



PADRONIZAÇÃO DA COLETA, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO BOVINO

*Diego Dantas¹, Maria Eduarda Torrejais da Silva², Júlia Beatriz Costa De Oliveira³,
Isabele Picada Emanuelli⁴*

¹Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar. diegodantas98@gmail.com

²Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. dudatorrejais@gmail.com

³Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista Fundação Araucária. jubia.oliveira15@gmail.com

⁴Orientadora, Docente no Curso de Medicina, Medicina Veterinária e no Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas da UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br

RESUMO

Este projeto tem como objetivo estabelecer e validar protocolos de coleta, processamento e caracterização do líquido cefalorraquidiano (LCR) bovino obtido em abatedouros sob inspeção oficial, com foco em sua aplicação como suplemento alternativo em culturas celulares in vitro. Considerando as limitações do soro fetal bovino (SFB), como variações entre lotes, composição indefinida e aspectos éticos, o LCR surge como uma alternativa viável por apresentar composição bioquímica estável, baixo teor lipídico e presença de eletrólitos, proteínas e vitaminas. A coleta será realizada durante a evisceração em fêmeas bovinas abatidas para consumo, com acesso à cisterna magna. Após assepsia, será feita punção com agulha estéril e coleta de 3 a 5 mL de LCR por animal, sendo descartadas amostras com contaminação sanguínea visível. O material será transportado sob refrigeração (4–8 °C) e processado em até duas horas no Laboratório BIOCELGEN (UNICESUMAR). As amostras serão alíquotadas em capela de fluxo laminar e submetidas às seguintes análises bioquímicas: proteínas totais (método de Biureto), lipídeos totais (sulfato de cobre), glicose (enzimático colorimétrico), ureia (Berthelot) e eletrólitos (Na⁺, K⁺, Cl⁻) por potenciometria com eletrodos íon-seletivos. Também serão registrados dados sobre tempo de punção, facilidade técnica e contaminações, com o objetivo de padronizar um protocolo reprodutível e aplicável à rotina de coleta em abatedouros. As análises serão realizadas em triplicata, e os dados submetidos à análise estatística descritiva e inferencial. Espera-se estabelecer um protocolo eficaz e reprodutível para coleta e processamento do LCR bovino, com padrões adequados de higiene, estabilidade e integridade bioquímica.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura celular; Líquido cefalorraquidiano; Soro fetal bovino.

1 INTRODUÇÃO

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido biológico que desempenha papel importante no funcionamento do sistema nervoso central, atuando na proteção física e na regulação do ambiente químico dos neurônios e da neuroglia (REECE et al., 2017). Localizado no espaço subaracnoide e nos ventrículos encefálicos, o LCR é composto majoritariamente por água (aproximadamente 99%) e contém solutos como íons, glicose, proteínas e vitaminas, que contribuem para a manutenção da homeostase neural (FRANDSON et al., 2005; REECE et al., 2017).

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido biológico que exerce funções importantes no sistema nervoso central, como proteção física e regulação do ambiente químico ao redor dos neurônios e da neuroglia (REECE et al., 2017). Localizado no espaço subaracnoide e nos ventrículos encefálicos, o LCR é composto predominantemente por água (aproximadamente 99%) e contém solutos como íons, glicose, proteínas e vitaminas, essenciais para a manutenção da homeostase neural (FRANDSON et al., 2005; REECE et al., 2017).



Diante das limitações associadas ao uso do soro fetal bovino (SFB) em culturas celulares, como variações entre lotes, composição indefinida e aspectos éticos, o LCR tem sido considerado uma alternativa com potencial para compor meios de cultivo. Sua composição, que inclui eletrólitos, proteínas solúveis, glicose e vitaminas, além de menor concentração de lipídios, pode favorecer um microambiente mais controlado para o crescimento celular (ZAPPULLA et al., 2015; GUDI et al., 2019).

Embora alguns estudos com LCR humano tenham demonstrado efeitos positivos sobre a viabilidade e diferenciação celular, o uso do LCR bovino em culturas ainda é pouco explorado, principalmente pela ausência de protocolos específicos para coleta e análise. Também há poucos dados sobre a estabilidade do fluido, a influência das condições de armazenamento e sua compatibilidade com diferentes linhagens celulares (BURMAN et al., 2019). Outro ponto importante, mas pouco abordado, é o tempo entre a coleta e o uso, que pode impactar diretamente a integridade dos componentes bioquímicos.

Diante desse cenário, torna-se necessário desenvolver e validar protocolos de coleta asséptica, processamento e caracterização do LCR bovino com foco em sua possível aplicação como suplemento em culturas celulares in vitro. Além de ser uma alternativa ao SFB, essa proposta pode contribuir para o aproveitamento de subprodutos animais e para o desenvolvimento de práticas mais alinhadas com princípios éticos e laboratoriais (VAN DER VALK et al., 2018).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo será realizado em duas etapas complementares: a coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) bovino será realizada em um abatedouro sob inspeção oficial (SIF ou SIE) localizado na região norte do Paraná, enquanto o processamento e as análises laboratoriais ocorrerão no BIOCELGEN na fazenda da UNICESUMR.

Serão selecionadas carcaças de fêmeas bovinas com idade entre 2 e 7 anos, abatidas para consumo comercial. A coleta será realizada durante a fase de evisceração, com acesso à cisterna magna. Após assepsia da região cervical posterior com álcool 70%, será feita uma incisão cutânea e, em seguida, a punção será realizada utilizando agulha estéril (40 × 12 mm) acoplada a seringa de 10 mL. Serão coletados de 3 a 5 mL de LCR por animal. Amostras com contaminação sanguínea visível serão descartadas. O fluido será imediatamente transferido para microtubos estéreis e mantido sob refrigeração (4–8 °C), sendo processado no laboratório no período máximo de até 2 horas após a coleta.

Durante a coleta, serão registradas informações sobre o tempo de punção, facilidade de acesso à cisterna magna e incidência de contaminação. A partir desses dados, será elaborado um protocolo técnico padronizado, considerando os aspectos operacionais que garantam a assepsia, segurança do material e viabilidade bioquímica do fluido. O protocolo resultante deverá ser reproduzível e adequado para uso em ambientes de coleta controlada como abatedouros sob inspeção.

As amostras serão processadas em capela de fluxo laminar, onde serão aliqüotadas para análises imediatas e armazenamento posterior a -20 °C. As análises bioquímicas incluirão:

- Proteínas totais – método do Biureto;
- Lipídeos totais – método do sulfato de cobre;
- Glicose – método enzimático colorimétrico;
- Ureia – método de Berthelot;
- Eletrólitos (Na⁺, K⁺, Cl⁻) – determinados por potenciometria com eletrodos íon-seletivos.

Todas as análises serão realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mg/dL ou mmol/L, conforme o parâmetro avaliado.



Será realizada análise estatística descritiva para sumarização dos dados obtidos e avaliação da variabilidade entre amostras de diferentes animais. A normalidade será verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Quando os pressupostos de normalidade não forem atendidos, serão utilizados testes não paramétricos, como o de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado será de 5% ($p < 0,05$).

Durante a realização das coletas, serão registradas informações técnicas relacionadas à execução do procedimento, incluindo tempo médio de punção, facilidade de acesso à cisterna magna, volume coletado, frequência de contaminação visível por sangue e tempo decorrido até o início do processamento. Esses dados serão utilizados para estruturar um protocolo técnico padronizado, com o objetivo de garantir a segurança microbiológica da amostra, a integridade dos parâmetros bioquímicos e a reprodutibilidade entre diferentes lotes.

A padronização envolverá critérios como tipo e calibre da agulha, volume ideal por coleta, tempo máximo entre coleta e processamento, descarte de amostras com contaminação macroscópica e condições adequadas de transporte e armazenamento. O protocolo será construído com base na experiência prática acumulada ao longo do estudo, em alinhamento com as boas práticas laboratoriais, e validado quanto à sua aplicabilidade em ambientes controlados como abatedouros sob inspeção oficial.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se estabelecer um protocolo eficaz e reprodutível para coleta e processamento do LCR bovino, com padrões adequados de higiene, estabilidade e integridade bioquímica. As análises devem revelar uma composição compatível com o uso em culturas celulares, especialmente quanto à baixa concentração lipídica e perfil eletrolítico estável. A identificação de possíveis variações entre animais contribuirá para estratégias futuras de padronização e controle de qualidade do fluido.

REFERÊNCIAS

BRAUN, U.; ATTIGER, F.; BRAMMERTZ, C. Ultrasonographic examination of the spinal cord and collection of cerebrospinal fluid from the atlanto-occipital space in cattle. **Veterinary Record**, v. 176, n. 4, p. 92, 2015.

BURMAN, J. et al. Collection and preparation of cerebrospinal fluid for biomarker research. **Methods in Molecular Biology**, v. 2044, p. 63–77, 2019.

CUNHA, P. H. J. et al. Parâmetros citológicos e bioquímicos do líquido cefalorraquidiano coletado de bovinos sadios em dois momentos, com intervalo de 96 horas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1393–1397, nov./dez. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/pwQyXcfJrY9yhjbGCs3kKMq/>. Acesso em: 17 maio 2025.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6. ed. São Paulo: Roca, p. 119-147, 2005.

GSTRANDHALER, G. et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. **ALTEX**, v. 36, n. 1, p. 99–118, 2019.



GUDI, V. et al. Cerebrospinal fluid from patients with neurodegenerative disorders triggers cell death in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 15185, 2019.

REECE, W. O. et al. **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 25-192. 2017.

VAN DER VALK, J. et al. Fetal bovine serum (FBS): past – present – future. **ALTEX**, v. 35, n. 1, p. 99–118, 2018.

WHITTY, A. L. et al. GM-CSF treatment of frozen bovine sperm improves function, fertilization, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 235, p. 46–55, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.11.012>. Acesso em: 17 maio 2025.

ZAPPULLA, D. et al. Biochemical characterization of mammalian cerebrospinal fluid. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, e0126473, 2015