

DOUGLAS CORREIA DE SOUZA

***Caenorhabditis elegans* COMO BIOINDICADOR DO POTENCIAL NEMATOCIDA
DO LEITE CAPRINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jackson Victor de Araújo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S729c
2021 Souza, Douglas Correia de, 1990-
Caenorhabditis elegans como biondicador do potencial
nematicida do leite caprino / Douglas Correia de Souza. - Viçosa, MG,
2021.

42 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Caprinos. 2. Leite de cabra. 3. Nematicidas. 4. *Caenorhabditis elegans*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.39

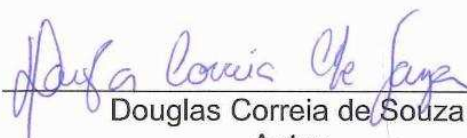
DOUGLAS CORREIA DE SOUZA

***Caenorhabditis elegans* COMO BIOINDICADOR DO POTENCIAL NEMATICIDA
DO LEITE CAPRINO**

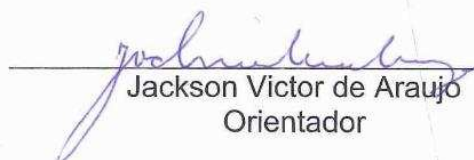
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2021.

Assentimento:



Douglas Correia de Souza
Autor



Jackson Victor de Araujo
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Medicina Veterinária pela infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador Professor Jackson Victor de Araújo pelos ensinamentos, liberdade, orientação e pela oportunidade de novos desafios a cada etapa;

À Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira por toda ajuda, ensinamentos e contribuições com meu trabalho;

Aos colegas de laboratório, por toda troca de conhecimentos, companhia e ajuda, em especial à Iderlaine e ao Vinicius;

Aos meus amigos por todo carinho, em especial ao Luiz;

Ao Eder pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

*“ Take a leap of faith. You will either land somewhere
new or learn to fly. ”*
(Kandyse McClur)

RESUMO

CORREIA, Douglas de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. ***Caenorhabditis elegans* como bioindicador do potencial nematicida do leite caprino**. Orientador: Jackson Victor de Araújo.

O nematoide *Caenorhabditis elegans* é um organismo modelo estabelecido que pode ser utilizado para evidenciar inúmeros processos biológicos. Pesquisas que utilizam leite de ruminantes como agentes antipatogênicos tem tido destaque nos últimos anos, em especial o leite caprino. Dentre essas atividades antipatogênicas, o potencial antihelmíntico do leite pode ser uma ferramenta utilizada para controle biológico de enteroparasitoses. Alguns trabalhos têm demonstrado que o leite de alguns ruminantes possui atividade anti-helmíntica capaz de gerar uma resposta considerável quando utilizado como um vermífugo natural. Dessa forma, o intuito desse trabalho foi avaliar a capacidade do leite de cabras causarem mortalidade em *C. elegans*. Esses animais foram agrupados de acordo com sua idade e raça. Também foram avaliados em correlação níveis de células somáticas e contagem bacteriana: indicadores normalmente utilizados como controle de qualidade do leite. Para isso, foram coletadas amostras de 110 cabras Saanen, Alpina e sem raça definida. O verme foi exposto por submersão ao leite cru, fresco e na concentração de 50% em solução tamponada para o nematoide. Houve grande variância na capacidade nematicida do leite desses animais, com mortalidade média de 74% em vermes expostos por 24 horas, 90% em 48 horas e chegando a 95% em 96 horas. Neste estudo, 3% das cabras não apresentaram leite com atividade nematicidade significativa, alcançando mortalidade similares com o controle negativo. O nematoide *C. elegans* se mostrou uma boa ferramenta para avaliação dessa nematicidade do leite caprino e a possibilidade de ser utilizado para avaliar o leite de outros ruminantes e outros compostos na pesquisa de anti-helmínticos. A mortalidade do verme desafiado ao leite não evidenciou correlações com idade, raça e com os marcadores testados, indicando que o potencial nematicida pode se conservar apesar de taxas altas nos níveis de células somáticas (SCC) e contagem bacteriana total (TBC).

Palavras-chave: *C. elegans*. Nematicidade. Leite Caprino.

ABSTRACT

CORREIA, Douglas de Souza M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2021. ***Caenorhabditis elegans* as a bioindicator of the nematicidal potential of goat milk.** Adviser: Jackson Victor de Araujo

The nematode *Caenorhabditis elegans* is an established model that can be used to highlight biological processes. Research using ruminant milk as antipathogenic agents has been highlighted in recent years, especially goat milk. Among these antipathogenic activities, the anthelmintic potential of milk can be a tool to use for biological control of enteroparasitoses. Some works have cured that the milk of some ruminants has anthelmintic activity capable of generating a response when used as a natural vermifuge. Thus, the aim of this work was to evaluate the ability of goat's milk to cause mortality in *C. elegans*. These animals were grouped according to their age and race. They were also evaluated for somatic cell correlation and bacterial count: indicators normally used as milk quality control. For this, 110 Saanen, Alpine and mixed breed goats were collected. The worm was exposed by submersion to raw, fresh milk and in a concentration of 50% in buffered solution for the nematode. There was great variance in the nematicidal capacity of animal milk, with an average mortality of 74% in worms exposed for 24 hours, 90% in 48 hours and reaching 95% in 96 hours. In this study, 3% of goats did not dissipate milk with nematicity activity, achieving similar mortality with the negative control. The nematode *C. elegans* proved to be a good tool for evaluating this nematicity of goat's milk and the possibility of being used to evaluate the milk of other ruminants and other compounds in the research of anthelmintics. The mortality of the worm challenged did not show correlations with age, race and with the tested milk markers, indicating that the nematicidal potential can be conserved despite high rates in somatic cell levels (SCC) and total bacterial count (TBC).

Keywords: *C. elegans*. Nematicide. Goat milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>C. elegans</i> exposed in goat milk for 24hours.....	29
Figura 2- Distribution of goat milk mortality in <i>C. elegans</i>	30
Figura 3- Effect of goat milk on <i>C. elegans</i> , classify by age.	31
Figura 4- Effect of goat milk on <i>C. elegans</i> classify by breed.....	31
Figura 5- Effect of goat milk on <i>C. elegans</i> classify by CFU/ml.....	31
Figura 6- Effect of goat milk on <i>C. elegans</i> classify by SC/ml.....	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI - Brain Heart Infusion

BLAST - Ferramenta de Pesquisa Básica de Alinhamento Local

BMP - Bioactive Milk Products (Produtos Bioativos do Leite)

CFU – Unidades formadoras de colônia

CGC - Caenorhabditis Genetics Center

CTS - Ciência, Tecnologia e Sociedade

ICTQ - Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade

MRA - Multi-drug Resistant Agents (Agentes multi-resistente a drogas)

NGM - Nematode Growth Medium

NSDT – Nematode Scient Detection Test (Teste de detecção de odor com nematóides)

PPM - Partes por milhão

SAL - Students Approaches to Learning (Abordagem dos alunos à aprendizagem)

SCC - Somatic Cell Count (Contagem de células somáticas)

TBC - Total Bacteria Count (Contagem total de bactérias)

UHT - Ultra-High-Temperature Processin (Ultrapasteurização).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. <i>C. elegans</i> como modelo alternativo na experimentação animal	12
2.2. Caprinocultura e seus desafios	21
3. <i>IN VIVO</i> NEMATOCIDAL POTENTIAL OF GOAT MILK ON <i>Caenorhabditis elegans</i> AND THEIR ASSOCIATION WITH MASTITIS MARKERS	24
3.1. Abstract	24
3.2. Introduciton	24
3.3. Material and Methods	27
3.4. Results and Discussion	28
3.5. Conclusions	32
3.6. References	33
4. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O nematóide *Caenorhabditis elegans* é um poderoso organismo experimental que por quase meio século é utilizado como um modelo para estudar uma ampla gama de fenômenos biológicos. Consequentemente, há grandes quantidades de dados genotípicos e fenotípicos disponíveis para os investigadores. *C. elegans* é um nematóide de vida livre encontrado no solo e em matéria orgânica. É particularmente econômico e fácil de manter em condições laboratoriais. Adultos *C. elegans* são em sua maioria hermafroditas autofecundados de 1 mm de comprimento com ciclo reprodutivo de 2,5 a 4 dias, em temperatura ambiente, e vida média de aproximadamente 20 dias quando cultivados a 20 °C. Tendo-se em conta que o verme possui mudanças fisiológicas semelhantes à mamíferos. Essas mudanças são dependentes da idade, do contato com microrganismos e compostos ativos nos níveis tecidual, celular e molecular. Tais fatores tornam *C. elegans* um modelo valioso para pesquisa no campo do envelhecimento, da pesquisa com bactérias, fungos e vírus e na busca de princípios ativos (Brenner, et al, 1974; Moreno-Arriola, et al, 2014; Alexander, et al, 2014). Outro ponto de destaque do nematoide é seu potencial uso como ferramenta de ensino e de diagnóstico humano, animal e ambiental. O uso do nematoide como plataforma pode ser inserido dentro do conceito OneHealth.

O conceito OneHealth é definido pelos estudos que correlacionem a relação entre a saúde humana, animal e do ambiente que coabitam. Estudos focados na área das resistências a multidrogas têm grande destaque dentro do conceito. Dentro todo o espectro do OneHealth, estudos que buscam soluções aplicáveis para o problema com agentes resistentes a multidrogas tem destaque. As utilizações de compostos naturais têm grande impacto e têm se mostrado bastante promissores. O leite de ruminantes tem sido pesquisado como um poderoso agente antipatogênico. Já foi descrito como antimicrobiano, antihelmíntico, antifúngico, antitrombótico, antihipertensivo, imunomodulador, antioxidante e anti-inflamatório. A reputação do uso de alimentos como agente antipatogênico está crescendo em todo o mundo e estão se tornando parte da dieta diária de consumidores que se preocupam com o uso excessivo de drogas clássicas. Ademais, importante informar que o potencial desse mercado global foi estimado em US \$ 192 bilhões até 2020 (Kaur, 2017). Entretanto, a eficácia do uso desses produtos na prevenção e tratamento de doenças depende da estimativa de estabilidade do composto, da bioatividade e

biodisponibilidade dos princípios ativos. Compostos ativos são encontrados virtualmente em todas as categorias de alimentos. Não obstante, alguns produtos não estão amplamente disponíveis no mercado (Siro, 2008). Há uma grande quantidade de literatura descritiva de estudos de compostos bioativos em *C. elegans* cuja principal proposta é os utilizar como anti-helmínticos. O termo farmacologia genética descreve a abordagem de utilizar outras espécies para averiguar a capacidade de um medicamento em provocar mudanças significativas, idealmente quantificáveis, em uma outra espécie (Rand e Johnson, 1995). Para a grande maioria dos experimentos, os anti-helmínticos são aplicados no *C. elegans* vivo e intacto. Existe, portanto, duas maneiras pelas quais a droga pode ter acesso aos tecidos-alvo, por ingestão ou por difusão através da cutícula. A esse respeito, deve-se notar que, para muitos fármacos, a cutícula apresenta uma barreira de permeabilidade significativa. Então, a lipofilicidade das drogas tem uma forte influência na concentração que é alcançada nos tecidos-alvo após sua introdução (Burns and Roy, 2012).

C. elegans é uma ótima ferramenta para testar como drogas e compostos bioativos afetam sua viabilidade e movimento, indicando os efeitos de toxinas em seu comportamento e ciclo de vida. Animais transgênicos auxiliam a decifrar o papel dos genes individuais na produção de uma resposta comportamental específica quando desafiados. Atualmente existe a capacidade de rastrear milhares moléculas e compostos com alta eficácia utilizando *C. elegans* (Swierczek, et al, 2011; Lamprecht et al, 2007; Schwendeman, et al, 2016). Esse nematoide tem sido uma fonte ininterrupta de inovações científicas. A medida em que essas inovações se tornam aplicáveis, aumenta cada vez mais o sucesso do *C. elegans* como ferramenta de pesquisa aplicável ao ensino e extensão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *C. elegans* como modelo alternativo na experimentação animal

Caenorhabditis elegans é um nematóide, animal vermiforme terrestre de vida livre componente da família Rhabditidae. Descrito pela primeira vez por Maupas em 1900, tornou-se o modelo biológico utilizado por Sydney Brenner a partir de 1966. Este nematóide tem sido utilizado principalmente em estudos genéticos, com o término da descrição de seu genoma em 1998. Em 2002, Brenner e colaboradores receberam o Prêmio Nobel pela identificação dos genes de desenvolvimento de órgãos e a programação da morte celular utilizando *C. elegans* (Brenner 1988; Corsi et al, 2015). É um bacteriófago, nematóides que utilizam células bacterianas como principal recurso alimentar e possui ciclo de vida curto. É cultivado sob condições laboratoriais em placas de petri contendo meios de cultura simples e alimentados geralmente com *Escherichia coli*, o que torna sua manipulação fácil e de baixo custo. Uma nova geração desenvolve-se em 3 dias em meio a 20 °C, e cada adulto produz cerca de 300 descendentes. Devido a essas características, *Caenorhabditis elegans* é o animal mais utilizado como plataforma para estudos de biologia do desenvolvimento e genética. Também é utilizado em grande escala em estudos sobre envelhecimento e ensaios toxicológicos (Corsi et al, 2015).

A embriogênese em *C. elegans* leva em média 16 horas. Nesse período, o ovo é formado após a fecundação e possui uma casca praticamente impermeável, fazendo com que o embrião se desenvolva completamente isolado de seu progenitor. Os ovos levam cerca de 9 horas para eclodirem em larvas, caso não exista alimento no meio, as larvas podem se manter nesse estágio por até dois dias. O hermafrodita grávido expelle os ovos, os quais, após a eclosão, se desenvolvem através de quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), até chegar à fase adulta. Na ausência de alimento, a larva entra em uma forma mais resistente e não obrigatória, passando do estágio L2 para a forma Dauer. Esta larva é do comprimento de uma larva L3, porém mais delgada. Este estágio é mais resistente a condições, como dessecação, a própria falta de alimento e substâncias de caráter agressivo (Cassada, 1975).

Este animal possui diversas particularidades que o tornam ideal para inúmeros tipos de estudo: possui um ciclo de vida curto com média de 15 dias, dispõe dimensões reduzidas medindo cerca de 1 milímetro de comprimento quando adulto e um genoma

pequeno. O nematóide *C. elegans* é um excelente modelo biológico para o estudo da genética e desenvolvimento animal, pois ele, como plataforma de experimentação, possui a combinação de uma manutenção simples e de baixo custo com a viabilidade de se realizar ensaios de grande complexidade, fato que o tornou bastante conhecido. O nematóide apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, uma vez que é um organismo multicelular. Isso permite que a ação de compostos ou a associação do verme com bactérias e outros micro-organismos possa ser avaliada de forma sistêmica ou focada em determinado órgão. Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo têm custos reduzidos, quando comparados com testes em camundongos ou outros modelos mamíferos. Isto se deve principalmente ao fato de que, no caso do *C. elegans*, a oferta de animais não é um limitante, já que eles crescem rapidamente em um sistema simples. Dessa forma podem ser gerados milhares de animais em alguns poucos dias (Hunt, 2017; Nigon, 2017).

Seu sistema nervoso é capaz de distinguir cheiro, gosto, temperatura, toque e, mesmo não possuindo olhos, responde à luz. Os hermafroditas desenvolvidos até a fase adulta possuem 959 células somáticas enquanto os machos adultos possuem 1031 células, todas conhecidas em número e posição. Os machos possuem 383 células nervosas, com 89 sexo-específicas, e os hermafroditas 302 células nervosas. O nematóide possui glândulas sensoriais na cabeça e cauda, já que a quimiorrecepção é uma das formas de analisar sua resposta diante de xenobióticos, como metais tóxicos e fármacos (Colle et al, 2004). Sua morfologia simples, aliada ao fato do verme ser transparente quando observado sob microscopia óptica, permite a compreensão e visualização do desenvolvimento do organismo ao longo de todas as fases do seu ciclo de vida, de forma ser possível acompanhar todos os acontecimentos celulares durante a embriogênese, desde o desenvolvimento a partir de um único ovo até a fase adulta.

O nematóide apresenta inúmeras características que o tornam excelentes organismos bioindicadores (ou seja, capazes de indicar de forma observável, alterações ou morte do animal devido a introdução de substâncias externas), *Caenorhabditis elegans* possuem propriedades comuns a todos os nematóides. Como a divisão, reprodução, desenvolvimento de células, eutelia (ou seja, uma constância no número de células na espécie) e simplicidade de organização de tecidos. Constituem um modelo biológico bastante utilizado em muitos estudos de comportamento, envelhecimento,

ecotoxicológicos e genéticos. Este verme é utilizado também como modelo para o estudo dos nematóides fitoparasitas e para determinar a presença de contaminantes tóxicos no meio aquático e terrestre (Hunt, 2017).

Hirotsu e colaboradores (2015) desenvolveram uma nova técnica para rastreamentos oncológicos, chamada Nematode Scent Detection Test (NSDT), que aproveita o bom olfato do *C. elegans* para detectar o odor de toxinas do metabolismo de células cancerígenas em amostras de urina humana. A metodologia exibiu sensibilidade de 95,8% e especificidade de 95,0% em 242 amostras de urina de 10 tipos de câncer testados, incluindo os de estágios iniciais. Anbalagan e colaboradores desenvolveram em 2012 uma plataforma para utilizar o nematóide como biosensor para detecção de metais tóxicos, utilizando cepas portadoras de indicadores transgênicos de proteína verde fluorescente como sensores. Os nematóides foram usados para explorar padrões de resposta a metais tóxicos em água.

O nematóide *C. elegans* possui de forma geral, ortólogos para 42% dos genes relacionados a doenças humanas (Culetto & Sattelle, 2000). Assim, esse nematóide possui genes que, em humanos e outros mamíferos, implicam em doenças neurodegenerativas. Em outros casos, quando um ortólogo do gene potencialmente envolvido em alguma doença relacionada a mamíferos não está presente em *C. elegans*, construções transgênicas permitem que os mecanismos envolvidos na citotoxicidade desses genes possam ser facilmente estudados. Em 2010 foram descritas a existência de modelos *C. elegans*, transgênicos ou não, para doenças neurodegenerativas como as doenças poliglutamínicas, entre elas a Doença de Huntington, o Mal de Alzheimer, o Mal de Parkinson, a Esclerose Lateral Amiotrófica e a Atrofia Muscular Espinhal. Esses modelos de doenças neurodegenerativas em *C. elegans*, como o da Doença de Huntington pode ser utilizado para testar possíveis efeitos neuroprotetores, uma vez que é possível visualizar no próprio nematóide a resposta perante fármacos e substâncias com potenciais benefícios no tratamento destas doenças. Ferreira e colaboradores demonstraram que extrato de guaraná (*Paullinia cupana*), por meio da ativação de vias de degradação de antioxidantes e proteínas protegeu os nematoides modelos para a doença de Alzheimer e a doença de Huntington testados. Certas cepas expressam, nos neurônios bilaterais ASH, a proteína HtnQ150, uma extensão poliglutamínica de 150 resíduos proveniente da proteína Huntingtina humana. A expressão desta proteína pode ser acompanhada pela fluorescência da construção GFP, inserida nos neurônios ASH: a perda da

fluorescência bilateral ou total ausência de fluorescência observada por microscopia óptica é sinal da quebra da proteína ou proteção do neurônio (Dimitriadi & Hart, 2010; Zhang et al, 2008).

As instituições de ensino, de forma geral, desde sempre refletem as maiores e mais profundas mudanças na sociedade - políticas, econômicas, sociais e culturais (Libaneo, 2012). Vários países têm enfatizado cada vez mais dentro de suas bases curriculares o conhecimento das ciências e tecnologias por meio de métodos ativos de ensino. Através de estratégias pedagógicas os alunos ocupam o protagonismo do processo educativo na construção do conhecimento, nutrindo competências e habilidades humanas e profissionais. Cria-se dessa forma um ensino que proporciona formação ética e autonomia educacional, direcionando o estudante a reflexões críticas acerca dos processos políticocientífico-tecnológicos e suas implicações na sociedade e na sua própria qualidade de vida (Fernandes Barbosa & Guimarães de Moura, 2013). Porém, no Brasil, apesar de várias mudanças positivas propostas por governos anteriores, é notável que a cada novo processo de troca de bases políticas no poder ocorre um surto reformista que, intrinsecamente, atinge todas as instituições de ensino. No momento, estas reformas estão direcionadas para as escolas de ensino fundamental e médio (Agencia Senado Federal, 2019; Krasilchik, 2000). No cenário político atual, o movimento de reforma das bases curriculares foca novamente em um ensino tradicionalista, modelo onde os estudantes são ouvintes e seu principal papel é a memorização. Esses processos de mudanças nacionais vêm, visivelmente, com a tendência de representantes do atual governo de desprestigiar o pensamento crítico acerca de temas políticos e científicos (Nascimento & Gomes, 2019). A Universidade tem um papel crucial na produção, acumulação e disseminação de conhecimentos científicos, e uma plataforma importante para isso é a extensão universitária (De Oliveira, 2020). Projetos de extensão fortalecem a interação entre as instituições de ensino e a sociedade, o que favorece a possibilidade de desenvolver ações socioeducativas com potencial de causar transformações profundas nesses grupos de indivíduos (Gonçalves, 2019). Uma potencial mudança é de como a sociedade assimila processos científicos como a experimentação animal. A utilização de animais em experimentos é uma prática consolidada e amplamente difundida, diretamente aplicada em diversas atividades científicas de pesquisa e ensino (Coelho, 2019; Mota, 2019). Nos últimos anos, com o advento da senciência animal houve o aumento de entidades de proteção e uma maior difusão de experimentos utilizando animais pela

mídia e em redes sociais, o que vem provocando na população consideráveis e relevantes preocupações políticas e públicas (Rossi, 2019). Assim, setores da sociedade e da comunidade acadêmica começam a exteriorizar de forma mais intensa suas opiniões sobre o uso ético desses animais na pesquisa e ensino, já que estas práticas utilizam dezenas de milhões de animais por ano no mundo (Taylor et al, 2008). Uma pesquisa de 2014 realizada pelo Datafolha a pedido do Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade (ICTQ) revelou que das 2.162 pessoas ouvidas, 41% delas “discordam plenamente” do uso de animais em ensaios pré-clínicos. Essas oposições a experimentação utilizando animais se mostrou maior na população mais jovem (Lenharo, 2014). Outro ponto é a maior preocupação ética da população sobre o uso de cães do que outros animais, como divulgado em 2017 por Levin e colaboradores. Essas pesquisas demonstram que a população em geral tem pouco conhecimento sobre a importância da experimentação com animais para a ciência e o desenvolvimento de novos princípios ativos e fármacos para cura e tratamento de doenças, como controle de qualidade de medicamentos, vacinas, defensivos agrícolas, entre outros. Existem várias outras formas no emprego de animais na pesquisa: como modelos preditivos de doenças humanas, para avaliar riscos à exposição de substâncias e fármacos; como fonte de peças biológicas (exemplo das válvulas cardíacas de porcos que são utilizadas em humanos); como reatores biológicos na produção de anticorpos monoclonais e de insulina; além do uso intenso no ensino (De Queiroz, 2019). No ano de 1959, Russell e Burch publicaram os Princípios das Técnicas Experimentais Humanas que criou o conceito 3R's, denominado pelas suas iniciais em inglês: 1) Redução (Reduction), 2) Refinamento (Refinement) e 3) Substituição (Replacement). Essas três denominações constroem princípios para que a experimentação animal direcione a ciência no caminho da redução de animais na pesquisa e ensino, criação de métodos e propostas para melhorar as condições estruturais e técnicas dos ensaios, considerando sempre o bem-estar animal. Essas propostas têm o intuito de reduzir o sofrimento ao mínimo possível e em buscar metodologias alternativas que eventualmente substituam totalmente testes “in vivo” (Russell & Burch, 1959). Ao término da década de 1980, novas legislações, regras e protocolos que foram criados e adotados reconheciam a importância do uso ético de animais na pesquisa como evidenciado por Russell e Burch. Essas medidas criaram mecanismos de identificar e avaliar as obrigações morais e legais dos envolvidos nessas pesquisas na busca de reduzir, refinar e

substituir os procedimentos “in vivo”. Durante a maior parte da história do ensino de biologia, de medicina, de veterinária, e de áreas agrícolas, animais vertebrados têm sido o modelo de escolha, principalmente por suas semelhanças com humanos e outras espécies-alvo. Por exemplo, faculdades utilizavam vertebrados para ajudar os alunos a conceitualizar processos da fisiologia, farmacologia, patologia e até em cirurgias práticas. Apesar do uso extensivo, menos animais vertebrados estão sendo usados no ensino com maior pressão de conselhos acerca do bem-estar animal e dos direitos dos animais. Desde então, houve uma maior abertura de nichos científicos ao uso de animais que são modelos alternativos, principalmente invertebrados (Balls et al, 2000). Animais invertebrados têm sido usados como medicamentos direcionados a humanos por milhares de anos. Esses animais veem sendo utilizados como modelos para pesquisa e ensino desde o final de 1800. O interesse em utilizar modelos de invertebrados aumentou nas últimas décadas a medida em que a sociedade e a comunidade acadêmica começaram a responder às preocupações do público sobre o uso de animais vertebrados em pesquisa. Como resultado, os invertebrados estão sendo divulgados, avaliados e reconhecidos como modelos para muitas doenças e condições. Descobertas em quase todas as áreas da biologia e da medicina - do desenvolvimento embrionário a processos de envelhecimento - foram realizadas graças a animais invertebrados. As espécies mais utilizadas variam de invertebrados terrestre, como nematóides e microrganismos de água doce e vida marinha, incluindo planárias, crustáceos, moluscos, e vários outros. Os 6 modelos alternativos mais usados atualmente são a mosca *Drosophila melanogaster* e o verme *Caenorhabditis elegans* (Wilson-Sanders, 2011). As mesmas características que fazem do *C. elegans* um ótimo organismo modelo para pesquisa também o tornam ideal para o ensino. A utilização de recursos de pesquisa em biologia, associada a uma abordagem de "aprendizado por investigação", pode criar um grande ponto de partida para ajudar os alunos a compreender os princípios biológicos fundamentais. Em 2007, Fong-Mei Lu e colaboradores desenvolveram a idéia de um site online para ensino de biologia destinado a graduação, chamado WormClassroom. Esta plataforma destinava-se a servir como um portal de recursos para os alunos aprenderem conceitos biológicos usando materiais de pesquisa já publicados sobre *C. elegans*. Utilizando os pontos fortes do nematóide como organismo de ensino, o grupo de pesquisa obteve, a primeiro momento, pesquisadores e educadores que trabalharam juntos no desenvolvimento de materiais instrucionais utilizando o modelo 3 P's de Briggs

(presságio, processo e produto) para o aprendizado através da investigação para a plataforma online. Infelizmente o portal não é mais atualizado, porém é possível encontrar o conteúdo em outras plataformas. Ser capaz de abrigar *C. elegans* e cultivá-lo na sala de aula é o primeiro passo para usá-lo no ensino. Também é um bom organismo modelo para os alunos observarem o comportamento animal, porque *C. elegans* mostra uma diversidade de comportamentos. Pode provar, cheirar e sentir a luz e a temperatura. E à medida que mais recursos se tornam disponíveis para um sistema experimental, seu sucesso como modelo educacional aumenta. Dentre os inúmeros desafios no ensino de ciências no Brasil, criar uma formação, que consiga oferecer uma construção de conhecimentos que vá além de aspectos técnicos e formais, pode trazer mudanças profundas para os alunos dentro e fora da sala de aula (Leite et al, 2020). Dessa forma, é muito importante formar pessoas com uma visão contextualizada dos problemas e demandas sociais, que tenham a capacidade de serem peças ativas na sua realidade educacional e aprofundando o processo ensinoaprendizagem, contemplando aspectos sociais e políticos da sociedade. Busca-se, paulatinamente, no ensino de ciências, superar o paradigma da racionalidade técnica, em que somente o domínio de metodologias e saberes técnicos específicos são necessários para a formação de indivíduos. Assim, são obtidos resultados em inovação no ensino e nos modelos de aprendizagem das escolas ao criar ferramentas pedagógicas que propiciem um olhar mais crítico e questionador do entorno daquele indivíduo. Desenvolvendo um ambiente onde é possível oportunizar discussões a partir da contextualização e complexidade daquele tema (Ferrarini, 2019). O engajamento de graduandos e pós-graduandos em atividades de extensão proporciona uma formação mais aprofundada entre a teoria e prática. Isso reforça a articulação de saberes científicos, pedagógicos e de experiência no desenvolvimento de ferramentas sociais de inclusão e na responsabilidade social individual. O contato de acadêmicos com a sociedade através de projetos de extensão traz situações práticas que quando vivenciadas criam reflexões únicas e debates acerca de inúmeros assuntos, o que consolida a construção de novas perspectivas e interpretações da realidade escolar e do que é ser um professor (Chaves et al, 2019). Tais práticas proporcionam também a construção de um espaço de pesquisa, uma vez que esses acadêmicos poderão analisar sua própria prática de docência, de ensaios e utilizar seus dados para publicações e disseminação de conhecimento. Um movimento de reestruturação de bases curriculares com o intuito de desenvolver um ensino de

ciências interligado ao contexto social, denominado pela sigla CTS (Ciência, Tecnologia e Sociedade) ressalta a importância social da ciência e da tecnologia, de forma a destacar a necessidade da construção de análises críticas e 7 avaliações reflexivas sobre as relações científico–tecnológica e a sociedade. Desde seu início, o CTS tem o campo educativo como principal plataforma estratégica para implementação de métodos ativos de ensino vinculados ao contexto social uma vez que cria um ambiente onde é possível discutir com os alunos a importância de vários aspectos ligados a ciência e tecnologia, suas causas e consequências. Da mesma forma, o CTS contextualiza as ligações entre os interesses econômicos, políticos e de demandas da sociedade. Esse mesmo ambiente concebe a ciência como o fruto do acúmulo de conhecimento humano, demonstra que a ética e a ciência estão intimamente ligadas a evolução do ser humano e aponta ações reflexivas sobre quem sofre e quem provoca crises inerentes a esses processos (De Souza, 2019).

“Abordagens dos alunos à aprendizagem”, em inglês SAL (Student Approaches to Learning), é uma teoria de que os alunos têm uma abordagem diferente de como estudam, dependendo dos objetivos percebidos do curso que estão estudando. A teoria foi desenvolvida a partir dos estudos clínicos de dois psicólogos educacionais, Ference Marton e Roger Säljö (1973), que descobriram que os alunos, em relação a qualquer tarefa de aprendizagem, podem ser divididos em dois grupos distintos: aqueles que adotaram uma abordagem de entendimento para aprender, e aqueles que adotaram uma abordagem de reprodução para aprender. Estes são comumente referidos como abordagens "profundas" e "superficiais". De acordo com Marton e Säljö, aprendizagem eficaz é aquela profunda, marcada pela intenção deliberada de aprender, bem como orientações individuais e sociais para a aprendizagem. As orientações para a aprendizagem podem ser acadêmicas, vocacionais, pessoais e do meio social (Rhem, 1995). Um fator chave para melhorar a aprendizagem profunda é a motivação. No entanto, essa motivação é intrínseca e socialmente enraizada, sendo necessária a promoção da autonomia e autoestima do estudante em ser por vezes autodidata na busca de conhecimento. O aprendizado profundo é promovido através da aplicação do conhecimento, não apenas deixando-o inerte como informação, colocando o estudante como protagonista na construção de seu aprendizado e não apenas como um receptor de conhecimento. Para que haja um aprendizado profundo, os professores precisam criar essa autonomia nos alunos e dar-lhes liberdade para aprender e buscar conhecimento (Marton & Säljö, 1976a; Marton & Säljö, 1976b). O

desenvolvimento dessas inter-relações propostas aplicadas ao ensino de ciências começa com as concepções dos alunos do que viria a ser aprendido em um laboratório de ciências e as percepções do ambiente de laboratórios de pesquisa. Assim, essas percepções podem ser melhor conceituadas com o modelo de presságio-processo-produto (3P) proposto por Biggs em 1987. Biggs formulou o modelo 3P como uma introdução ao aprendizado e ensino, vindo a ser um modelo subjacente às abordagens dos alunos ao paradigma de aprendizagem. Os três P's no modelo são presságio, processo e produto. Variáveis de presságio são aquelas que vêm a caracterizar um estudante no início de um curso de estudo; como gênero, idade, conhecimento inicial e contexto social. O processo refere-se a atividades de aprendizagem utilizadas pelos estudantes, que são formuladas como abordagens para o aprendizado, consistentes com o paradigma da SAL. O produto do modelo refere-se a eventuais resultados de aprendizado, que normalmente usam notas, nota média, resultados de exames ou aulas de graduação como medidas (Biggs, 1987). A utilização dos recursos de pesquisa em biologia como a experimentação animal, juntamente com uma abordagem de "aprendizado por investigação", tem um grande potencial para ajudar os alunos a assimilar princípios biológicos fundamentais e como processos científicos tecnológicos ocorrem (Soares, 2019). Tornou-se cada vez mais necessários educar ao ponto de que além de ter acesso a informações sobre desenvolvimento científico os estudantes também tenham condições de avaliar e participar das decisões que venham a atingir o meio aonde vivem. Com o uso de modelos alternativos cria-se também um ambiente de discussão e aprendizado sobre a ética no uso de animais em pesquisa, ensino e extensão. Ensino, pesquisa e extensão constituem as três funções básicas da Universidade. De acordo com Silva, devem ser equivalentes e merecer igualdade em tratamento por parte das instituições de ensino superior (SILVA,1996). Existem inúmeros esforços atuais em projetos educacionais com intuito de criar um equilíbrio entre ensino, pesquisa e extensão no ambiente universitário. Tem sido reconhecida uma ênfase desproporcional na pesquisa sobre o ensino e a extensão em muitas das principais universidades e a necessidade de dar maior prioridade ao ensino de graduação (Chalupa, 199; Cech, 2003, Canon e Pelegrinelli; 2019). Handelsman e colaboradores em 2004 discutiram sobre como as universidades podem promover a reforma educacional apoiando o desenvolvimento da integração do ensino e de projetos de extensão. Os autores promovem que os pesquisadores incorporem suas pesquisas em materiais de ensino

e na promoção da extensão universitária. Este conceito destaca três aspectos importantes: 1) a necessidade de pesquisadores e educadores trabalharem juntos, 2) a utilização de recursos de pesquisa para promover o aprendizado dos alunos e 3) o treinamento de futuros professores para desenvolver materiais de ensino que levem a aprendizagem do aluno em consideração. Essa abordagem é importante porque os esforços das reformas educacionais precisam da atenção de educadores e pesquisadores. Reunir pesquisadores e educadores tem como principal vantagem o fato de que os recursos compilados são precisos, atualizados e serão orientados para o aprendizado do aluno. Finalmente, há o benefício adicional de que os dados de pesquisa serão gerados a partir de problemas reais de laboratórios de pesquisa e campo. Criando investigações que gerem interesse e engajamento dos alunos. Modelos tradicionais de ensino, baseados na transmissão e memorização de informações, vêm sendo cada vez mais repensados e substituídos pela colaboração e diálogo entre alunos e entre alunos e professores. Assim, o professor não é mais unicamente o titular do conhecimento e o aluno não é mais visto como apenas um receptáculo pronto para absorver as informações transmitidas de forma passiva (Freire, 2014).

Assim, *Caenorhabditis elegans* é um excelente modelo biológico bastante consolidado com inúmeras vantagens. Tendo-se em conta as características referidas acima, é possível classificar este nematóide como um organismo relativamente simples, possível de ser utilizado num variadíssimo número de estudos que gozam da vantagem de não terem regulação de comitês de ética para seu uso, por serem invertebrados.

2.2 Caprinocultura Leiteira e seus desafios

Segundo Ribeiro (1997), o leite caprino é utilizado na alimentação humana desde os primórdios da humanidade, já que até aonde se sabe, caprinos foram os primeiros animais produtores de leite a serem domesticados pelo homem. A criação de caprinos visa a obtenção de três produtos principais: a carne, de longe o mais importante, dado tanto pela alimentação dos produtores quanto para comercialização; o leite, com expressão comercial ascendente nos últimos anos; e o couro. Em 2014, o rebanho mundial de caprinos era da ordem de 1,06 bilhão de cabeças (FAO, 2016). Os caprinos estão distribuídos por todos os continentes do planeta. No entanto, percebe-

se uma maior concentração de caprinos nos países em desenvolvimento. Onde a produção e o consumo do leite de cabra são de fundamental importância para milhões de pessoas e participam do desenvolvimento socioeconômico de muitas regiões. Estudos mais aprofundados acerca da caprinocultura começou a ganhar atenção nos Estados Unidos na década de 1960 por causa dos valores nutritivos e de saúde atribuídos ao leite de cabra e seus derivados. O leite caprino tem como vantagens sua fácil digestibilidade e propriedades alergênicas mais baixas em comparação com o leite de vaca.

Segundo a FAOSTAT, o Brasil representou, para o ano de 2004, 1,16% da criação de caprinos no mundo e detinha o décimo segundo maior rebanho, possuindo apenas 9,05 milhões de cabeças, apesar das condições bastante favoráveis que se mostram iguais ou até superiores às dos maiores criadores. A distribuição do rebanho brasileiro mostra-se bastante desigual entre as regiões. Para a região Nordeste, que representa menos de 20% da área territorial brasileira, há concentração, em 2003, de 8,53 milhões de cabeças, que representam 89% do rebanho efetivo. Esse fato é explicado pela capacidade de adaptação do caprino às condições ecológicas do semiárido nordestino e às características edafoclimáticas e vegetativas, propiciando condições para o desenvolvimento da espécie.

Semelhante às vacas leiteiras, a mastite é a infecção primária mais comum e dispendiosa dentre cabras leiteiras. Dentre os parâmetros normalmente analisados para se averiguar a qualidade do leite, têm destaque a contagem de células somáticas e contagem bacteriana dessas amostras. Há muito se sabe que o leite de cabra contém naturalmente níveis elevados de células somáticas em comparação com vacas, por causa do sistema secretor apócrino na glândula mamária, e que, para vacas, a SCC elevado está associado a defeitos de qualidade do leite. Em um estudo recente com 60 cabras Alpinas sem mastite clínica, Chen et al. (2010) demonstraram que a composição do leite não mudou quando o SCC variou de 214.000 a 1.450.000 células / mL. Leite com maior SCC, na verdade, teve um menor TBC. Contagens de coliformes e bactérias psicotróficas, componentes do leite (gordura, proteína, lactose, caseína e sólidos totais) e produção de queijo de cabra semi-macio não diferiram entre leite de cabra de baixo, médio e alto CCS. Hoje, a Portaria do Leite Pasteurizado grau "A" permite 1.500.000 células / mL para leite de cabra e 750.000 células / mL para leite de vaca, ovelha e camelo (US DHHS-PHS-FDA, 2015). Albenzio et al. (2015) se aprofundou na fisiologia caprina com suas pesquisas sobre atividades de enzimas

proteolíticas indígenas no leite de cabra de diferentes SCC. Eles identificaram 700.000 células / mL como o limite para mudanças no estado imunológico da glândula mamária de cabra. Semelhante aos achados em vacas e ovelhas, a plasmina pareceu ser a atividade enzimática predominante no leite de cabra, que foi correlacionada com SCC e macrófagos em particular (Albenzio et al., 2015). É importante notar que a outra temperatura, química, física, e os padrões bacteriológicos para leite cru grau "A" e leite pasteurizado grau "A" e produtos lácteos não diferem para leite de vaca e cabra (US DHHS-PHS-FDA, 2015). Cabras e leite de cabra e produtos lácteos são considerados os mesmos altos padrões de segurança e qualidade pelos quais a indústria de laticínios é conhecida. Além disso, os resultados excederam significativamente os limites legais estabelecidos pelo US Food and Drug Administration (1.000.000 células / mL para leite de cabra na época, em comparação com o limite de 750.000 células / mL para vacas (US DHHS-PHS-FDA, 2015). Zeng (1996) indicaram que as diferenças naturais entre leite de vaca e de cabra podem levar a erros de leitura de SCC, proteína e gordura por equipamentos de qualidade do leite quando configurados com leite de vaca como padrão. Portanto, ele recomendou usar leite de cabra como padrão durante o teste - ordenar a qualidade do leite de cabra para coletar dados confiáveis. As células somáticas e seu impacto na qualidade do leite de vaca foram amplamente estudados. Fatores como métodos de ordenha, raça, idade, estágio de lactação, estação e manejo foram relatados ao afetam a CCS no leite de vaca, porém nem sempre é o caso no leite de cabra (Zeng e Escobar, 1996).

De forma breve, o termo células somáticas abrange diferentes elementos celulares normalmente presentes no leite, compreendendo células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação. Porém partículas citoplasmáticas que são semelhantes em tamanho às células somáticas do leite, e comumente encontradas no leite de cabra, podem ser erroneamente contadas como células somáticas por máquinas de qualidade do leite. Entre os fatores que podem provocar aumento na contagem de células somáticas, as mamites, sobretudo as bacterianas, são os mais importantes. Por isso, a enumeração das células presentes no leite é uma boa forma de acompanhar o estado sanitário do úbere, além de indicar possíveis reduções na produção de leite e alterações na sua composição físico-química, com conseqüente comprometimento do rendimento industrial.

3. *In vivo* nematicidal potential of goat milk on *Caenorhabditis elegans* and their association with mastitis markers

3.1 Abstract

The biological control of gastrointestinal nematodes and other pathologies using natural compounds is being known as a promising approach. Milk, under One Health's perspective, is a food that links the animal's health, the industrial production and the human's consumption, being also used as an antipathogenic agent with high biotechnological potential. Considering this scenario, the main goal of this article was to evaluate milk's nematicidal potential and its association with age and mastitis markers in raw milk from Saanen, Alpine and mixed breed goats. Using the alternative model *Caenorhabditis elegans*, immersion tests showed that milk samples (n = 200) exhibited strong nematicity effects on *C. elegans*, with a 74% average of mortality in worms exposed for 24 hours, 90% in 48 hours and 95% in 96 hours. The mastitis markers showed no significant differences in the tested samples, indicating that this potential is preserved even in animals with mastitis, despite high rates of somatic cells and bacterial count.

Keywords: OneHealth; Goat Milk; Organic; Nematicide; *C. elegans*.

3.2 Introduction

One Health is a concept that highlights the interrelation between human health, animal health and the ecosystem in which they exist. It focuses on promoting health through strategies and processes of epidemiological investigation of diseases and their agents linking this connectivity. Recent numbers estimates that global human population can reach close to 10 billion by 2050 (UN, 2015), and this exponential growth already implies enormous challenges for humanity, as in how to provide shelter and basic needs for the population, while still preserving the wild and the ecosystem's health. This approach has become more important in recent years with the growth and expansion of human populations to new geographic areas causing changes in climate and land management, such as deforestation and intensive agricultural practices. In parallel, the advent of antibiotic, anthelmintic and antifungal therapy has led to an increase in the general health of humans and animals worldwide. However, the extensive use of these drugs in humans, animals and industrial applications results in

MRA (multi-drugs resistant agents). As the world becomes more interconnected and global networks become wider, the transmission of MRA figures as an urgent global health crisis (OIE, 2019, White, et al; 2019). Diseases caused by parasites as nematodes directly affect a quarter of the world's population and affect all humans through infection in plantations and in domestic and livestock animals. The resistance and limited number of available anthelmintics has led to the search for new drugs (Keizer and Utzinger, 2010).

Milk and its derivatives are nutritious sources of proteins, fats, micronutrients, prebiotics and probiotics. They promote beneficial health outcomes. Nowadays, people all over the world benefit from milk production. Manufacturers and researches developed high standards of food safety, ensuring a healthy product for consumers (Hoppe, 2006). Several ruminants are used in extensive milk production, such as cattle, goats, sheep and buffaloes (Gerosa and Skoet 2012). Ruminant milk has been especially prominent in the search for antipathogenic agents. The Bioactive Milk Products (BMP) that perform most of the biological activities are attributed to the milk casein protein and its derivative, the bioactive peptides. Research has proven that these peptides exhibit a wide variety of physiological functionalities (Clare and Swaisgood 2000; Korhonen and Pihlanto-Leppala 2003). According to their functional properties, BMP can be classified as antimicrobial, anthelmintic, anti-fungal, antithrombotic, antihypertensive, immunomodulatory, antioxidant and antiinflammatory (Zanutto-Elgui et al. 2019; Luz et al. 2020; Biadala, et al. 2020).

Goat's milk is rich in protein but shows a lack of fat, similar to human milk. This is very beneficial compared to other animal species due its less allergic nature, it forms a naturally homogenized type of milk, easy to digest. It contains less alpha-casein compared to cow's milk (Park and Nam 2015), which is the main responsible for milk allergy. The antimicrobial and antifungal activity of milk has also been highlighted in recent research (Azizkhani, 2020; Alimi, et al, 2018; Atanasova and Ivanova, 2010). The anthelmintic activity of BMP in goat's milk was evaluated, presenting promising results (Mullan, 2003). The biological control of parasites with natural products is widely described, mainly the use of fungi, showing good results and already reaching the market through commercial products (Araujo, et al, 1993; Araujo, et al, 2007, Braga, et al, 2020). These publications show that ruminant's milk is being researched as an antipathogenic agent for use together or even as a substitute for classic allopathic drugs. Thus, it allows the possibility of overcoming MRA through the

use of natural compounds that offer low cost, accessibility and compatibility with organic livestock.

The limitations in the research of anthelmintics relates to the difficulty in identifying compounds with high yield. Parasites have a complex life cycle, they depend on a host for propagation, what makes a challenge to assess the impact of certain compounds on these animals with the necessary yield to identify a large number of potential molecules for further development. The free-living nematode *Caenorhabditis elegans* offers a convenient alternative model system for researching new compounds that specifically kill nematodes. *C. elegans*, which is ~1 mm long as an adult and can be grown in a high yield format for several generations, allowing the identification of molecules that disturb the worm at any point during its life cycle (Burns, 2015). Not all molecules that kill the free-living worm are effective against parasitic models. However, the speed and ease in which molecules can be tracked using *C. elegans* can overcome the disadvantages it carries as a primary screening system. In principle, *C. elegans* can be used to evaluate hundreds of thousands of molecules in multiple concentrations at a fraction of the cost and time that would be required with most parasitic nematode models. Besides, among all the functionalities, one of the contributions of *C. elegans* as a model organism is to constantly promote scientific innovations that have the potential to add new aspects to anthelmintic research and expand our repertoire of techniques (Hahnel, 2020).

Considering the *Caenorhabditis elegans* as a promising model within the OneHealth concept and milk's potential as an anthelmintic, the main goal of this study was to use *C. elegans* as an alternative system to investigate the nematicity of goat's milk. The goats were grouped by age, breed and by the levels of mastitis markers. Producers who use milk as an input for pharmaceutical and industrial applications can benefit from a fast and inexpensive way to ensure quality. It is important to create mechanisms to identify and select animals that produce milk with most nematicity potential and to evaluate mastitis with indirect tests to have the best milk yield. The results placed *C. elegans* as an adequate system to access the level of nematicity in milk indicating that using the nematode as a biondicator can be very useful to select animals and evaluate this material quickly and safely.

3.3 Material and Methods

A total of 200 milk samples was collected from 110 goats. The ages of the animals were from 1 ½ years to 8 years. The breeds selected to compose the sample were Saanen (33,3%), Alpine (40,0%) and mixed breed (26,7%). These animals belong to the goat sector of the Department of Zootecnics of the Federal University of Viçosa. This sector is located in Viçosa, Minas Gerais, 20 ° 46'22.8 " S 42 ° 51'10.8 " W. The animals are kept in intensive free-raising regime, with a high-level mechanical milking system and automatic cleaning of the milk tubes. Before milking, the teats were cleaned (pre-dip) with chlorine solution (750 ppm), dried with disposable towels and the first three jets of milk discarded in a "strip cup". Milk sampling was performed by manual milking in sterile tubes. The samples were collected from each goat, from both teats separately and accommodated at 4 ° C until the time of analysis. Simultaneously, 10 samples of UHT (Ultra-High-Temperature Processing) cow's milk were purchased at the local's market to be used as a negative control to access nematocytosis. The collections and analyzes were carried out in December 2020.

The SCC and TBC analyzes of the milk were made by the Milk Quality Laboratory of EMBRAPA - CNPGL / Juiz de Fora - MG. The vials used to collect samples for the determination of SCC have their own identification with the preservative Bronopol® (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) inside. The bottles intended for TBC analysis use an azidiol preservative tablet (sodium azide and chloramphenicol) inside. The time elapsed between the collection and analysis of the samples was less than 24 hours. For the parameters of Total Bacterial Count and Somatic Cell Count and other associated parameters, the limits used were established by IN 37 (BRASIL, 2000) and IN 62 (BRASIL, 2011).

C. elegans Bristol N2 and *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 from CGC (Caenorhabditis Genetics Center), were kindly donated by Prof. Riva de Paula (UFRN). The worms were kept in a B.O.D incubator at 20 ° C in NGM plates (nematode growth medium: 1.7% Bacto agar, 0.5% Bacto peptone, 50 mM NaCl, 25 mM potassium phosphate buffer pH 6.0, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ and 5 µg/mL cholesterol, H₂O to 1 liter) sown with BHI (brain heart infusion) broth incubated with *E. coli* OP50 strain as a food source and were manipulated using established techniques (STIERNAGLE, 2006).

Briefly, to synchronize *C. elegans* with the same age and stage, pregnant adult worms were treated with sterile water containing 0.5 M NaOH and 4% bleach solution (NaOH) prepared at the time of use. The eggs were released and isolated by shaking, then centrifugation (1,300 × g for 1 min) and then washed 3 times in M9 buffer (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄, H₂O to 1 liter). In the last wash the eggs were suspended in S Basal (5.85 g NaCl, 1 g K₂HPO₄, 6 g KH₂PO₄, 1 ml cholesterol (5 mg/ml in ethanol), H₂O to 1 liter), left under gentle agitation at 20 °C for 16 h to hatch the eggs. The L1 larvae were transferred to NGM agar with *E. coli* OP50 at 20 °C for ~60 h until they reached the L4 stage. After being collected and washed 3 times in S. Basal, they were centrifuged at (1300×g for 2 min) and the suspension was adjusted so that each 50µl contains ~ 400 L4 worms.

The nematodes were transferred in triplicate for each reading, in 50µl to each 96-wells plate containing 50 µl of the milk samples and then incubated at 20 °C. For each reading, at least 100 nematodes were recovered and analyzed by direct microscopy. To determine the survival rate of *C. elegans*, the number of live worms was recorded daily and the percentage of surviving worms was calculated using the following formula: survival (%) = (live worms / total worms used) × 100. Worms were considered dead when they did not respond to being touched by a platinum wire pick. To avoid the experimenter's bias, the milk samples (in the 96-wells plate) were randomly labeled and evaluated to minimize the influence of environmental effects and observer bias.

Using SPSS Statistics (version 22.0.0), Levene's test was used to inquire about the homogeneity of the variance, and proceeded with the appropriate test accordingly. The killing rate of nematodes with cow's milk (Negative Control) and goat's milk was analyzed by the Mann-Whitney test. The correlation between age, breed, SCC/TBC and the killing capacity on the milk was accessed by Pearson one way test.

3.4. Results and Discussion

For its use as a nematicidal agent, the ability to kill the worm as quickly as possible is the most important factor. In general, goat's milk showed a good nematicity, however it presented variance between the samples, with samples showing from 0 to 100% mortality of *C. elegans* in the first 24 hours (Fig 1 A and B). The average of mortality in worms exposed for 24 hours was 74%, 90% in 48 hours and reached 95%

in 72/96 hours (Fig. 2). There was also variance in response in the first 24 hours, 64,5% of the samples managed to kill up to 76% *C. elegans* (Fig. 2 A), while 3% failed to kill any worm. In this study, 10% of the goats did not show significant nematocidity, these animals had up to 25% *C. elegans* mortality at the end of 96 hours (Fig. 2 D). Only 14% of the samples contained live nematodes after 96 hours of exposure. This variance can be related to different factors, such as some related disease.

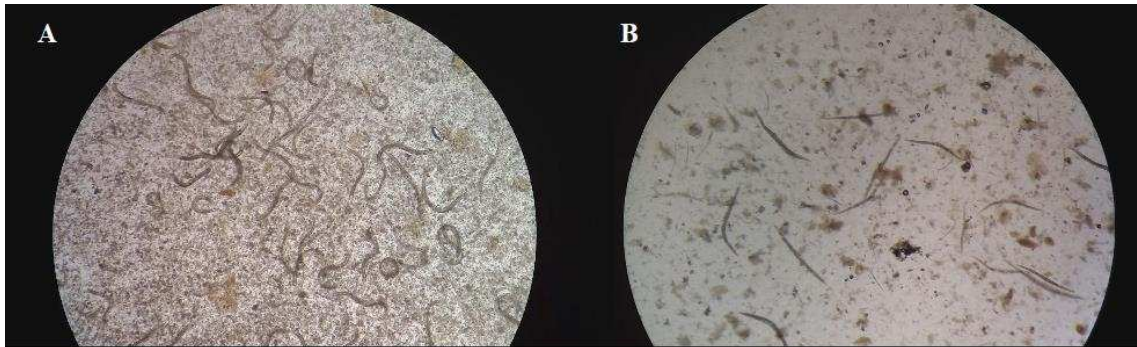


Fig. 1 - *C. elegans* exposed 24 hours to different goat's milk sample. A - 100% viability; B - 100% mortality.

Raw milk samples were grouped according to three levels of SCC: below 200,000 SC/mL (21.2%), 200,000-750,000 SC/mL (32.6%) and above 750,000 CS/mL (46.1%). TBC results were grouped at three levels, below 100,000 with 73.6% of the samples; 11.4% between 100,000-750,000; and 15% above 750,000 CFU/mL. In this study, it was analyzed correlations among the three parameters associated with the goats: age in months, breed and the mastitis markers (SCC and TBC). There were no statistically significant differences between the mortality of nematodes challenged with goat's milk and the breed, age and mastitis markers. SCC and TBC in goat milk show a similar correlation ($r = 0.673$, $n = 182$, $p = <0,001$) with cow milk samples (Lopes Junior, 2012).

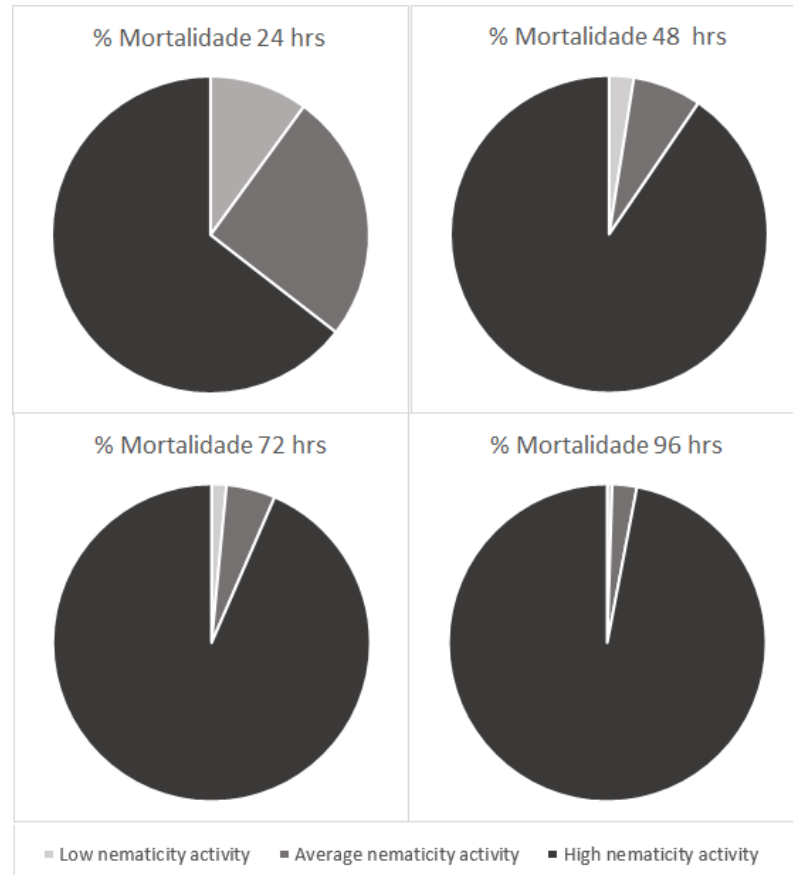


Fig. 2 Distribution of *C. elegans* mortality in goat's milk (n= 200) at 24, 48, 72 and 96 hours of exposure. Mortality rates were classified according to nematocidal activity: < 25% low activity; between 26% and 75% - average activity; > 76% high activity.

The age and breed of the goats did not show significant differences (Fig.3 and Fig.4). This could be considered beneficial, considering milk as an industrial input. Not having to discard older animals and already being able to use the milk of young animals is advantageous for producers. The evaluation of other parameters such as milk constitution, hormonal status, seasonal changes in the milk composition and pathogens associated with mastitis and other diseases related to the level of milk nematocidal activity can bring new perspectives for its use as a bioindicator. The evaluation of the nematocidal activity of the milk of breeds raised in Brazil has great potential since Brazil has more than 8 million goats, according to an agricultural census. (Embrapa, 2018). Studies that assess which breeds have the best nematocidal potentials have great biotechnological value, as well as research that investigates this same potential in mares, donkeys and other ruminants. It is important to correlate the nematocidal activity of the milk of these ruminants with their constituents, with the hormonal and with the immune status of the animal to be able to track which fractions have the most potential for application in the pharmaceutical industry.

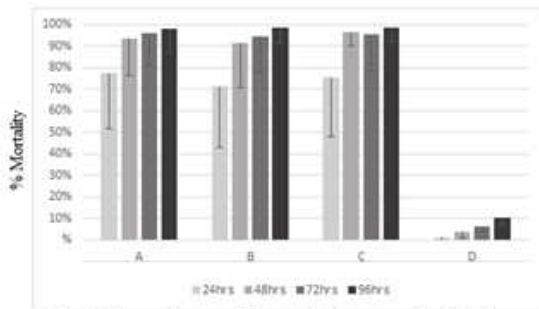


Fig. 3 Effect of goat milk on *C. elegans*, classify by age. Group A (n= 82) age until 24 mounts. Group B (n=95) age between between 25 and 48 months. Group C (n= 18) age over 49 months. Group D (n=20) negative control. Values are represented as the mean and standard deviation from three independent experiments. All means indicates significant differences of treatment to control ($P < 0.05$). B and C in 48H ($p < 0.05$).

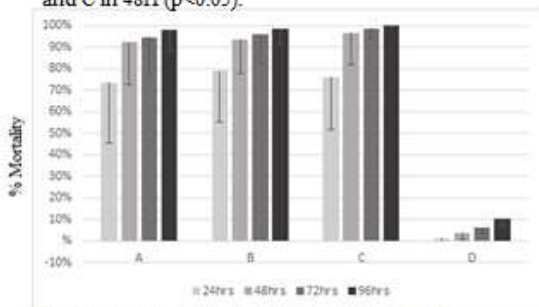


Fig. 5 Effect of goat milk on *C. elegans* classify by UFC/ml. Group A (n= 136) until 100.000 Ufc/ml. Group B (n=21) between 100.000 and 750.000 Ufc/ml. Group C (n= 28) over 750.000 Ufc/ml. Group D (n=20) negative control. Values are represented as the mean and standard deviation from three independent experiments. All means indicates significant differences of treatment to control ($P < 0.05$).

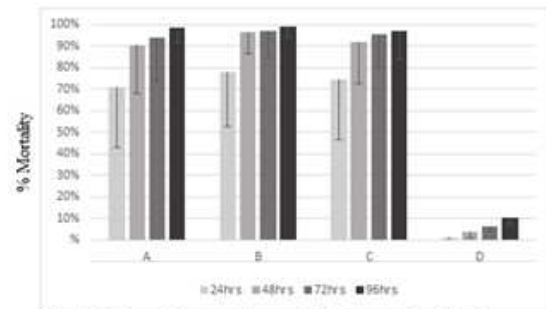


Fig. 4 Effect of goat milk on *C. elegans* classify by breed. Group A: Alpine goats (n= 78) . Group B: Saanen goats(n=65) . Group C: Mixed breeds(n= 52). Group D (n=20) negative control. Values are represented as the mean and standard deviation from three independent experiments. All means indicates significant differences of treatment to control ($P < 0.05$). B and C in 48hrs($p < 0.05$)

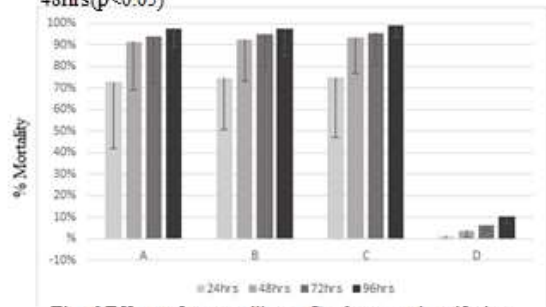


Fig. 6 Effect of goat milk on *C. elegans* classify by CS/ml. Group A (n= 39) until 200.000 Ufc/ml. Group B (n=60) between 200.000 and 750.000 Ufc/ml. Group C (n= 85) over 750.000 Ufc/ml. Group D (n=20) negative control. Values are represented as the mean and standard deviation from three independent experiments. All means indicates significant differences of treatment to control ($P < 0.05$).

The main markers of mastitis in milk, SCC and TBC, also showed no correlation with mortality rates. The mortality mean was separated by groups (Fig.5 and Fig.6), in which the first group is formed by animals considered healthy with low levels of mastitis markers. The second group was formed by intermediate levels, and the third group by animals with mastitis. The fact that the level of nematocytosis is not directly related to mastitis indicates that this material can be used for other purposes. This milk, unfit for human and industrial consumption, may be subject to processes that neutralize the presence of these pathogens and toxins, using this material in applications compatible with their nature. Mastitis is directly linked to MRA, these agents are a threatening problem for the livestock industry, which represents a major threat to the general well-being and livestock production in the world. The most significant factors in MRA incidence are an excessive frequency of treatments and the administration of an inadequate dose (underdosage), these problems are particularly true for developing countries.

The goat's milk market in Brazil is booming, showing significant growth in recent years, due to consumer demand in large urban centers, in addition to government actions in the Northeast Region, with the objective to improve families' life's quality through actions to combat hunger and child malnutrition. Goat's milk presents an excellent source of natural ingredients for different applications in food and in the pharmaceutical industry. Processing techniques on an industrial or semi-industrial scale are available for fractionation and isolation of the main milk proteins. These BMP and other milk components can be directed towards the development of anthelmintic products, as well as antipathogenic products to improve the performance of other drugs already used. Ruminant milk has been shown to be a good antipathogenic agent, and its use as an anthelmintic agent has several advantages.

Goat's milk has been widely studied and characterized by its bioactive peptides. It also contains the four main fractions of caseins (α 1-casein, α 2-casein, β casein and κ -casein), however, it is described that goat casein undergoes through a wide range of modifications that lead to the production of various molecules of casein (Marletta et al. 2007), being significantly higher in concentration than cow's milk (Moatsou et al. 2005). Previously "in vitro" experiments also demonstrated a direct detrimental effect on the motility of the worms where the active fraction that seemed to influence the anthelmintic activity was BMP, more intensely casein. (Zeng, 2000).

The use of ruminant milk as an antipathogenic agent is especially interesting within organic livestock. Organic livestock is connected in several ways based on the OneHealth concept, being a production system based on the creation of animals as natural as possible, being economically viable and socially participative. Among the challenges of organic livestock, the preservation and recovery of local flora and fauna can be reached, without using genetically modified animals or artificial chemical substances, and with rational use of soil and water and treatment of waste produced during these processes.

3.5. Conclusions

This is the first report of nematicidal activity of raw goat's milk in *C. elegans*. The results revealed this species as a promising biosensor for the evaluation of milk's nematicity. It is an important finding, since this potential varies between animals, regardless of age, breed and milk quality markers. The goat's milk can be used in

formulations in order to reduce the intensive use of classic drugs in animals, thus reducing the risks to humans and to the environment.

3.6. References

ALIMI D, ABIDI A, SEBAI E, et al. In Vivo Nematicidal Potential of Camel Milk on Heligmosomoides Polygyrus Gastro-intestinal Nematode of Rodents.

Helminthologia. v. 55, n. 2, p. 112-118, 2018. Disponível em: doi:10.2478/helm-2018-0001. Acesso em: jan 2021.

ARAUJO J.V., RODRIGUES M.L.A., SILVA W.W., VIEIRA L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo

Monacrosporium thaumasium. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 42 p. 1177–1181, 2007.

ARAUJO J.V., SANTOS M.A., FERRAZ S., MAIA A.S. Antagonistic effect of predacious fungi Arthrobotrys on infective Haemonchus placei larvae. **J Helminthol**, v. 67, p. 136–138, 1993.

ATANASOVA J. & I. IVANOVA Antibacterial Peptides from Goat and Sheep Milk Proteins, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 2, p. 1799-1803, 2010. Disponível em: DOI: 10.2478/V10133-010-0049-8. Acesso em: jan 2021.

AZIZKHANI, M., SARIS, P.E.J. & BANIASADI, M. An in-vitro assessment of antifungal and antibacterial activity of cow, camel, ewe, and goat milk kefir and probiotic yogurt. **Food Measure**, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s11694-020-00645-4> Acesso em: jan 2021.

BIADAŁA, A., SZABLEWSKI, T., LASIK-KURDYŚ, M. et al. Antimicrobial activity of goat's milk fermented by single strain of kefir grain microflora. **EurFood Res Technol**, v. 246, p. 1231–1239, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00217-020-03483-2>. Acesso em: jan 2021.

BRAGA, F.R., FERRAZ, C.M., DA SILVA, E.N. et al. Efficiency of the Bioverm® (Duddingtonia flagrans) fungal formulation to control in vivo and in vitro of

Haemonchus contortus and Strongyloides papillosus in sheep. **Biotech**, v. 3, n. 10, p. 62, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2042-8>. Acesso em: jan 2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n° 37 de 31 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite de cabra**. Diário Oficial da União, Brasília, p.23, 8 nov. 2000. Seção 1.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da União, 30 dez. 2011.

BURNS, A., LUCIANI, G., MUSSO, G. et al. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. **Nat Commun** v.6, n. 7485, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms8485>. Acesso em: jan 2021.

CHARLIER, J., VAN DER VOORT, M., KENYON, F., SKUCE, P., VERCRUYSSSE, J. CHASING. Helminths and their economic impact on farmed ruminants. **Trends Parasitol.** v. 30, p. 361–367, 2014.

CLARE DA, SWAISSGOOD HE. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. **Journal of Dairy Science.** v. 56, p. 363-366, 2000.

COLES GC. Drug resistance and drug tolerance in parasites. **Trends in Parasitology.** v. 22, p. 348, 2006

FITZPATRICK, J.L. Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. **Vet. Parasitol.** v. 195, p. 233–248, 2013.

FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia: saberes necessarios a pratica educativa**, 49th ed., Paz e Terra, Rio de Janeiro, 2014.

GEROSA, S., & SKOET, J. **Milk availability trends in production and demand and medium-term outlook.** Disponivel em: www.fao.org/economic/esa. Acesso: jan. 2021.

HAHNEL SR, DILKS CM, HEISLER I, ANDERSEN EC, KULKE D. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research - Old model, new perspectives. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** v. 14, p.237-248, 2020. Disponivel em: doi:10.1016/j.ijpddr.2020.09.005. Acesso: jan.2021

HOPPE C., C. MØLGAARD, K.F. MICHAELSEN, Cow's milk and linear growth in industrialized and developing countries, **Annu. Rev. Nutr.** v. 26, p. 131–173, 2006.

HUBAN GOCMEN, ISFENDIYAR DARBAZ, OSMAN ERGENE, OMER M. ESENDAL, SELIM ASLAN, The relationships between somatic cell count, total bacterial count and intramammary infection in milk samples of Damascus goats during postpartum days. **Small Ruminant Research**, v. 180, p.1-5,2019. ISSN 0921-4488, Disponivel em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.09.01> Acesso: jan. 2021.

KEISER, J. & UTZINGER, J. The drugs we have and the drugs we need against major helminth infections. **Adv. Parasitol.** v. 73, p. 197–230, 2010.

KORHONEN H, PIHLANTO-LEPPALA A. Food Derived Bioactive Peptides: Opportunities for Designing Future Foods. **Current Pharma Design.** v. 9, n. 16, p. 1297-1308, 2003.

LOPES JUNIOR, J.E.F. et al. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 691-696, 2012. Disponivel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000400019&lng=en&nrm=iso>. Acesso: jan. 2021.

- LUZ, C., IZZO, L., RITIENI, A., MAÑES, J., & MECA, G. (2020). Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread. **Lwt**, v. 118, n. 108717, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108717>. Acesso: jan. 2021.
- MARLETTA, D., CRISCIONE, A., BORDONARO, S., GUASTELLA, A. M., &URSO, G. D. Casein polymorphism in goat's milk. **Lait**, v. 87, p. 491–504, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/lait:2007034>. Acesso: jan. 2021.
- MOATSOU, G., VAMVAKAKI, A. N., MOLLÉ, D., ANIFANTAKIS, E., &LÉONIL, J. Protein composition and polymorphism in the milk of Skopelos goats. **Lait**, v. 86, n. 5, p.345–357, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/lait:2006017>. Acesso: jan. 2021.
- MULLAN, W.M.A. **Major antimicrobial proteins in milk**. 2013. Disponível em: <https://www.dairyscience.info/index.php/exploitation-of-anti-microbial-proteins/52-antimicrobial-proteins.html>. Acesso: jan. 2021.
- OIE. **One World, One Health**, 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/one-world-one-health/>. Acesso: jan. 2021.
- PARK, Y. W., & NAM, M. S. Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 6, p.831–840, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>. Acesso: jan. 2021.
- PEIXOTO, R.M. et al. Indirect diagnostic tests for the detection of subclinical mastitis in dairy goats experimentally infected with *Staphylococcus aureus*. **Cienc. Rural, Santa Maria**, v. 46, n. 7, p. 1217-1222, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000701217&lng=en&nrm=iso. Acesso: jan. 2021.
- SARA N. GARCIA, BENNIE I. OSBURN, JAMES S. CULLOR, A onehealth perspective on dairy production and dairy food safety, **One Health**, v. 7, n. 100086, 2019. ISSN 2352-7714, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>. Acesso: jan. 2021;
- ZENG S. **Anti-Parasitic Activity of Bovine Milk**: M.Sc. Nutritional Science Thesis, Massey University, 2000.
- SIRÓ I, KÁPOLNA E, KÁPOLNA B, LUGASI A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**. v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.
- STIERNAGLE, T. **Maintenance of *C. elegans***. WormBook, p. 1-11, 2006.
- UNITED NATIONS, World Population Prospects: The 2019 Revision, Key Findings and Advance Tables, **P.D. Department of Economic and Social Affairs, United Nations**, 2015. Disponível em: https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf. Acesso: jan. 2021.

WHITE, A., HUGHES, J.M. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. **EcoHealth** v. 16, p. 404–409, 2019. Disponivel em: <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>. Acesso: jan. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. **World Health Organization**, 2015. Disponivel em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> Acesso: jan. 2021.

ZANUTTO-ELGUI, M. R., VIEIRA, J. C. S., DO PRADO, D. Z., BUZALAF, M. A. R., PADILHA, P., ELGUI DE OLIVEIRA, D., & FLEURI, L. F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **FoodChemistry**, v. 278, p. 823–831, 2019. Disponivel em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.119> Acesso: jan. 2021.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as estratégias de controle sustentável para doenças parasitárias requerem uma abordagem integrada incorporada ao conceito OneHealth. O uso do leite de ruminantes como agentes antipatogênicos é um campo importante e promissor. É notável a necessidade de estratégias que combinem drogas clássicas com compostos naturais, a fim de minimizar a incidência de resistência por esses agentes relacionados. Assim, o leite de cabra é uma excelente fonte de ingredientes naturais para diversas aplicações. Técnicas de processamento em escala industrial ou semi-industrial estão disponíveis para fracionamento e isolamento dos principais BMP. Essas BMP e outros componentes do leite podem ser direcionados ao desenvolvimento de produtos anti-helmínticos, bem como antipatogênicos para melhorar o desempenho de outras drogas já utilizadas. O potencial nematicida do leite de cabras, amplamente difundido no Brasil, precisa ser avaliado de maneira mais intensa e sistemática. A avaliação de outros parâmetros como constituição do leite, estado hormonal, mudanças sazonais na composição do leite e patógenos associados à mastite e outras doenças que possam alterar o nível de nematicidade do leite podem trazer novas perspectivas para seu uso como agente antipatogênico. Em um futuro próximo, vários produtos inovadores baseados nestes ingredientes e na resposta a vermes poderão ser lançados no mercado.

O nematoide *C. elegans* se mostrou uma excelente plataforma de pesquisa com grande potencial de também ser utilizada como ferramenta de ensino. O uso desse modelo alternativo como base de aulas práticas pode levar os alunos por métodos ativos de ensino, criar um ambiente de discussão e reflexão sobre inúmeros temas que acercam o uso de animais na pesquisa. Por ser um sistema barato e fácil de ser manipulado, o nematoide por ser utilizado sem a pressão de erro, já que o experimento pode ser realizado várias vezes, sem o limitante de um número de animais, o que acontece com modelos clássicos.

REFERÊNCIAS

- ALBENZIO, M., A. SANTILLO, A. L. KELLY, M. CAROPRESE, R. MARINO, A. SEVI. Activities of indigenous proteolytic enzymes in caprine milk of different somatic cell counts. **J. Dairy Sci.** n. 98; p. 7587–7594, 2015.
- A. R. SCHWENDEMAN, S. SHAHAM. A high-throughput small molecule screen for *C. elegans* linker cell death inhibitors. **PlosOne** v.11, 2016.
- AGENCIA SENADO FEDERAL, **Novo governo promete mudanças profundas na educação**, 2019. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2019/01/28/governo-promete-mudancas-profundas-na-educacao> Acesso em: 21 jan 2021.
- ALEXANDER AG, MARFIL V, LI C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Front Genet.** v. 5 p. 279, 2014. Disponível em: doi: 10.3389/fgene.2014.00279 Acesso em: jan. 2021.
- ANBALAGAN, C., et al. Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in soil pore water samples. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 2, p. 439-455, 2012.
- BALLS, M., VAN ZELLER, A.M., HALDER, M., Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. **Amsterdam: Elsevier**, p. 17-22, 2000.
- BIGGS, J. B. Student approaches to learning and studying. Hawthorn, Victoria: **Australian Council for Educational Research**, 1987.
- BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics.** v. 77, p. 71–94, 1974.
- BRENNER, S., WOOD W. B., **The nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor, 1988.
- BURNS, A.R., AND ROY, P.J. To Kill a Mocking Worm: Strategies to improve *Caenorhabditis elegans* as a model for use in anthelmintic discovery. **In Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines, C.R. Caffrey.** p. 201- 216, 2012.
- CANON, C. A. S., & PELEGRINELLI, G. Extensão universitária: o impacto de um projeto de extensão na formação profissional dos discentes na educação superior. **Revista UFG**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/revufg.v19.59799>. Acesso em: jan. 2021.
- CASSADA, R.C., RUSSEL R.L. The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Development biology.** v. 46, p. 326-342, 1975.
- CECH, T. "Rebalancing teaching and research. (Editorial)." **Science**, v. 299, n. 5604, p. 165. 2003.

CHALUPA, L. M. Balancing research and teaching. **Science**, v. 285, n.5436, p. 2073-2075, 1999.

CHAVES, C. J. A. et al. Extensão Universitária e os preceitos da indissociabilidade: um compromisso da Universidade com a inclusão social. **Holos**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15628/holos.2019.7866>. Acesso em: jan. 2021.

COELHO, G. H. **Ética e experimentação animal**. Trabalho de conclusão de curso de graduação. Universidade Federal de Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/26262/1/%C3%89ticaExperimenta%C3%A7%C3%A3oAnimal.pdf> Acesso em: 21 jan 2021.

CORSI A.K, WIGHTMAN B., CHALFIE M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** v. 200, p. 387-407, 2015. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html Acesso em: 21 jan 2021.

CULETTO E., SATTELLE D.B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Hum Mol Genet**, v. 9m n. 6, p. 869-877, 2000. Disponível em: doi:10.1093/hmg/9.6.869. Acesso: jan. 2021.

DE OLIVEIRA, D. K. B. et al. O processo seletivo para a pós-graduação stricto sensu e a extensão universitária: uma prática formativa. **Pensar acadêmico**, v. 18, n. 2, p. 231-245, 2020. Disponível em: <http://pensaracademico.facig.edu.br/index.php/pensaracademico/article/view/1874> Acesso em: 21 jan 2021.

DE QUEIROZ, A. P. A. et al. Bioética no uso de animais em experimentação. Ciência atual—**Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário São José**, v. 13, n. 1, 2019. Disponível em: <http://www.cnad.edu.br/revista-ciencia-atual/index.php/cafsj/article/view/344> Acesso em: 21 jan 2021.

DE SOUZA, L. D. B. et al. Contribuições do uso associado da ciência, tecnologia e sociedade para o ensino de ciências. **Redin-Revista Educacional Interdisciplinar**, v. 8, n. 1, 2019. Disponível em: <https://seer.faccat.br/index.php/redin/article/view/1533/991> Acesso em: 21 jan 2021.

DIMITRIADI, M. & HART, A. C. Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of disease**, v. 40, n. 1, p. 4-11, 2010. Disponível em: doi:10.1016/j.nbd.2010.05.012. Acesso em: jan. 2021.

FAO. FAOSTAT **Production live animals**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize> . Acesso em 20 fev 2021.

FERNANDES B. E. & GUIMARÃES DE MOURA, D. Metodologias ativas de aprendizagem na Educação Profissional e Tecnológica. **Boletim Técnico Do Senac**, v. 39, n. 2, p. 48-67, 2013. Disponível em: <https://www.bts.senac.br/bts/article/view/349>. Acesso em: 20 jan 2021.

FERRARINI, F. O. C. & AMADEU M. B. Perspectivas de modelos formativos com enfoques construtivistas para formação de professores de ciências segundo as concepções de rafael porlán e colaboradores. **Investigações em ensino de ciências**, v. 24, n. 1, p. 22-44, 2019. Disponível em: <https://www.if.ufrgs.br/cref/ojs/index.php/ienci/article/view/1139>. Acesso em: 21 jan 2021.

FERREIRA, P. B., ET AL. GUARANA (*Paullinia cupana*) Extract Protects *Caenorhabditis elegans* Models for Alzheimer Disease and Huntington Disease through Activation of Antioxidant and Protein Degradation Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/9241308>. Acesso em: 21 jan. 2021.

GONÇALVES, J. L S. Benefícios de projetos de extensão para docentes em formação e em início de carreira. **Revista panorâmica online**, v.2, p. 57-68, 2019. Disponível em: <http://revistas.cua.ufmt.br/revista/index.php/revistapanoramica/article/download/1019/19192225>. Acesso em: 21 jan 2021.

HANDELSMAN J. Scientific teaching. **Science**. v. 4, p. 521–522, 2004.

HIROTSU T, et al. A highly accurate inclusive cancer screening test using *caenorhabditis elegans* scent detection. **Plosone**. v. 11, p. 10-13, 2015. Disponível em: doi.org/10.1371/journal.pone.0118699. Acesso em: 21 jan 2021.

HUNT, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jat.3357> Acesso em: jan. 2021.

KAUR N, SINGH DP. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**. v. 112, p. 67-187, 2017.

KENNEDY, M. W. Ascaris – antigens, allergens, immunogenetics, protein structures The Neglected Parasite, **Holland: Elsevier**, 2013.

KRASILCHIK, M. Reformas e realidade: o caso do ensino das ciências. **São Paulo em Perspectiva**, v. 14, n. 1, p. 85-93, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-88392000000100010>. Acesso: jan. 2021.

LEITE, F. W. J. et al. Contextualização nos currículos da área de ciências da natureza e suas tecnologias. **Revista contexto & educação**, v. 35, n. 110, p. 226-240, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21527/2179-1309.2020.110.226-240> Acesso: jan. 2021.

LENHARO, M. No brasil, 41% da população é contra testes com animais, revela pesquisa. **G1, São Paulo**, 2014. Disponível em: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2014/12/no-brasil-41-da-populacao-e-contra-testes-com-animais-revela-pesquisa.html> Acesso em: 21 jan 2021.

LEVIN, J. et al. Are people more disturbed by dog or human suffering? Influence of victim's species and age. **Society and animals**. v. 25, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1163/15685306-12341440>. Acesso em: 21 jan 2021.

LIBANEO, J.C. O dualismo perverso da escola pública brasileira: escola do conhecimento para os ricos, escola do acolhimento social para os pobres. **Educação e Pesquisa**, v. 38, n. 1, p. 13-28, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-97022011005000001> Acesso em: jan. 2021.

M. R. LAMPRECHT, D. M. SABATINI, A. E. CARPENTER, CellProfiler: Free, versatile software for automated biological image analysis. **Biotechniques** v. 42, p. 71–75, 2007.

MARTON, F. AND SÄLJÖ, R. “On quantitative differences in learning. I: Outcome and process,” **British Journal of Educational Psychology** v. 46, p. 4–11, 1976a.

MARTON, F. AND SÄLJÖ, R. “On qualitative differences in learning. II: Outcome as a function of the learner's conception of the task,” **British Journal of Educational Psychology** v. 46, p. 115–127, 1976b.

MORENO-ARRIOLA E, CARDENAS-RODRIGUEZ N, COBALLASE-URRUTIA E, PEDRAZA-CHAVERRI J, CARMONA-APARICIO L, ORTEGA-CUELLAR D. *Caenorhabditis elegans*: a useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2014, n. 705253, 2014. Disponível em: doi: 10.1155/2014/705253 Acesso em: jan. 2021.

MOTA, K. A. G. **Experimentação animal no Brasil: uma abordagem normativa acerca da criação, manutenção e pesquisa com animais**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

N. A. SWIERCZEK, A. C. GILES, C. H. RANKIN, R. A. KERR. High-throughput behavioral analysis in *C. elegans*. **Nat. Methods** v. 8, p. 592–598, 2011.

NASCIMENTO, D. R. & GOMES, R. D. Os desafios da educação: intolerância e inconstitucionalidade do manifesto à nação (FPE) do programa de governo de Jair Bolsonaro. **Revista artes de educar**, v. 5, n. 2, p. 293-312, 2019.

NIGON, V. M. & FÉLIX M. A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. **Wormbook**, p. 1-84, 2017. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_nematodeshistory/nematodeshistory.pdf Acesso em: 21 jan. 2021.

RIBEIRO, A. C. **Estudo dos efeitos genéticos e de ambiente sobre características de importância econômica em caprinos da raça Saanen**. Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, p.116, 1997.

RAND, J.B., AND JOHNSON, C.D. Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*. **Methods Cell Biol**. v. 48, p. 187–204, 1995.

RHEM, J. Deep/surface approaches to learning: an introduction. **The national teaching and learning forum**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 1995. Disponível em: <https://drjj.uitm.edu.my/DRJJ/OBE%20FSG%20Dec07/OBEJan2010/Learning-Intro2Deep-Surface-Rhem.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2021.

ROSSI, F. M. **O uso de animais para testes de laboratórios para produção de cosméticos no brasil: uma abordagem jurídica e bioética**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Crisciuma-SC, 2019.

RUSSELL, W. M. & BURCH, R. L. (1959) **The principles of humane experimental technique**. Methuen, Londres: Methuen. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique> Acesso em: 21 jan 2021.

SOARES, N. & TRIVELATO, S. F. (2019) Ensino de ciências por investigação—revisão e características de trabalhos publicados. **Atas de ciências da saúde**, v. 7, n. 1, p. 45-65, 2019. Disponível em: <http://www.revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ACIS/article/view/1952/1463> Acesso em: 21 jan 2021.

TAYLOR K., GORDON, N., LANGLEY, G., HIGGINS H. (2008) Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. **Alternatives to laboratory animals**, v. 36, p. 327–342, 2008. Disponível em: https://animalstudiesrepository.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1013&context=acwp_lab Acesso em: 21 jan 2021.

US DHHS-PHS-FDA (Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration). 2015. **Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance**. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/milk/ucm513508.pdf>.

WILSON-SANDERS SE. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. **ILAR J**. v. 2, n. 2, p. 126-52, 2011. Disponível em: doi: 10.1093/ilar.52.2.126 Acesso: jan. 2021.

ZENG, S. S., AND E. N. ESCOBAR. Effect of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. **Small Rumin. Res.** v.19, p.169–175, 1996.

ZHANG, L. et al. (2008) Significant longevity-extending effects of egcg on *caenorhabditis elegans* under stress. **Free radical biology and medicine**. v. 46, n. 3, p. 414-421, 2008. Disponível em: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.041 Acesso: jan. 2021.