alternativa, pois as utilizações da menor à maior dosagem propostas apresentaram-se viáveis. Porém, o tratamento de maior dosagem está próximo a dosagem tóxica, o que configura um risco. Então, observando limiar de toxidez desse elemento para bovinos, acredita-se que a utilização da menor dosagem ou da dosagem intermediária seria mais seguro minimizando os riscos de intoxicação nos animais.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a suplementação com selênio associado a vitamina E em bovinos leiteiros com hematuria enzoótica causa melhora do quadro clínico de hematuria, aumenta os níveis de antioxidantes totais, porém não interfere na atividade da glutathione peroxidase. No entanto, não foi possível se estabelecer relação entre a expressão dos biomarcadores e a progressão tumoral com a suplementação com selênio e vitamina E.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. Use of desferrioxamine as a 'probe' for iron-dependent formation of hydroxyl radicals. Evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical. **Biochemical Pharmacology**. V 34, n 2, p 229-233, 1985.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p.103-108, 1996.
- ANDERSON, R. A. *et al.* Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours. **The Veterinary Journal**, v. 154, p. 69-78, 1997.
- ANJOS, B. L. *et al.* Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v .29, n. 9, p. 753-766, 2009.
- ANJOS, B. L. *et al.* Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 501-507, 2008.
- ARANHA, P. C. d. R. *et al.* Fate of ptaquiloside—A fern fern toxin—In bovino. **Plos One** 14 (6): e0218628, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218628>
- AZEVEDO, M. A. S. **Avaliação citopatológica, imunocitoquímica e teste do cometa do lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2013.
- AZEVEDO, M. A. S. *et al.* Lavado vesical de bovinos com hematúria enzoótica: padronização de técnica de colheita, obtenção de amostras e avaliação citopatológica. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 82, 2015. doi:10.1590/1808-1657001002013
- BARBOSA, K. B. F.*et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. doi:10.1590/S1415-52732010000400013
- BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista De Nutrição**, 12(Rev. Nutr., 1999 12(2)), 123–130. <https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>
- BRANDAO, J. F. C. *et al.* Ecological restoration in area dominated by *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn in Caparao National Park, MG. **Revista Árvore**, v. 41, n. 1, p. 1-11, 2017.
- CAMPO, M. S. Bovine Papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.

CAMPO, M. S. *et al.* Latent papilloma virus infection in cattle. **Research In Veterinary Science**, v. 56, p. 151-157, 1994

CARVALHO, T. *et al.* Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic haematuria. **Veterinary Pathology**, v. 46 n(2), p. 211–221, 2009.

CARVALHO, G. D. **Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos na região sul do estado do Espírito Santo**. 64f. monografia (Graduação). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, 2005.

COMINETTI, C. *et al.* Estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. v. 36, n. 3, p. 131-151, 2011.

COOMBES, R. C. *et al.* Markers in breast and lung cancer, **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**; v. 19, p. 263-268, 1982.

CRUZ, G. D.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Toxicidade da samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) para a saúde animal e humana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 249-258, 2004.

DAWRA, R. K.; SHARMA, O. P. Enzootic bovine haematuria - past, present and future. **Veterinary Bulletin** 71, R1-R27, 2001.

DAWARA, R.K.; SHARMA, O. P.; SOMVASNSHI, R. Experience with enzootic bovine haematuria in India. In: INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE- BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL, 1999. *Proceedings...* Manchester. **International Bracken Group**, p. 150-154, 1999.

DER, J. P. *et al.* Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041-1049, 2009. doi: 10.3732/ajb.0800333.

DETIVAUD, L. *et al.* Hcpidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels and hepatic function. **Blood**, v. 106 p. 746–748, 2005.

DOBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de hematúria e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 489-504, 1967.

DONOGHUE, S.; BADEN, H. S.; LAUDER, I. *et al.* Immunohistochemical localization of Caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse LargeCell Lymphoma. **Cancer Research**, v. 59, p. 5386-5391, 1999.

DUKERS, D. F.; OUDEJANS, J. J.; VOS, W. *et al.* Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. **The Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 307-315, 2002.

DWORSKI, R. *et al.* Vitamin E prevents NFE2L2 suppression by allergens in asthmatic alveolar macrophages in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 2, p. 516-21, 2011.

EREL, O. A novel direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**. v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004

EVANS I.A. The radiomimetic nature of bracken toxin. **Cancer Research**. v. 28, p. 2252-226, 1968.

FALBO, M. K. *et al.* Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L .) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 547–558, 2005.

FENG, Z. *et al.* Alfa tocopherol is an effective phase II enzyme inducer: protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p. 1222-1231, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-47, 2000.

França T. N., Tokarnia, C. H. e Peixoto, P. V. (2002). Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum*(Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22 n.3, p. 85-96.

GABRIEL, A. L. *et al.* Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais nas formas crônicas de intoxicação espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 7 p. 515-525, 2009.

GARREL, C.; FOWLER, P.A.; AL-GUBORY, K.H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **J Endocrinol.**, v. 205, p.107-116, 2010.

GAVA, A. Intoxicação por plantas de ação antihematopoiética e mutagênica In RIET-CORREA, F. *et al.* **Doenças de ruminantes e equídeos**. 2 ed. UFPel, p.247-258, 1994.

GERLOFF, B. J. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. **Journal of Animal Science**. v. 70 p. 3934-3940. 1992.

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1212-1220, 2007.

GOFF, J.P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1292–1301, 2006.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Clarendon Press**, Oxford. ed 2, 1989.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., **Oxford University Press**: Oxford, 2002; 4 ed., 2007.

HEINONEN, O. P. *et al.* Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta--carotene: incidence and mortality in controlled trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 6, p. 440-446, 1998.

HIRONO, I. *et al.* Carcinogenicity in Rats of Ptaquiloside Isolated from Bracken. 106 **Gann**, v. 75, n. 10, p. 833-836, 1984b.

HIRONO, I. *et al.* Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. **Cancer Letters**, v. 21, n. 3, p. 239-246, 1984.

HIRONO, I.; *et al.* Reproduction of progressive retinal degeneration (bright blindness) in sheep by administration of ptaquiloside contained in bracken. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 6, p. 979-983, 1993.

HOJO-SOUSA, N. S.; CARNEIRO, C. M.; SANTOS, R. C. *Pteridium aquilinum* o que sabemos e o que ainda falta saber. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 5, p. 798- 808, 2010.

HOPKINS, N. C. G. A. Etiology of enzootic haematuria. **The Veterinary Record**, London, v. 118, p. 715-717, 1986.

HYBERTSON, B.M. *et al.* Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of NFE2L2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, p. 234-246, 2011.

IARC, 1998. International Agency for Research on Cancer (IARC)—Summaries & Evaluations. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and some of its constituents. <<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/brackenfern.html>>, disponível em 05-04-2021.

JORDÃO, A. A. JR. *et al.* Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP**. V. 31 p. 434-449. 1998.

KEEN, C. L. E.; GRAHAM, T. W. Trace Elements. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed. Kaneko, JJ, 4 ed., **Academic Press, San Diego**, pp: 757-766, 1989.

KUSS, F. Agentes Oxidantes e Antioxidantes (palestra). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2005.

LANNA NETA, A. T. **Selênio como suplemento para bovinos intoxicados cronicamente por *Pteridium sp.* no Espírito Santo.** 2018. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

LAUZON, K.; ZHAO, X.; LACASSE, P. Deferoxamine reduces tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3486-3857, 2006.

LAWLER, T. L. *et al.* Effect of supranutritional and organically bound selenium on performance carcass characteristics, and selenium distribution in finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1488-1493, 2004.

MANSON, L.; AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84 (Suppl. 1), p. 103, 2000.

MARÇAL, W. S. *et al.* Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Aberdeen Angus. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 77–81, 2002.

MARÇAL, W. S. Samambaia em pasto é veneno. **Folha de Londrina**, Londrina, Folha Rural, n. 718, p. 13, 1990.

MARÇAL, W. S. *et al.* Ocorrência de intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 139- 144, 2001

MARÇAL, W. S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 24, n. 1, p. 197-208, 2003.

MARÇAL, W. S. A toxidez da samambaia nos bovinos. **Saúde animal**; 2000. Disponível em: <Disponível em: http://www.saudeanimal.com.br/bovino_samambaia.htm>. Acesso em: 18 DEZ. 2020.

MAXIE, M. G.; NEWMAN, S. J. Urinary system. In: MAXIE, M.G. JUBB, KENNEDY, and Palmer's Pathology of Domestic Animals 5 ed. Philadelphia: **Saunders Elsevier**; cap. 4, p.425-522, 2007.

McDOWELL, L. R. Minerals in Animal and Human Nutrition. **Academic Press**, Gainesville, Florida, USA. 1992

MEIRELLES, R.L. **Efeitos da suplementação de antioxidantes naturais em tecidos bovinos da raça Brangus.** 2009. 75p. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

MILLER, J. K. *et al.* Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2812-2823, 1993.

MORRISSEY, P. A., SHEEHY, P. J. A., GAYNOR, P. Vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, p. 260-264, 1994.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v. 168, p. 28-40, 2004.

MURRAY, R. K. *et al.* Harper: Bioquímica. 8.ed - São Paulo: **Atheneu**, 1998.

NEMEC, A. *et al.* Total antioxidant capacity (TAC) values and their correlation with individual antioxidants in serum of healthy beagles. *Acta Veterinaria Brno*, v. 69, p. 297- 303, 2000.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Mineral Tolerance of Animals*, second revised ed. **National Academy Press**, Washington, DC, USA, 2005.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, seventh revised ed. **National Academy Press**, Washington, DC, USA. 2001.

NICHOLSON, J.W.G.; LAURENT, A.M.; MC QUEEN, R.E. The effect of feeding organically bound selenium and alfa-tocoferol to dairy cows on the susceptibility of milk to oxidation. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 71, p. 135-143, 1991.

NIERO, L. *et al.* Surto de intoxicação aguda em bovinos pela ingestão de samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná. In: SIMPÓSIO DE ESTAGIÁRIOS DO CCB/UDEL, 9. 1991, **Londrina. Anais...** Londrina: UEL, 1991. p.90

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A.K. Regulation of NFE2L2-an update. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 66, p. 36-44, 2013.

NUMAKAWA, Y.; *et al.* Vitamin E protected cultures cortical neurons forma oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-actived protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Neurochemistry*, v. 97, n. 4, p. 1191-202, 2006.

PAPP, L.V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K.K. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health-Comprehensive Invited Review. *Antioxidant e Redox Signaling*, v. 9, n. 7, p. 776 -806, 2007.

PASCHOAL, J. J; ZANETTI, M. A.; CUNHA, J. A. Suplementação de Se e vitamina E sobre a contagem de células somáticas no leite de vaca da raça Holandesa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 6, p. 2032-2039, 2003.

PEIXOTO, P. V. *et al.* Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 2, p. 65-81, 2003.

PESSOA, G. A. *et al.*; Intoxicação crônica por *Pteridium arachnoideum* em bovinos no nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil*. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 26, n. 1, p. 12-16, jan./mar. 2019.

POLACK, E. W. **Toxicidade da *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn no estado do Paraná: estudo epidemiológico e anátomo-patológico e utilização da técnica de peroxidaseantiperoxidase na pesquisa de papilomavírus em lesões atribuídas à ingestão da planta em bovinos.** 1990, 102 f. dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

POMPEO, A.C.L. *et al.* Câncer de bexiga: diagnóstico. **Revista da associação Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 54, n. 2, Abril 2008.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Capacidade antioxidante total in vivo: comparação de diferentes métodos analíticos. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11/12, p. 1173–1181, 1999 doi:10.1016/s0891-5849(99)00203-8

RAJENDRAN, M. M. P. *et al.* Experimental production of enzootic bovine haematuria with bracken fern. **Indian Veterinary Journal**, n. 60, p. 173-178. 1983.

RIBEIRO, D. S. F.; SOTO-BLANCO, B.. Intoxicação por plantas do gênero *Pteridium* (Dennstaedtiaceae) em animais de produção. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 14, n. 1, p. 90-107, 2020.

RILEY, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 65, n. 1, p. 27-33, 1994.

ROBERT, M; FRIEDLANDER, M. D. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1365-1375, 2003.

RODRIGUES, T. C. T. *et al.* Anemia em pacientes com transtornos alimentares/Anemia in patients with eating disorders. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 11233-11246, 2020

ROSENBERGER, G. Nature, manifestations, cause and control of chronic enzootic haematurian in cattle. **Revue de Medicine Veterinaire**, v. 2, p. 189 206, 1971.

ROVER JÚNIOR, L. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001, doi:10.1590/s0100-40422001000100019

SAMÓRA, T.S.A, **Efeito da suplementação de selênio, vitamina E e óleo de girassol nas respostas imunofisiológicas de vacas Jersey em lactação** (69) dissertação de pós-graduação Instituto de Zootecnia Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável, Nova Odessa – SP, 2014.

SCALETTI, R.W.; AMARAL-PHILLIPS, D.M.; HARMON, R.J. Using nutrition to improve immunity against disease in dairy cattle: copper, zinc, selenium, and vitamin E. **Cooperative extension service, University of Kentucky**, 1999.

SCHOTT, H.C.; METRE, D.C; DIVERS, T.J. Diseases of the renal system. In: SMITH, B.P. *Large animal medicine*. 3rd ed. **Philadelphia: Mosby**, cap. 32p. 862-863, 2002.

SCHWARTSBURD, P.B., MORAES, P.L.R. & LOPES-MATTOS, K.L.B. Recognition of two morpho-types in eastern South American brackens (*Pteridium*–Dennstaedtiaceae–Polypodiopsida). **Phytotaxa**, v. 170, n. 2, p. 103–117, 2014.

SCHWARTSBURD, P.B. *et al.* Prodrômus of a fern flora for Bolivia. XXVI. Dennstaedtiaceae. **Phytotaxa**. v. 332, n. 3, p. 251–268, 2017, <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.332.3.2>

SOCHOR, J. *et al.* Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8618-8640, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15128618>

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Review. European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213- 219, 1993.

SILVA, M. A. DA *et al.* Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1847–1850, 2009.

SMITS, E.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 259-69, 1997.

SOUTO M.A.M., *et al.* Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 2, p. 112-122, 2006.

SRINIVAS, P. R.; KRAMER, B. S, SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **The lancet oncology**. v. 2, n. 11, p. 698-704, 2001.

STAGSTED, J. *et al.* Dietary supplementation with organic selenium (Sel-Plex®) alters oxidation in raw and pasteurised milk. **Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium**, p. 249-257, 2005.

SURAI, P. F. Selenium in Nutrition and Health, ed. by PF Surai. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 974 p. 2006.

TAYLOR, J. A. The Bracken problem: a global perspective. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Eds). Bracken control and management. Sydney: **Australian Institute of Agricultural Science**, p. 3-19, 1989.

THOMSON, J. A. New perspectives on taxonomic relationships in *Pteridium*. Bracken fern: toxicity, biology and control. **Proc. of the International Bracken Group Conference**. Manchester, 1999. Ed. J A Taylor and R T Smith, pp: 15-34, 2000.

THOMSON, J. A.; MICKEL, J. T.; MEHLTRETER, K. Taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) of Laurasian affinity in Central and North America. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 157, n.1, p. 1-17, 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00791.x>

THOMSON, J. A. Taxonomic status of diploid southern hemisphere brackens (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae). **Telopea**, v. 14, p. 43–48, 2012. <https://doi.org/10.7751/telopea2012007>

THORBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: **Enemies within**. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 1998

TOKARNIA, C. H. *et al.* **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Helianthus. 2012. 566p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de hematuria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. II Estudos complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 4, p. 209-224, 1969.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER J.; PEIXOTO P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus; 2000.310p.

LANNA NETA, ALDA T. **Selênio como suplemento para bovinos intoxicados cronicamente por *Pteridium* sp. no Espírito Santo**. 41p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

VOUSDEN, K.H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p. 594-604.2002.

WEISS, W.P., WYATT, D.J. Effects of feeding diets based on silage from corn hybrids that differed in concentration and in vitro digestibility of neutral detergent fiber to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, n. 85, p. 3462–3469. 2002.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Products Report**, New York, v. 24, n. 4, p. 798-813, 2007. doi:10.1039/B614160A.

YANEZ, A.; MARQUEZ, G.J.; MORBELLI, M.A. Palynological analysis of Dennstaedtiaceae taxa from the paranaense phytogeographic province that produce trilete spores II: *Microlepia speluncae* and *Pteridium arachnoideum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.88, n.2, p.877- 890, 2016. doi: 10.1590/0001- 3765201620150230.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZEOULA, L. M.; GERON, L. J. V. Vitaminas. In: BERCHIELLI, T. T.; *et al.* (Eds). **Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal**: FUNEP, 583 p, 2006.

ZHUO, P. E.; DIAMOND, A. M. Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1790, n. 11, p. 1546– 554, 2009. Doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.004.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO DO USO ANIMAL

Eu, _____, estou permitindo a participação do(s) meu(s) animal(is) no estudo denominado “**Detecção de ptaquilosideo em samambaia (*Pteridium aquilinum*) de diferentes regiões do Espírito Santo e eficácia terapêutica de selênio associado a vitamina E em animais intoxicados cronicamente pela planta**”, que busca obter informações sobre a doença na região e encontra-se devidamente aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UFES.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: realização gratuita de exames e indicações para resolução do problema.

Estou ciente de que o(s) meu(s) animal(is) será(ão) atendido(s), respeitado(s) e receberá(ão) os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa. Também estou ciente de que qualquer procedimento envolve riscos, mas que, na medida do possível, estes serão minimizados.

Também fui informado de que posso recusar a participação do(s) meu(s) animal(is) no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, por desejar sair da pesquisa, havendo a necessidade apenas de comunicação prévia com a Equipe de Pesquisa para realização de uma coleta de material para a finalização do estudo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são os professores Dra. Louisiane de Carvalho Nunes, Dr. Rafael Otaviano do Rego, Dr. José Carvalho de Oliveira Neto, o médico veterinário Eduardo Vargas de Oliveira, bem como estudantes de iniciação científica do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo (Renata de Paula Santos, Marcos Paulo Brinati Miranda, Caio Alves Cardoso) e com eles poderei manter contato pelos telefones: (28) 98804-5235 e (28) 99935-2068, ou no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (28) 3552-8797.

É assegurada à assistência dos animais envolvidos no projeto, durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que

eu queira saber antes, durante e depois da participação da pesquisa com o(s) meu(s) animal(is).

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do mesmo, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação do(s) meu(s) animal(is).

_____, _____, _____, 2019.

LOCAL E DATA

Assinatura do proprietário ou responsável da propriedade

Louisiane de Carvalho Nunes
Coordenadora do projeto (CRMV/ES 0799)

Anexo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação de ptaquilosídeo e eficácia da suplementação com selênio em animais intoxicados cronicamente por *Pteridium aquilinum* no Espírito Santo ", Protocolo nº.03/2017, sob a responsabilidade de Louisiane de Carvalho Nunes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 07-07-2017.

Vigência do Projeto	Início: Julho/2017 Término:Junho/2020
Espécie/Linhagem	Bovinos(<i>Bos taurus</i>) Rattus norvegicus(<i>Wistar</i>)
Nº de Animais	Experimento Piloto:NA Protocolo Experimental:16 bovinos/50 ratos Total:66
Peso/Idade	Peso: Bovinos(400kg) Ratos(200g) Idade:NA
Sexo	Ambos

Vitória (ES), 07 de julho de 2017.



Dr. Roger Lyrio dos Santos
SAPE 2531318
Câmbios Fisiológicos/CCSAUFES



Universidade Federal
do Espírito Santo

CERTIFICADO



Certificamos que a proposta intitulada "*Detecção de ptaquilosídeo em samambaia (Pteridium sp.) de diferentes regiões do Espírito Santo e eficácia terapêutica de selênio associado a vitamina E em animais intoxicados*" Registrada sob o n.º 025/2020, sob a responsabilidade da **Dr.ª Louisiane de Carvalho Nunes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - Campus de Alegre (CEUA-Alegre) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Vigência da autorização: 04/2021 a 04/2026 **Finalidade: Pesquisa científica**
Espécie(s): Rattus norvegicus e Bos taurus.

Origem: Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e propriedades rurais do município de Ibitirama e Divino São Lourenço, Espírito Santo.

Alegre, 25 de março de 2021.



Prof.ª Dra. Carla Braga Martins - Coordenadora da CEUA - ALEGRE

Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre – CEUA-ALEGRE
Alto Universitário, s/n – Guararema – Alegre, ES, Brasil – CEP 29600-000 - Telefone: 028 3552 8900 - ceua.alegre@gmail.com - www.alegre.ufes.br

Anexo 3

BULA FOSFOSAL

DESCRIÇÃO

FOSFOSAL® é indicado no tratamento de deficiências de fósforo, selênio, magnésio, cobre e potássio e suas consequências tais como: osteomalácia, raquitismo, síndrome da infertilidade carencial, distrofia muscular, retenção placentária, desordens nervosas, tetania hipomagnesêmica.

FÓRMULA:

Cada 100 mL contém

Glicerofosfato de sódio 5.5H ₂ O.....	14g
Fosfato monossódico 2H ₂ O.....	20,1g
Cloreto de cobre 2H ₂ O.....	0,4g
Cloreto de potássio.....	0,6g
Cloreto de magnésio.....	2,5g
Selenito de sódio.....	0,24g

VIA DE ADMINISTRAÇÃO E MODO DE USO:

FOSFOSAL® deve ser administrado em dose única pelas vias subcutânea ou intramuscular (preferencialmente intramuscular), nas doses:

Bovinos adultos..... 10mL

Bezerros.....5mL

Suínos.....5mL

VALIDADE

3 (três) anos à partir da data de fabricação.

A UTILIZAÇÃO DO PRODUTO EM CONDIÇÕES DIFERENTES DAS INDICADAS NESTA BULA PODE CAUSAR A PRESENÇA DE RESÍDUOS DO PRODUTO ACIMA DOS LIMITES APROVADOS, TORNANDO O ALIMENTO DE ORIGEM ANIMAL IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO.

APRESENTAÇÃO:

Frasco contendo 500mL

PROPRIETÁRIO E FABRICANTE

VIRBAC URUGUAY S.A.

Av. Millán, 4175

Montevideu – Uruguai

REPRESENTANTE EXCLUSIVO NO BRASIL, IMPORTADOR E DISTRIBUIDOR

VIRBAR DO BRASIL IND. E COM. LTDA

Rua Edgar Marchiori, 255, 13280-000

Vinhedo – SP – CNPJ: 56.921.166/0007-90

Registro MAPA nº SP 000226-7

Licenciado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sob o nº 8.882 em 27/05/2004

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Marcio Dentello Lustoza

CRMV/SP 13.541