



Ação do Limoneno (S)-(-) sobre a cinética espermática de sêmen criopreservado de touros

Action of the Limonene (S) - (-) on sperm kinetics of cryopreserved semen of bulls

Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco^{1,*}, Marlon de Araújo Castelo Branco¹, Leopoldina Almeida Gomes¹, Micherlene da Silva Carneiro Lustosa¹, Felipe Pereira da Silva Barçante¹, Filipe Nunes Barros¹, Isolda Márcia Rocha do Nascimento², José Adalmir Torres de Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil; ²Colégio Técnico Agrícola, CTT, Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: yndyranayan1@hotmail.com

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of different concentrations of Limonene (S)-(-) (50 µM, 100 µM and 150 µM) in supplementing the diluter of bulls freezing semen. Thirty-six ejaculated from four Curraleiro-Pé-Duro bulls were used for cryopreservation. The cryopreserved spermatozoa were submitted to post-thaw motility sperm of computer assisted analysis (CASA) to evaluate the characteristics of spermatoc kinetics. Observed that The different concentrations of limonene (S) - (-) did not affect the parameters of kinetics spermatoc except for linearity (LIN). The addition of 150 µM limonene (S) - (-) significantly increased (P < 0.05) the LIN compared to the control. The results obtained in the present study allow us to conclude that the supplementation of limonene (S) - (-) in cryopreservation bovine semen diluent did not interfere in kinetics sperm.

Keywords: *criopreservação, cinética, touro.*

Palavras-chave: *criopreservação, cinética, touro.*

Introdução

O desenvolvimento de técnicas de criopreservação do sêmen tornou-se uma das principais fontes para a preservação de material genético em animais domésticos, assim como o aumento da eficiência dos programas de inseminação artificial (Songsasen e Leibo 1997), entretanto, os danos causados pelo processo de criopreservação são inevitáveis e induzem efeitos prejudiciais sobre os parâmetros funcionais de espermatozoides, tais como perda de motilidade, redução da integridade do DNA, danos na membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial (Yoshida 2000; Simon et al. 2013).

O óleo essencial de limão (*Citrus limon*) é o principal subproduto das cascas do fruto, tendo como principais constituintes grandes quantidades de terpenos, sendo o limoneno o principal constituinte dessa fração (Berger et al. 2002). O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, é um monoterpene monocíclico que possui dois enantiômeros, o limoneno R-(+) e o limoneno S-(-), (Poulouse et al. 2005). O limoneno trabalha através da reação com os radicais livres, reduzindo a sua atividade e prevenindo uma posterior reação em cadeia, e em seguida, eliminando os radicais livres (Poulouse et al. 2005).

Objetivo-se avaliar a ação do Limoneno (S)-(-) na criopreservação espermática de touros sobre os parâmetros de cinética espermática.

Material e Métodos

Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé Duro, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Durante o experimento, os touros foram mantidos sob regime extensivo, com acesso a piquetes de capim-mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim milhã (*Digitaria sanguinalis*), água e sal mineral à vontade. As coletadas de sêmen foram feitas uma vez por semana, durante nove semanas, com o auxílio de um eletro estimulador controlado automaticamente (Biocon[®] Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Imediatamente após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37°C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume, turbilhonamento, motilidade total e vigor, em microscópio de contraste de fase. Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade total $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados nesse estudo. Quando aprovadas, amostras dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um *pool*, logo após a formação do *pool*, este foi dividido em quatro alíquotas e diluídas em meio Tris-Gema (37°C) contendo Limoneno (S)-(-) (50 µM, 100 µM e 150 µM), enquanto que uma alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,5mL (50×10^6 espermatozoides viáveis por palheta) e congelado e maquina TK 3000[®] na curva de congelação rápida (-0,25° C/min, de 25° C a 5° C e -20° C/min, de 5° C a -120° C) e, após atingir -120° C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico. Após 30 dias de armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à cinética espermática, por meio de um sistema analisador de espermatozoide auxiliado por computador (CASA). As variáveis cinéticas dos espermatozoides foram avaliadas após a lavagem das amostras em meio Tyrode-albmina-lactato-Piruvato (SPERM-TALP) (v/v) e centrifugado a



300 x g para retirada dos agregados da gema de ovo do meio de criopreservação e posteriormente incubados num banho-maria a 37°C durante 5min. As variáveis avaliadas foram: motilidade progressiva (MOP - $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

Resultados e Discussões

O Efeito do limoneno (S)-(-) no diluidor de criopreservação de sêmen, em três concentrações diferentes (50, 100, 150 μM), sobre os parâmetros de cinética dos espermatozoides de bovinos Curraleiro Pé-Duro após o descongelamento a 37 °C encontram-se na tab. 1. As diferentes concentrações de limoneno (S)-(-) não afetaram os parâmetros de cinética espermática, exceto para linearidade (LIN). A adição de 150 μM de limoneno S(-) aumentou de forma significativa ($P < 0,05$) a LIN em comparação ao controle.

Os resultados do presente estudo revelaram que o limoneno (S)-(-) não alterou os parâmetros de cinética espermática, não apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos. A motilidade é o mais importante indicador *in vitro* da capacidade de fertilização do espermatozóide (Vijayaraghavan et al. 2003). Embora os efeitos do limoneno durante o criopreservação de espermatozoides não tenham sido descritos anteriormente, Hossain et al. (2007) observaram um aumento na motilidade de espermatozoides suínos, após a adição de outros compostos a base de óleos, como o ácido oleico, ácido linoléico e araquidônico ao meio de diluição.

Tabela 1. Cinética pós-descongelamento de espermatozoides bovinos criopreservados em três concentrações diferentes (50, 100, 150 μM) de limoneno (S)-(-).

Parâmetros de motilidade	Tratamentos			
	Controle	Limoneno S(-) 50	Limoneno S(-) 100	Limoneno S(-) 150
MOP	19,8 \pm 3,8 ^a	10,8 \pm 8,8 ^a	20,2 \pm 15,2 ^a	12,3 \pm 3,2 ^a
VCL	62,3 \pm 9,4 ^a	50,7 \pm 12,8 ^a	68,4 \pm 22,8 ^a	57,8 \pm 12,3 ^a
VSL	30,0 \pm 6,3 ^a	20,7 \pm 6,0 ^a	32,8 \pm 13,4 ^a	23,6 \pm 3,8 ^a
VAP	39,6 \pm 8,5 ^a	29,7 \pm 8,6 ^a	43,3 \pm 15,8 ^a	31,3 \pm 1,3 ^a
LIN	39,6 \pm 8,3 ^b	40,5 \pm 2,0 ^{ab}	47,1 \pm 4,1 ^{ab}	41,6 \pm 7,6 ^{ab}
SRT	75,7 \pm 2,5 ^a	69,6 \pm 0,9 ^a	75,0 \pm 4,4 ^a	69,5 \pm 8,5 ^a
WOB	63,1 \pm 4,1 ^a	58,2 \pm 3,4 ^a	62,7 \pm 3,9 ^a	59,6 \pm 4,3 ^a
ALH	2,7 \pm 0,1 ^a	2,6 \pm 0,6 ^a	2,7 \pm 0,5 ^a	2,6 \pm 0,3 ^a
BCF	10,3 \pm 1,0 ^a	10,8 \pm 0,3 ^a	11,3 \pm 1,1 ^a	12,0 \pm 1,2 ^a

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

MOP - motilidade progressiva; VCL - velocidade curvilínea; VSL - velocidade em linha reta; VAP - velocidade média de percurso; LIN - linearidade; STR - retilinearidade; WOB - Oscilação; ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e BCF - frequência de batimentos de cauda; Valores de média com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a suplementação de limoneno (S)-(-) ao diluidor de criopreservação do sêmen em bovinos, não interferiu na cinética espermática.

Referências

- Berger RG, Krings U, Zorn H.** Biotechnological flavour generation. In: Taylor A, ed. Food flavour technology. Sheffield, Sheffield Academic Press, 2002. p.60-104.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl, v.11, p.73-88, 1990.
- Hossain MDS, Tareq KMA, Hammano K, Tsujii H.** Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. Reprod Med Biol, v.6, p.235-239, 2007.
- Poulose SM, Harris ED, Patil BS.** Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. Journal of Nutrition, v.135, p.870-877, 2005.
- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, Mcmanus J, Lutton D, Lewis SEM.** Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF, Reproductive BioMedicine Online. v.26, p.68-78, 2013.
- Songsasen N, Leibo SP.** Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. Cryobiology, v.35, p.255-269, 1997.
- Vijayaraghavan S.** Sperm motility: patterns and regulation. Introduction to mammalian reproduction. Springer US, 2003. 79-91.
- Yoshida M.** Conservation of sperms: current status and new trends. Anim Reprod Sci, v.60-61, p.349-355, 2000.



Acompanhamento ovariano de vacas *Bos indicus* submetidas a protocolo de superovulação

Accompaniment ovarion of cows Bos indicus under protocol superovulation

Brenda Karine Lima do Amaral^{1,*}, Ricardo de Macêdo Chaves⁶, Fernando Andrade Souza⁵, Hélder de Moraes Pereira³, Diego Santos Almeida², Sérgio Henrique Costa Júnior¹, Felipe de Jesus Moraes Júnior⁴

¹Graduando em Medicina Veterinária- CCA/UEMA; ²Mestre em Ciência Animal- CCA/UEMA; ³Professor do Departamento de Clínicas- CCA/UEMA; ⁴Bolsista de Pós-Doutorado- Mestrado em Ciência Animal- CAPES/UEMA; ⁵Professor do Centro de Ciências Biológicas e das Naturezas-CCBN/UFAC; ⁶Professor Adjunto I- Departamento de Clínicas- CCA/UEMA, São Luis, MA, Brasil.

*Email: brendakarinelima@gmail.com

Abstract

The objective was to monitor ovarian follicular development cows Gir, submitted to superovulation protocol. Using 10 heifers, subject to three exam sessions gynecologic these being on day 0, day 4 and day 7, where on day 0 performed before beginning the superovulation protocol in order to select those that showed no change in the reproductive tract and had corpus luteum active, while on day 4 and day 7 held in the days of superstimulatory protocol, in order to quantify the follicles and evaluate follicular growth each female. With the measurement of the follicles, it resulted three-averages 7,6 mm; 7,7mm and 10,0mm for the respective day, day 0, day 4 and day 7. It was concluded that cows submitted to superovulation protocol presented ovarian follicle growth over the days evaluated by ultrasound and significant number of corpora lutea at the moment of embryo collection.

Keywords: bovine, follicle dynamics, superovulation.

Palavras- chave: bovino, dinâmica folicular, superovulação.

Introdução

De acordo com Nilsson et al. (2001), a foliculogênese é definida como um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade. Diante disso, criaram-se os protocolos de superovulação, com o objetivo de aproveitar de forma mais racional os folículos que se tornariam atresícos. Sendo a superovulação associada à transferência de embriões (TE) uma biotecnologia da reprodução que geralmente utiliza gonadotrofinas à base de FSH (hormônio foliculo estimulante) para estimular o desenvolvimento de um maior número de folículos para ovulação. Dessa forma, os efeitos de dominância são neutralizados, a divergência impedida e o desenvolvimento simultâneo de vários folículos com características fisiológicas semelhantes daqueles selecionados para ovularem, torna-se possível (Reichenbach et al, 2008). Para tanto, objetivou-se com esse estudo acompanhar o desenvolvimento folicular ovariano de novilhas GIR submetidas ao protocolo de superovulação

Material e Métodos

O experimento foi realizado na cidade de São Luís, Maranhão, no Núcleo de Ruminantes da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Utilizando 10 novilhas da raça Gir (*Bos indicus*), que foram submetidas a exames ginecológicos prévio com auxílio de um ultrassom da marca CHINSON 600 VET. Em seguida deu-se início ao protocolo de superovulação (Fig. 1). No dia 0 (06:30h) foi introduzido um dispositivo intravaginal de progesterona (1,0 g P4) + 2 mg de benzoato de estradiol. A superestimulação foi induzida com FSH-p (100mg de Folltropin-V) em 8 doses decrescentes a cada 12 horas (06h30min – 18h30minh), a partir do dia 4. No dia 7, foram administradas duas doses de 25 mg de Prostaglandina F2 α com intervalos de 12 horas (06:30 – 18:30), junto com a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona. No dia 8 foram administrados 25 mg de GnRH 24 horas após a primeira dose de PGF. As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo, onde foi realizada duas inseminações no dia 8, no turno da tarde, e no dia 9, no turno da manhã, após 18 horas a aplicação do indutor de ovulação (GnRH). As avaliações ultrassonográficas se iniciaram no dia 0, no dia da indução do cio. A dinâmica folicular foi monitorada a cada 12 horas do dia 4 e do dia 7, com objetivo de observar o crescimento folicular e no dia 8 e no dia 9, no momento da realização de inseminação e observar a taxa de ovulação. No dia 15 foi realizado outro acompanhamento com objetivo de quantificar os corpos lúteos formados e folículos anovulatórios.

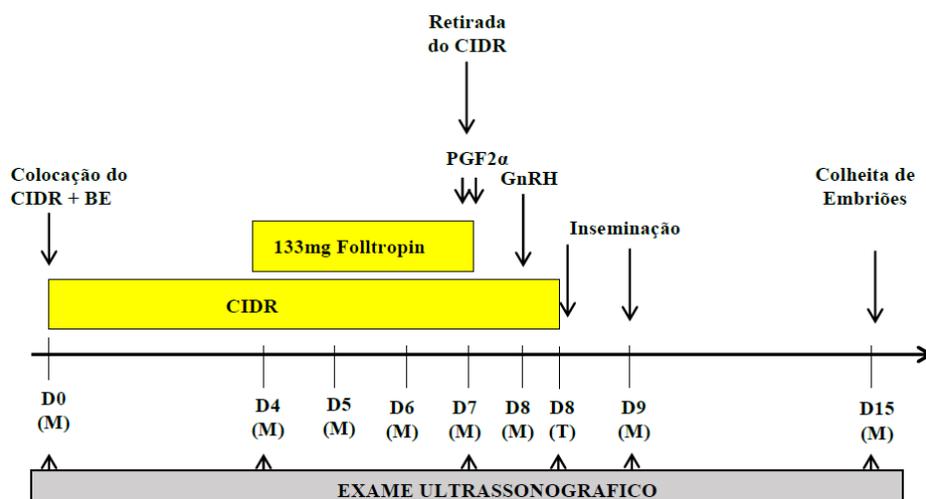


Figura 1: Protocolo de superovulação e exames ginecológicos

Resultados e Discussão

No dia 0, dia 4 e dia 7 obteve-se média e desvio padrão $7,6 \pm 2,5$; mm; $7,7 \pm 2,4$ mm; $10 \pm 2,4$ mm, respectivamente, conforme Tabela 1. De acordo com o resultado obtido, nota-se que as fêmeas responderam de forma satisfatória ao protocolo de superovulação, demonstrando um crescimento folicular até o último dia de avaliação. Observa-se que a média do diâmetro folicular no D7 estão de acordo com os padrões normais preconizados para *Bos indicus*, onde o diâmetro médio para que o folículo atinja a capacidade ovulatória é de 7,0 a 8,5 mm (Gimenes et al., 2005). No dia 0, dia 4 e dia 7 obteve-se um número total de folículos de 25; 54 e 73, respectivamente. Sendo divididos em dois grupos: folículos ≥ 8 mm e folículo < 8 mm, tendo como média e desvio padrão $1,5 \pm 0,9$; $2,3 \pm 1,8$ e $6,7 \pm 5,2$ para o primeiro grupo, e para o segundo grupo a média e desvio padrão de $1,6 \pm 0,5$; $4,5 \pm 2,6$ e $2,4 \pm 2,9$ para o dia 0, dia 4 e dia 7, respectivamente, conforme Tabela 2. De acordo com Martins et al. (2008), relataram que o número de folículos $\geq 7,5$ mm no D7, obteve-se média e o desvio padrão de $12,5 \pm 1,0$, utilizando 12 fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*), que difere dos resultados no presente estudo, onde o número de folículos ≥ 8 mm no D7, por animal, obteve-se média e desvio padrão de $6,7 \pm 5,2$, utilizando 10 fêmeas bovinas da raça Gir, mostrando-se inferior a raça Nelore.

Tabela 1. A média e desvio padrão (mm) do diâmetro total de cada dia de avaliação ultrassonográfica.

DIAS	$\bar{x} \pm DP$
D0	$7,6 \pm 2,5$
D4	$7,7 \pm 2,4$
D7	$10,0 \pm 2,4$

Tabela 2: Número total de folículos e média e desvio padrão de folículos ≥ 8 mm e < 8 mm dos dias de avaliação ultrassonográfica.

DIAS	Nº TOTAL DE FOLÍCULOS	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
		FOLÍCULO ≥ 8 mm	FOLÍCULO < 8 mm
D0	25	$1,5 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,5$
D4	54	$2,3 \pm 1,8$	$4,5 \pm 2,6$
D7	73	$6,7 \pm 5,2$	$2,4 \pm 2,9$

Conclusão

As fêmeas bovinas obtiveram resposta satisfatória frente ao protocolo de superovulação, devido seus folículos ovarianos apresentarem crescimento ao longo dos dias avaliados por ultrassonografia e apresentarem



número expressivo de corpos lúteos no momento da colheita de embrião.

Referências

Gimenes LU, Sá Filho MF, Madureira EH, Trinca LA, Barros CM, Baruselli PS. Estudo ultrassonográfico da divergência folicular em novilhas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33 (Supl 1), p.210, 2005.

Martins CM, Santos ICC, Valentim R, Sales JNS, Reis PO, Crepaldi GA, Baruselli PS, D'Occhio MJ. Efeito da redução do número de administrações de FSH na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. *Acta Scientiae Veterinariae* 2008, in press.

Nilsson E, Parrot JA, Skinner MK. Basic fibroblast factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.175, p.123-130, 2001.

Reichenbach HD, Oliveira MAL, Lima PF, Santos Filho AS, Andrade JCO, Filho FT, Santos MHB, Filho BDO, Meirinhos MLG. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, 2ªed. São Paulo, Ed. Roca, p.201-239, 2008.



Análise comparativa do sistema reprodutor de vacas recém paridas por palpação transretal e ultrassonografia

Comparative analysis of newly calved cows by rectal palpation and ultrasound

Vitória Yuki Endo*, Karoline Antunes de Albuquerque, Maysa Ceci Soares Muniz, Marcos Roberto Strattmann, Paulo Fernandes de Lima, Cláudio Coutinho Bartolomeu

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*E-mail: vitoriaye@gmail.com

Abstract

This study aimed to compare the accuracy of two diagnostic methods, rectal palpation and transrectal ultrasound of the ovaries, and assess the reliability of the diagnosis by palpation method. A total of sixteen (16) dairy farm cows underwent ultrasonographic examinations performed soon after rectal palpation. The accuracy of palpation may seem low, but when we analyze the data, we observed that the main structures diagnosed by ultrasound were almost always diagnosed by palpation. Ultrasonography, however, has its strong point in the identification of complex structures such as hemorrhagic body and follicular cysts. We conclude that ultrasound as well as rectal palpation can be used as a diagnostic tool, although ultrasound provides good visualization of ovarian structures, allowing their measurement.

Keywords: reproduction, palpation, ultrasound.

Palavras-chave: reprodução, palpação, ultrassonografia.

Introdução

Em uma vacaria com alta exploração comercial, o objetivo final de um animal torna-se produzir e isso implica conseqüentemente em sua reprodução. O diagnóstico do sistema reprodutor pela palpação retal é um método bastante utilizado e descrito por grande parte dos autores (Noakes, 1992; Nascimento, 2003; Hafez, 2004) como um método eficaz e de boa confiabilidade. No entanto, o método exige além dos conhecimentos teóricos, uma certa experiência prática para que o diagnóstico seja fidedigno. Como alternativa para a palpação transretal tem-se a ultrassonografia e a dosagem hormonal (Hafez, 2004). Com o aumento da acessibilidade aos aparelhos de ultrassonografia, esta técnica tem se tornado um meio diagnóstico cada vez mais utilizado na rotina da clínica veterinária, em especial na área da reprodução. O presente estudo teve como objetivo analisar a taxa de precisão da palpação retal para mensuração dos ovários quando comparada com a ultrassonografia transretal, e desta forma, avaliar a confiabilidade do diagnóstico pelo método da palpação.

Material e Métodos

Os dados foram colhidos em uma vacaria em Oura, Portugal; onde eram realizados exames reprodutivos e atendimentos gerais. As vacas escolhidas encontravam-se no pós-parto e não inseminadas, justamente para poder examinar seu ciclo nos exames. Dentre as visitas feitas à propriedade, foram coletados dados referentes a três dessas visitas, somando um total de dezesseis (16) animais. Todas as vacas eram da raça holandesa, com média de produção acima de 40 litros por dia, em regime intensivo de criação. As palpações foram realizadas a partir das 10 horas da manhã, com os animais devidamente contidos.

Foram utilizadas luvas de palpação, vaselina líquida para lubrificar as luvas e gel à base de água a fim de melhorar o contato da sonda com a mucosa. O objetivo da palpação foi a identificação dos ovários e sua estruturas, juntamente com suas dimensões. As ultrassonografias eram realizadas logo após as palpações, de forma a causar o mínimo de estresse possível para o animal, além de evitar quaisquer alterações nas estruturas, como sangramentos da mucosa digestiva, por exemplo. Foi utilizado um aparelho de ultrassom portátil Aloka 500 equipado com um transdutor linear de 5 MHz. Ambos os resultados, da palpação e ultrassonografia, foram registrados juntamente com o número do animal, sua data de parição, e os dados organizados em ordem cronológica e divididos em três grupos.

Resultados e Discussão

Os resultados dos exames de palpação retal foram comparados com os resultados das ultrassonografias; sendo analisados individualmente, em percentual de acerto, e posteriormente foi feita uma média com esses resultados. A Tabela 1 demonstra os resultados obtidos nos exames de palpação retal e de ultrassonografia transretal, tanto do ovário direito como esquerdo. Na Tabela 2, é possível avaliar a taxa de acerto obtida na palpação retal quando comparada com a ultra-sonografia. As taxas de acerto foram calculadas individualmente por ovários e o percentual total de acertos corresponde a media dos mesmos. A média de acertos ficou em torno de 65% (Tab. 2).



Tabela 1. Resultados obtidos no exame de palpação retal juntamente com a ultrassonografia transretal.

	Nº do animal	Dias do parto (P)	Palpação retal VS. Ultrassonografia Transretal			
			Ovários (palpação)		Ovários (ultrassom)	
			Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
GRUPO 1	555	47	1F<10, CL	2F<10	2F, CL	1F
	2078	57	1F~15	S/E	1F~23	1F~15
	515	85	1F~20, CL	1F~12	1F~20, 1F<10, CL	1F~10
	147	105	1F~20, 1F<10	S/E	2F~20	S/E
	336	99	1F~15, 1F<10, CL	2F<10	1F~20, 1F~14, CL	2F<10
	468	45	S/E	1F220, 2~3F<10, CL	2F	Corpo Hemorrágico
	588	30	2F~10, CL	1F<10	1F 20	1F<10
	241	50	Cisto~35	S/E	Cisto~35mm	S/E
GRUPO 2	273	45	2F~15	1F~5	3F~10, 10, 15	S/E
	552	45	CL, 1F<10	1F~15	CL	1F~20
	147	108	2F<15	CL	2F~15	CL
	493	40	1F<10	CL, 2F~15	1F<10	CL, 2F~15
GRUPO 3	422	52	S/E	1F~30	S/E	CL, 1F~25
	441	35	S/E	Cisto~22	S/E	Cisto~30
	560	31	1F~10, CL	1~2F < 10	2F<20, CL	S/E
	158	101	1F~20, CL	1F < 10	1F~30, CL	S/E

*Animais divididos em três grupos. As siglas “F” para folículo, “CL” para corpo lúteo, “s/e” para vários ovários sem estruturas visíveis. Os valores para as dimensões das estruturas são todos em milímetro.

Tabela 2. Acertos individuais por animal assim como a média dos mesmos, juntamente com as médias totais por ovário e combinadas.

Nº da vaca	Dias do parto (P)	Acertos individuais (%)		Média de acertos (%)		Média Geral (%)
		OD	OE	OD	OE	
555	47	0; 100; 100	0; 100	66,6	50	58,3
2078	57	65,2	0	65,2	0	32,6
515	85	0; 100; 100	83,3	66,6	83,3	74,95
147	105	100; 50	100	75	100	87,5
336	99	66,6; 100	100; 100	83,3	100	91,65
468	45	0	0	0	0	0
588	30	50; 0; 0	100	16,6	100	58,3
		TOTAL		69.50625	60.30625	64.90625

*As taxas de acerto (em %) foram calculadas com base nos dados presentes na tabela 1.

Para o animal de número 2078, obteve-se uma taxa de acerto, pois o ovário esquerdo, que na palpação não apresentou estruturas, apresentou um folículo com 15 mm na ultrassonografia (difícil de ser detectado); que em termos de diagnósticos reprodutivos não possui grande relevância, pois seu tamanho ainda está longe de ser pré-ovulatório, e seria detectado em uma próxima palpação, se tivesse continuado a crescer (Nascimento et al., 2003).

O animal de número 468 apresentou no ovário esquerdo, um corpo hemorrágico grande (> 50 mm) com estrutura irregular, que se assemelhava a folículos e corpos lúteos, à palpação.

No grupo dois, o animal de número 273 chamou a atenção pelos resultados obtidos. A baixa taxa de acerto para esse animal é semelhante aos outros dois. No ovário direito, à palpação observaram-se dois folículos de 15 mm que durante a ultrassonografia revelaram-se três folículos, dois deles com 10 mm e um último de 15 mm. Com a imagem obtida, foi possível observar que os folículos encontravam-se agrupados, tornando-se difícil determinar suas exatas localizações, bem como seus tamanhos.

No grupo três, o ovário esquerdo do animal de número 560 apresentou estruturas que se assemelhavam com folículos < 10mm à palpação. Porém, a ultrassonografia deste ovário não demonstrou nenhuma estrutura.



Algumas estruturas maiores e mais características, dificilmente são confundidas, como os achados no animal 241 do grupo 2 (Carreira, 2008). Este possuía um cisto folicular no ovário direito, já identificado na palpação e confirmado com a ultrassonografia. Resultado semelhante ao animal 441 do grupo 3, que apresentou um cisto folicular de 22 mm à palpação e confirmado pela ultrassonografia (30 mm). Segundo Nascimento et al. (2003), os cistos geralmente são encontrados com dimensões superiores a 25 mm.

Conclusão

Apesar da necessidade de um investimento econômico inicial para a aquisição do aparelho de ultrassom, este é extremamente útil para a identificação e medição de estruturas complexas, tais como corpos hemorrágicos e cistos foliculares. Conclui-se que apesar da precisão da palpação parecer baixa, as estruturas de real importância confirmadas pela ultrassonografia quase sempre são também diagnosticadas pela palpação. Desta forma, tanto a ultrassonografia quanto a palpação retal podem ser métodos eficazes de diagnóstico.

Referências

- Carreira RP.** Workshop de Manejo e Ecografia Reprodutivos em Bovinos. Vila Real, 5 e 6 de abril de 2008.
Hafez ESE, Hafez B. Reprodução Animal. Editora Manole. 7ª ed., 2004; 401, 402, 80p.
Nascimento EF, Santos RL. Patologia da reprodução dos Animais Domésticos. 2ª ed. 2003, 25-27p.
Noakes DE. Fertilidade e Obstetrícia nos Bovinos. Andrei, 1ª ed., 1992, 29, 33, 41p.
Smith BP. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. Manole, 1ªed., 1993, 146, 147p.



Associação entre o diâmetro folicular, no momento da retirada do implante de progesterona, e a taxa de ovulação de vacas após protocolo de sincronização

Association between follicular diameter at the time of removal of the progesterone and ovulation rate of cows after to the synchronization of ovulation protocol

Renato Pinto Corrêa^{1,*}, Atimaan da Silva Franco¹, Fábio Trindade Gonçalves¹, Tomaz Pina Maia², Beatriz do Amaral Victor³, Aluizio Otavio Almeida da Silva⁴, Adriana Novaes dos Reis⁴, José Silva Sousa⁴

¹Programa de Residência em Clínica Médica e Reprodução de Ruminantes e Equídeos, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil; ²REPROGEN – Reprodução e Genética, Castanhal, Pará, Brasil; ³Curso de Medicina Veterinária - Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, Pará; ⁴Central de Biotecnologia de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: renatoveterinario2010@gmail.com

Abstract

The experiment was conducted at the Center of Biotechnology and Animal Reproduction (CEBRAN-UFPA), in the municipality of Castanhal, Pará State. The herd consisted of 24 crossbred cows with body condition score ranging between 2.5 and 3.5, divided randomly into 2 groups (G1 and G2) which were managed with different protocols. G1 (D0-Be+P4 implant; D7-Pgf2; D9-measurement of the largest follicle + CE + eCG; D11- new measurement of FD and D15- verification of the presence or absence of CL and its measurement) G2 (D0-Be + P4 implant, removal of implant D8 + FSH; D9- BE; D10-measurement of FD; D14- verification of the presence of CL). Therefore, is possible the identification and selection of animals subjected to the synchronization protocol for IATF.

Keywords: *foliclle, diameter, ovulation.*

Introdução

A busca por avanços na produção agropecuária tem levado ao desenvolvimento de tecnologias que visem aumentar a produtividade a campo. A inseminação artificial é uma técnica que vem crescendo constantemente, tendo a expectativa de aumento de 15% para o ano de 2016 (PARONETO, 2016), porém há animais que não exteriorizam o cio, por conta de parto recente, alta temperatura, alta produção de leite entre outros, com isso, a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) veio para complementar a IA, visto que são utilizados hormônios que induzem o estro em fêmeas em anestro ou com irregularidade no ciclo estral. Entretanto, os protocolos têm um custo elevado por conta destas substâncias.

O diâmetro folicular é diretamente proporcional a taxa de ovulação e de concepção, logo quanto maior o diâmetro folicular, maior a probabilidade da fêmea ovular, além de ovular um oócito de melhor qualidade, e conseqüentemente maior chance de ser fecundado (Ribeiro Filho et al., 2013). Com isso a avaliação ovariana no momento da retirada do implante de progesterona auxilia na identificação de fêmeas que possivelmente irão ovular e que formarão um melhor corpo lúteo, assim como, identificarão prováveis fêmeas que não irão ovular e poderão ser retiradas do protocolo, diminuindo os custos de todo o processo.

O objetivo do presente experimento foi avaliar associação entre o diâmetro folicular, no momento da retirada da fonte de progesterona, e a taxa de ovulação de vacas mestiças após serem submetidos aos protocolos de sincronização da ovulação para IATF.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN-UFPA), localizada no município de Castanhal, Estado do Pará. O rebanho foi constituído por 24 fêmeas bovinas mestiças, com escore de condição corporal variando entre 2,5 e 3,5, divididas de modo aleatório em 2 grupos (G1 e G2), os quais foram manejados com protocolos distintos. Os animais foram mantidos em regime de estabulação com alimento e água a vontade. As fêmeas do grupo G1 foram submetidas ao implante intravaginal de progesterona (1g, PRIME[®] - TECNOPEC) e a aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC BE[®] - TECNOPEC) no D0. No D7 foi feita a aplicação da 0,15 mg prostaglandina (Prolise[®] - TECNOPEC), e no D9 foi realizada a retirada do implante e a mensuração do maior folículo identificado (FD). Além disso, foi efetuada a aplicação de 0,6 mg Cipionato de Estradiol (ECP[®] - Pfizer Saúde Animal) e 300 UI de eCG (Novormon[®] - ZOETIS). No D11, momento que seria feita a IATF, foi realizada uma nova mensuração do FD e no D15 realizou-se a verificação da presença ou não do CL e sua mensuração. Nas fêmeas do grupo G2 foi utilizado o implante intravaginal de progesterona (1g; PRIME[®] - TECNOPEC) e 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC BE[®] - TECNOPEC) no D0, no D8 foi feita a retirada do implante e a mensuração do maior folículo (FD) identificado, também a aplicação de 10 mg de FSH (Folltropin[®] - TECNOPEC). No D9 foi realizada a aplicação de 1 mg Benzoato de Estradiol (RIC BE[®] - TECNOPEC). No D10 momento que seria feita a IATF realizou-se uma nova mensuração do FD e no D14 realizou-se a verificação da presença ou não do CL e sua mensuração.



O diâmetro do FD presente em cada momento descrito foi identificado, mensurado e categorizado em <7,5 mm ou >7,5 mm. Os ovários foram examinados com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (DP-2200 VET – Mindray) e sonda de 5 MHz.

Para análise estatística considerou-se as variáveis diâmetro do FD e taxa de ovulação. As análises foram realizadas através do teste de Qui quadrado.

Resultados e Discussão

A taxa de ovulação geral foi igual para ambos os protocolos de sincronização 66,6%. O diâmetro do folículo dominante no momento da retirada do implante de progesterona apresentou associação positiva com a taxa de ovulação ($P < 0,05$), visto que foi observado que a taxa de ovulação foi maior nas fêmeas que apresentaram folículo com diâmetro >7,5 mm no momento da retirada do implante (100%) em ambos os protocolos. As vacas com FD com diâmetro <7,5 mm obtiveram uma taxa de ovulação de 20% e 42,8%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Associação entre o diâmetro do FD no momento da retirada do implante e as taxas de ovulação das fêmeas dos grupos G1 e G2.

	Diâmetro do FD	
	<7,5 mm	>7,5 mm
Taxa de Ovulação G1 (%)	20% ^a	100% ^b
Taxa de Ovulação G2 (%)	42,8% ^a	100% ^b

No presente estudo as vacas com FD maior no momento da retirada do implante de progesterona, também apresentaram maior FD no momento da IATF. De acordo com Burke et al. (2001) a indução da ovulação de folículos maiores e maduros leva ao aumento da taxa de ovulação, maior diâmetro de corpo lúteo formado e o aumento da concentração de progesterona no ciclo subsequente. Quando se levou em consideração o momento da ovulação, a maioria das fêmeas que apresentaram FD <7,5 mm no momento da retirada do implante, tiveram ovulações antes do momento da IATF, concordando com trabalho realizado por Sá Filho (2012) trabalhando com fêmeas zebuínas, onde se obteve menor taxa de ovulação e de concepção para fêmeas com menor diâmetro folicular no momento da IATF.

Conclusão

É possível a identificação e seleção dos animais submetidos ao protocolo de sincronização para IATF que terão maior probabilidade de ovulação através da mensuração do tamanho do FD no dia da retirada do implante de progesterona, podendo serem selecionadas as fêmeas com folículo maior que 7,5 mm, aumentando com isso o índice de prenhez, além da economia de custos ao retirar animais do lote que não estão respondendo adequadamente ao protocolo.

Referências

- Burke CR, Mussard ML, Grum DE, Day ML.** Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.161-174, 2001.
- Paroneto M.** Setor de inseminação artificial dobra em dez anos e espera crescer 15% em 2016. Disponível em: <http://www.canalrural.com.br/noticias/jornal-da-pecuaria/setor-inseminacao-artificial-dobra-dez-anos-espera-crescer-2016-61110>. Acesso em 17 outubro de 2016.
- Ribeiro Filho AL, Ferraz PA, Rodrigues AS, Bittencourt TCBSC, Loiola MVG, Chalhoub M.** Diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas nelore. *Ciênc Anim Bras*, v.14, p.501-507, 2013.
- Sá Filho MF.** Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte. 2012. 124p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação: Reprodução animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012



Avaliação da atividade uterotrófica das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*

Evaluation of uterotrophic activity of pods Enterolobium contortisiliquum

Ingrid dos Santos Farias^{1,*}, Silvana Maria Medeiros de Souza Silva², Emanuelle Karine Frota Batista³

¹Graduanda Medicina veterinária, UFPI; ²Prof. Dra. Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária, UFPI; ³Doutorando em Ciência Animal, UFPI, Teresina, PI.

*Email: ingridosantofarias@gmail.com

Abstract

The *Enterolobium contortisiliquum* has been described as toxic to bovine causing digestive disorders, photosensitivity and abortions. This study aimed to evaluate the in vitro toxicity of ethanol extract of *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) fruit and its influence on uterotrophic trial in female rats. The ethanol extract of the fruit was obtained by cold maceration, lyophilized and stored in amber glass flasks. The experimental design for uterotrophic trial of EEtOH-Ec consists of nine groups, composed of six immature Wistar female rats. The treatments were administered from 21st to 25th postnatal day. After five days of treatment, the female rats were anesthetized (ketamine + xylazine) for blood sampling, then were euthanized by about the same anesthetic dose association to collect uterus and ovaries. The uterine relative masses did not differ and changes were not observed in the number of ovarian structures. EEtOH-Ec showed no estrogenic action, nor antiestrogen action in Wistar female rats.

Keywords: reproductive system, toxicity, tamboril.

Palavras-chave: sistema reprodutor, toxicidade, tamboril.

Introdução

Atualmente, são conhecidas cerca de 130 espécies de plantas de interesse pecuário no país (Tokarnia et al., 2012; Pessoa et al., 2013). No Piauí, dentre as plantas tóxicas que mais causam prejuízos à pecuária pode-se citar a *Enterolobium contortisiliquum* (Mello et al., 2010). A intoxicação por essa planta ocorre em após a ingestão de favas, e são descritos sinais clínicos caracterizados principalmente por transtornos digestivos, fotossensibilização hepatógena e abortos. Tanto caprinos quanto bovinos apresentam diarreia severa, podendo morrer em 2 a 3 dias ou então evoluírem para recuperação, alguns animais que estivessem prenhes abortariam e outros apresentariam fotossensibilização (Tokarnia et al., 1991; Grecco et al., 2002; Mendonça et al., 2009; Lemos et al., 2011). Estudos para detecção da toxicidade reprodutiva em fêmeas consistem na combinação de métodos, como avaliação do ciclo estral, da fertilidade, do peso de órgãos, histopatologia e quantificação corpos lúteos e de folículos ovarianos. Alguns ensaios experimentais in vivo foram desenvolvidos para identificação de substâncias químicas causadoras de desregulação endócrina em fêmeas. Destes, os mais utilizados são o teste uterotrófico (Baker, 2001). Portanto, este trabalho tem como objetivo investigar a possível ação estrogênica e/ou antiestrogênica do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) por meio do teste uterotrófico.

Material e Métodos

Foram coletados os frutos de *E. contortisiliquum* em propriedades nos municípios da região Norte do Piauí. O material vegetal foi dessecado em estufa de circulação de ar forçada durante sete dias a uma temperatura máxima de 45°C e, em seguida, triturados em moinho, obtendo-se assim um pó fino. O extrato etanólico do fruto foi obtido através da maceração a frio, com etanol PA. O material obtido, por fim, foi liofilizado, acondicionado em frascos de vidro âmbar e conservado à temperatura de 4-8°C. Para experimentação foram utilizadas ratas Wistar (*Ratus norvegicus*). Os animais foram alojados em gaiolas-padrão (lotação de 3 a 4 animais), forradas com cama de xilana, com água potável e ração *ad libitum*, mantidos em ambiente climatizado (24 ± 1°C). O delineamento experimental para ensaio uterotrófico do extrato etanólico de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) constou de nove grupos, compostos de seis ratas Wistar imaturas (21 ± 1 dia pós-natal). Os tratamentos foram administrados do 21º ao 25º dia pós-natal. Após os cinco dias de tratamento, as ratas foram eutanasiadas por sobre dose anestésica (ketamina + xilazina) para coleta de útero e ovários.

Resultados e discussão

Segundo avaliado, o extrato etanólico das vagens de *E. contortisiliquum* nas dosagens de 125mg/kg, 250mg/kg e 500mg/kg, não provocou alteração no peso relativo dos órgãos de Ratas Wistar em relação ao grupo controle negativo (Tab. 1). Em relação à atividade antiestrogênica, verificou-se que o peso relativo do ovário não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos, porém pode-se observar diferenças significativas no peso do útero no grupo Estradiol quando comparado aos grupos controle, EEtOH-Ec nas dosagens de 125, 250 e 500 mg/Kg, e ao Estradiol + EEtOH-Ec na dosagem de 125 e 250 mg/kg (Tab. 1).

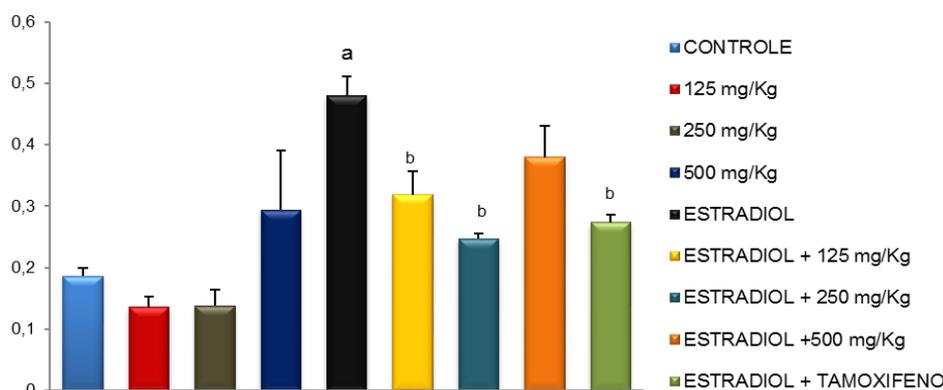


Figura 1. Teste uterotrófico. Massa do útero em relação a massa corporal de ratas Wistar imaturas. Resultados expressam média ± erro padrão. a – quando difere do controle; b – quando difere do Estradiol.

Tabela 1. Peso relativo do útero e ovários de ratas Wistar imaturas tratadas com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec).

Grupo	Dosagem (mg/Kg)	Parâmetros	
		Útero	Ovários
Controle		0,186 ± 0,014 ^a	0,097 ± 0,030
EEtOH-Ec	125	0,136 ± 0,018 ^a	0,167 ± 0,106
	250	0,138 ± 0,025 ^a	0,070 ± 0,125
	500	0,294 ± 0,097	1,149 ± 1,066
Estradiol	0,4	0,480 ± 0,042	0,082 ± 0,008
	125	0,319 ± 0,038 ^a	0,408 ± 0,197
Estradiol + EEtOH-Ec	250	0,247 ± 0,009 ^a	0,076 ± 0,009
	500	0,380 ± 0,005	0,090 ± 0,011
Estradiol + Tamoxifeno	0,4 + 1,0	0,323 ± 0,028 ^a	0,164 ± 0,019

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de Tukey. a – quando difere do Estradiol.

As massas relativas uterinas não diferiram entre os animais dos grupos tratados com a o extrato e aqueles que receberam apenas veículo, indicando que o extrato etanólico de *E. contortisiliquum* não demonstrou atividade estrogênica nas doses investigadas, quando comparados com a potência estrogênica do estradiol. Não foram observadas alterações no número de estruturas ovarianas das ratas tratadas com EEtOH-Ec, mostrando que o extrato não interfere na foliculogênese. Os resultados referentes à quantificação folicular ovariana, feita por meio da visualização de cortes histológicos, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Quantificação folicular de ratas Wistar imaturas tratadas com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec)

Grupo	Dose (mg/Kg)	Folículos					
		Primordiais	Primários	Secundários	Terciários	Atrésicos	Corpo lúteo
Controle		5,50 ± 1,55	9,00 ± 3,37	10,5 ± 1,50	0,50 ± 0,29	5,0 ± 0,71	1,25 ± 0,48
EEtOH-Ec	125	5,75 ± 1,11	8,25 ± 1,88	7,25 ± 1,65 b	0	7,25 ± 0,85	1,00 ± 0,71
	250	5,20 ± 2,27	6,40 ± 1,54	6,60 ± 1,83 b	0	10,0 ± 1,38 ^a	0,40 ± 0,40
	500	3,60 ± 1,36	4,60 ± 1,72	5,40 ± 0,93 b	0,2 ± 0,2	8,00 ± 0,37 ^c	1,20 ± 0,49
Estradiol	0,4	5,20 ± 1,20	6,4 ± 1,12	7,80 ± 1,02 b	0,60 ± 0,25	4,40 ± 0,51 ^c	0,25 ± 0,25
	125	10,75 ± 1,55	5,00 ± 1,68	7,25 ± 1,37 b	0	4,50 ± 0,64 ^c	0,75 ± 0,49
Estradiol + EEtOH-Ec	250	3,80 ± 1,2c	5,2 ± 1,56	9,2 ± 2,22 b	0,4 ± 0,25	4,60 ± 0,93 ^c	1,20 ± 0,37
	500	7,40 ± 1,08	8,20 ± 1,71	8,8 ± 2,24 b	0,8 ± 0,58	4,40 ± 1,29 ^c	2,8 ± 1,16
Estradiol + Tamoxifeno	0,4 + 1,0	6,00 ± 1,26	7,00 ± 1,79	1,50 ± 0,77	0,6 ± 0,4	4,00 ± 0,95 ^c	0

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de Tukey. a – quando difere do controle; b – quando difere do Estradiol + Tamoxifeno, c - quando difere do extrato 250 mg/Kg; d - quando difere do Estradiol + 125 mg/Kg.

Conclusão

Concluiu-se que o extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*, não apresentou ação estrogênica, nem ação antiestrogênica em Ratas Wistar, de acordo com a metodologia utilizada.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPQ.



Referências

- Baker VA.** Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro*, v.15, p.413-419, 2001.
- Grecco FB, Dantas FAM, Riet-Correa F, Leite CGD, Raposo J.** Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. *Veterinary & Human Toxicology*, v.44, p.160-162, 2002.
- Lemos RAA, Guimarães EB, Carvalho NM, Nogueira APA, Santos BS, Souza RIC, Cardinal SG, Kassab HO.** Plant poisonings in Mato Grosso do Sul. In: Riet-Correa F, Pfister J, Schild AL, Wieren GA T. (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins**, CAB International, Wallingford, U.K. 2011. p.68-72.
- Mello GWS, Oliveira DM, Carvalho CJS, Pires LV, Costa FAL, Riet-Cor-Rea F, Silva SMMS.** Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.1-9, 2010.
- Mendonça FS, Evêncio-Neto J, Evêncio LB, Dória RGS, Freitas SH, Pelegrini LF, Cruz RAS, Ferreira EV, Colodel EM.** Natural and experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. *Acta Veterinaria Brno*, v.78, p.621-625, 2009.
- Pessoa CRM, Medeiros RMT, Riet-Correa F.** Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.752-758, 2013.
- Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Döbereiner J.** Plantas Tóxicas do Brasil. 2ª ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 2012, 566p.
- Tokarnia CH, Peixoto PV, Gava A, Döbereiner J.** Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v.11, p.25-29, 1991.



Avaliação da integridade da membrana plasmática e do potencial de atividade mitocondrial de sêmen criopreservado de touros frente a ação do (Limoneno (R)-(+))
Evaluation of plasma membrane integrity and mitochondrial activity potential of cryopreserved semen of bulls on action of the Limonene (R) - (+)

Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco^{1*}, Marlon de Araújo Castelo Branco¹, Antonio de Sousa Junior², Viviany de Sousa Rodrigues¹, Felipe de Jesus Moraes Junior³, Luanna Soares de Melo Evangelista¹, Isolda Márcia Rocha do Nascimento², José Adalmir Torres de Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil; ²Colégio Técnico Agrícola, CTT, Teresina, PI, Brasil;

³Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: yndyranayan1@hotmail.com

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of different concentrations of limonene (R)-(+)) (50 µM, 100 µM and 150 µM) in supplementing the diluter of bulls freezing semen. Thirty-six ejaculated from four Curraleiro-Pé-Duro bulls were used for cryopreservation. The epifluorescence microscopy was used to determine the plasmatic integrity and mitochondrial activity potential. No was observed effect on the integrity of plasma membrane nor mitochondrial activity potential when cryopreserved by adding limonene R - (+). The results obtained in this study allow to conclude that supplementation limonene (R) - (+) on diluter of bulls freezing semen does not interfere with the integrity of the plasma membrane or the potential of sperm mitochondrial activity.

Keywords: *criopreservação, limoneno, bull.*

Palavras-chave: *criopreservação, limoneno, touro.*

Introdução

Em bovinos o principal constituinte espermático afetado pelo processo de criopreservação é a membrana plasmática, sobretudo devido à alteração na composição lipídica (Hammerstedt et al., 1990), com perda de fosfolípidios totais (Darin-Bennett et al., 1973). Um dos fatores mais importantes que contribuem para a má qualidade do sêmen é o estresse oxidativo (EO). O stress oxidativo é uma condição associada a um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade de um sistema biológico para desintoxicar os intermediários reativos ou reparar o dano resultante (De Lamirande e Gagnon 1995).

O óleo essencial de limão (*Citrus limon*) é o principal subproduto das cascas do fruto, tendo como principais constituintes grandes quantidades de terpenos, sendo o limoneno o principal constituinte dessa fração (Berger et al. 2002). O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, é um monoterpene monocíclico que possui dois enantiômeros, o limoneno R-(+) e o limoneno S-(-), (Poulose et al., 2005). O limoneno trabalha através da reação com os radicais livres, reduzindo a sua atividade e prevenindo uma posterior reação em cadeia, e em seguida, eliminando os radicais livres (Poulose et al., 2005).

O objetivo deste experimento foi verificar o efeito do Limonene (R) - (+) na criopreservação espermática de touros sobre os parâmetros de integridade plasmática e potencial mitocondrial.

Material e Métodos

Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé Duro, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Durante o experimento, os touros foram mantidos sob regime extensivo, com acesso a piquetes de capim-mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim milhã (*Digitaria sanguinalis*), água e sal mineral à vontade. As coletadas de sêmen foram feitas uma vez por semana, durante nove semanas, com o auxílio de um eletro estimulador controlado automaticamente (Biocon[®] Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Imediatamente após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37°C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume, turbilhonamento, motilidade total e vigor, em microscópio de contraste de fase. Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3; motilidade total ≥ 80%; vigor ≥ 3; concentração espermática ≥ 3,5 X 10⁹ espermatozoides/mL e patologias espermáticas ≤ 20% foram utilizados nesse estudo. Quando aprovadas, amostras dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um *pool*, logo após a formação do *pool*, este foi dividido em quatro alíquotas e diluídas em meio Tris-Gema (37°C) contendo limoneno (R)-(+)) (50 µM, 100 µM e 150 µM), enquanto que uma alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,5mL (50 X 10⁶ espermatozoides viáveis por palheta) e congelado em maquina TK 3000[®] na curva de congelação rápida (-0,25° C/min, de 25° C a 5° C e -20° C/min, de 5° C a -120° C) e, após atingir -120° C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico. Após 30 dias de armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à integridade da membrana plasmática e potencial de atividade



mitocondrial, utilizando as sonda florescente DCF mais IP, e JC-1. O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro tratamentos: controle, limoneno (R)-(+ (50), limoneno (R)-(+ (100) e limoneno (R)-(+ (150) em nove coletas. Para comparação de média foi utilizado o teste paramétrico de Student-Newman-Keuls (SNK), na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

Resultados e Discussões

A qualidade dos espermatozoides, em termos de integridade da membrana plasmática, e potencial de atividade mitocondrial estão resumidos na Tab. 1. Não houve alterações significativas nos parâmetros de qualidade, entre os tratamentos estudados ($P > 0,05$).

Tabela 1. Integridade da membrana plasmática e potencial de atividade mitocondrial pós-descongelamento de espermatozoides bovinos criopreservados em três concentrações diferentes (50, 100, 150 μM) de (limoneno (R)-(+).

Tratamentos	Integridade da Membrana plasmática (%)	Potencial de Mitocondrial (%)
Controle	46.2 \pm 6.2	41.8 \pm 11.9
Limoneno R(+) 50	50.5 \pm 11.6	48.8 \pm 9.2
Limoneno R(+) 100	47.6 \pm 6.2	45.8 \pm 7.9
Limoneno R(+) 150	43.7 \pm 8.9	43.7 \pm 11.0

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

No presente estudo, não foi observado diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação à integridade da membrana plasmática e potencial de atividade mitocondrial, o que sugere que a presença do limoneno, nas concentrações utilizadas nesse estudo, não melhoram ($P > 0,05$) os parâmetros de qualidade de espermatozoides criopreservados de touro. Em um estudo anterior, Wittayarat et al. (2012) indicou que o antioxidante natural, chá verde (*Cammelia sinensis*), aumentou significativamente a motilidade espermática em humanos, porém não foram observados efeitos benéficos na membrana plasmática e na integridade acrossomal. Kalthur et al. (2012) demonstraram que a biotina pode melhorar a motilidade dos espermatozoides e a sobrevivência prolongada de sêmen descongelado. No entanto, outros elementos naturais, como óleo de palma, um óleo vegetal natural, mostraram efeitos nocivos sobre a motilidade dos espermatozoides humanos. Kiernan et al. (2013) relataram que a adição de ácido α -linolênico (ALA) (10 e 100 μM), ácido palmítico (100 μM) e ácido oléico (OA) (10 e 100 mM) em diluidores a base de citrato, com e sem gema de ovo, melhorou a motilidade progressiva, motilidade linear e a viabilidade de espermatozoides de touro refrigerados por 7 dias.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a suplementação de Limoneno (R)-(+ ao diluidor de criopreservação do sêmen em bovinos, não interferiu na integridade da membrana plasmática nem no potencial de atividade mitocondrial espermático.

Referências

- Berger RG, Krings U, Zorn H.** Biotechnological flavours generation. In 'Food Flavour Technology'. (Eds AJ Taylor.). (Sheffield Academica Press, Sheffield), 2002.60-104p.
- Darin-Bennett A, Poulos A, White IG.** The effect of cold shock on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. *Australian J Biol Sci*, v.26, p.1409-1420, 1973.
- De Lamirande E, Gagnon C.** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*, v.10, p.15-21, 1995.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-88, 1990.
- Kalthur G, Salian SR, Keyvanifard F, Sreedharan S, Thomas JS, Kumar P, Adiga SK.** Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, v.29, p.631-635, 2012.
- Kiernan M, Fahey AG, Fair S.** The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reprod Fertil Dev*, v.25, p.947-954, 2013.
- Poulose SM, Harris ED, Patil BS.** Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *J Nutr*, v.135, p.870-877, 2005.
- Wittayarat M, Kimura T, Kodama R, Namula Z, Chatdarong K, Techakumphu M, Sato Y, Taniguchi M, Otoi T.** Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *CryoLetters*, v.33, p.318-326, 2012.



Avaliação da maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos a três diferentes sistemas de incubação

Evaluation of nuclear maturation of bovine oocytes submitted to three different incubation systems

Iana Sales Campelo^{1,*}, Thiago Victor Damasceno Teixeira², Mirelly Mirna Alves de Sousa Silva¹, Camila Muniz Cavalcanti¹, Luís Alberto Vieira³, José Ricardo de Figueiredo³, Arlindo de Alencar Araripe Moura², Vicente José de Figueirêdo Freitas¹

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil; ²Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil; ³Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folicúlos Ovarianos Pré-Antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*E-mail: ianasalescampelo@gmail.com

Abstract

This study aimed to evaluate three different incubation systems in nuclear maturation of bovine oocytes. Follicles of 2 to 8 mm in diameter were aspirated for obtaining cumulus-oocyte complexes (COCs). Thereafter, COCs were subjected to in vitro maturation (IVM) in TCM-199 medium supplemented at 38.5 °C for 23 h in different incubation systems: bench incubator with high oxygen (20% O₂ in air), bench incubator with low oxygen (5% O₂) and portable incubator with low oxygen. After IVM, cumulus cells were removed and oocytes were stained with Hoechst 33342. The slides were analyzed by a fluorescence microscope and the oocytes were classified into: degenerated (DG), metaphase I (MI) and metaphase II (MII). No difference (P > 0.05) was observed among the rates of DG, MI and MII for the different incubation systems. Therefore, the use of portable incubation system is a viable alternative for in vitro maturation of bovine oocytes.

Keywords: portable incubator, in vitro maturation, low oxygen.

Palavras-chave: incubadora portátil, maturação *in vitro*, oxigênio reduzido.

Introdução

Segundo dados do IBGE (2015), o rebanho bovino brasileiro classifica-se como o segundo maior rebanho mundial, com 215,2 milhões de cabeças, atrás apenas da Índia. A utilização de biotécnicas relacionadas à reprodução, tais como a inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões (PIVE) contribuíram para o desenvolvimento da bovinocultura nacional (Cavalieri *et al.*, 2015). O emprego da PIVE na pecuária proporciona um grande ganho genético aos rebanhos, tendo em vista a possibilidade da produção de um maior número de descendentes provenientes de um animal de genética superior. Torna-se também importante que esta biotécnica seja a mais simples e portátil possível. Com este intuito, o presente estudo objetivou avaliar três diferentes sistemas de incubação na maturação nuclear de oócitos bovinos.

Material e Métodos

Ovários bovinos foram obtidos em abatedouro comercial, transportados ao laboratório e submetidos a punção folicular. Folicúlos de 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados para a obtenção de complexos *cumulus*-oócito (CCOs), que foram classificados de acordo com Leibfried e First (1979). Os CCOs selecionados foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV). A MIV foi realizada em TCM-199 (M2154, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (12657-029; Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 0,1 mM de piruvato de sódio (P4562), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (E4127), 100 µM de cisteamina (M9768), 20 µg/mL de FSH/LH (Pluset, Hertape Calier, Barcelona, Espanha), 1 µg/mL de estradiol (E8875), 1% (v:v) de antibiótico-antimicótico (A5955) e 1 mM de L-glutamina (G8540) mantidos a 38,5°C por 23 h em três diferentes sistemas de incubação: incubadora de bancada (Thermo Fischer, Waltham, EUA) com oxigênio elevado (5% CO₂ em ar), incubadora de bancada (Eve, WTA, Cravinhos, Brasil) com oxigênio reduzido (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) e incubadora portátil (LabMix, WTA) com oxigênio reduzido. Após a MIV, as células do *cumulus* foram removidas por vórtex e os oócitos submetidos à coloração com Hoechst 33342 (B2261; Sigma-Aldrich): os oócitos foram lavados em PBS suplementado com 3 mg/mL de BSA (PBS_{BSA}) e posteriormente fixados em solução de 0,5% de glutaraldeído em PBS_{BSA} por 30 min. Após fixação, os oócitos foram lavados em PBS_{BSA} e submetidos a coloração com Hoechst (10 µM) por 15 min. Em seguida, os oócitos corados foram lavados em PBS_{BSA} e montados em lâminas cobertas com lamínulas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Eclipse E400, Nikon, Tóquio, Japão) munido de fluorescência e os oócitos classificados, de acordo com a conformação da cromatina, em degenerados (DG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII). As taxas obtidas foram comparadas pelo teste t de Student com significância de P < 0,05.



Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir de três repetições estão descritos na Tabela 1. Ao comparar as taxas de DG, MI e MII para os três diferentes sistemas de incubação, não ocorreram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre nenhum dos grupos avaliados. Na produção de embriões *in vitro*, Kumar *et al.* (2015) verificaram o efeito produtivo da baixa concentração de O_2 em búfalos, evidenciando que esta diferença pode estar mimetizando as condições *in vivo*. Desta forma, é possível verificar a viabilidade da utilização de incubadora portátil no processo de MIV de oócitos bovinos, pelo menos quando da utilização de atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5%). Esses resultados podem, portanto, colaborar para o aperfeiçoamento da técnica facilitando o transporte dos complexos *cumulus*-oócito provenientes de fêmeas alocadas em propriedades isoladas do meio urbano.

Tabela 1. Avaliação da maturação de oócitos bovinos (degenerado – DG, metáfase I – MI, metáfase II – MII) submetidos a diferentes sistemas de incubação.

Grupo Experimental	<i>n</i>	DG (%)	MI (%)	MI (%)	MII (%)
Thermo	81	14 (17,3) ^a	10 (12,3) ^a		57 (70,4) ^a
Eve	61	21 (34,4) ^a	9 (14,8) ^a		31 (50,8) ^a
LabMix	59	12 (20,3) ^a	13 (22,0) ^a		34 (57,6) ^a

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna mostram similaridade estatística ($P > 0,05$) pelo teste t de Student.

Conclusão

A utilização de um sistema de incubação portátil com baixa tensão de oxigênio (5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2) é uma alternativa viável para a MIV de oócitos bovinos, podendo a mesma ser utilizada na rotina em nível de campo.

Referências

- Cavaliere FLB, Andreazzi MA, Colombo AHB, Emanuelli IP, Moreski DAB, Silva WM.** Estudo sobre o cultivo *in vitro* de embriões bovinos durante o transporte. *Ars Veterinaria*, v.31, p.7-11, 2015.
- Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE).** Pesquisa Pecuária Municipal, Sistema IBGE de Recuperação automática – SIDRA, Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br, 2015.
- Kumar P, Verma A, Kumar M, Sachinandan D, Kumar R, Datta TK.** Expression pattern of glucose metabolism genes correlate with development rate of buffalo oocytes and embryos *in vitro* under low oxygen condition. *J Assist Reprod Genet*, v.32, p.471-478, 2015.
- Leibfried L, First NL.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci*, v.48, p.76-86, 1979.



Avaliação da temperatura de transporte de folículos ovarianos bovinos coletados nos períodos chuvoso e seco da região norte do Tocantins

Follicles transport temperature evaluation ovarian collected cattle in the rainy and dry seasons of the northern Tocantins

Ana Caroline Ongaratto Custódio¹*, Carolina Luciano Dal Sant¹, Isadora Afonso de Souza¹, Victor Moreira Gonçalves¹, Mariana Coelho Pinheiro Nunes¹, Ana Kelen Felipe Lima²

¹Aluno do curso de Medicina Veterinária, Campus de Araguaína, PIBIC/CNPQ; ²Orientadora do curso de Medicina Veterinária, Campus de Araguaína, TO, Brasil.

*E-mail: carolongaratto@hotmail.com; anakelen@uft.edu.br

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of temperature and transport time on the Cumulus Complex - oophorus (COC). We evaluated 181 cattle COCs obtained from 15 pairs of ovaries, and 743 ovarian follicles obtained from 30 pairs of ovaries subjected to histological processing. They evaluated the transport at 4°C and 37°C in the period of 6:18 hours. After aspiration, the COCs obtained were stained with Trypan Blue to verify the integrity of the cell membrane and / or oocyte, and made the counting of follicles. The ovaries transported at lower temperatures and in shorter time showed better viability, suggesting maintaining the integrity of the plasma membrane of cells COCs. As the temperature rises, the viability of COCs decreases as the number of follicles, suggesting damage to the membranes of such cells. Thus, it was concluded that COCs and ovarian follicles undergo with temperature and transport time.

Keywords: ovary, transport, temperature.

Palavras-chave: ovário, transporte, temperatura.

Introdução

O desenvolvimento de protocolos de conservação que permitam a manutenção da viabilidade folicular durante o transporte do ovário do local de coleta até o laboratório, bem como durante as manipulações que antecedem o cultivo *in vitro* faz-se necessário. Dentre os protocolos de transporte empregados, o resfriamento do tecido ovariano vem sendo realizado a 4 ou 20°C, por períodos que variam de 2 a 24 h, utilizando diferentes meios como solução salina 0,9% (Santos *et al.*, 2002), Braun-Collins (Carvalho *et al.*, 2001), à base de água de coco (Silva *et al.*, 2000) e PBS (Phosphat Buffer Saline - Silva *et al.*, 2002). Esses meios também foram utilizados na preservação de folículos pré-antrais à temperatura fisiológica (39°C) nos mesmos períodos de incubação (Matos *et al.*, 2004). Entretanto, para que isso seja possível, mesmo após longos períodos de preservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como: escolha do meio utilizado durante o processo de resfriamento, temperatura e tempo de preservação (Santos *et al.*, 2004).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade dos complexos cúmulos oophorus (COC) e dos folículos ovarianos obtidos de fêmeas bovinas abatidas no Matadouro Municipal de Araguaína, e verificar o efeito da temperatura e tempo de transporte, sobre a qualidade desses folículos.

Material e Métodos

Para a execução deste projeto foram utilizados 30 pares de ovários, provenientes do Matadouro Municipal de Araguaína e garrafas térmicas para o transporte. Os ovários foram transportados do abatedouro ao laboratório de Reprodução Animal da EMVZ/UFT em garrafas térmicas com temperaturas de 4°C e 37°C, contendo solução salina com 0,9% de NaCl, agrupados em 05 pares de ovário para cada coleta realizada.

No laboratório, os ovários foram retirados da garrafa térmica, despejados em um recipiente, e lavados com nova solução salina, mantidos em banho-maria a 37°C ou em isopor a 4°C. Os folículos antrais foram aspirados, para obtenção de complexos *cumulus oophorus* com seringa acoplada a agulhas 25x7 ou 25x8.

Após a aspiração, foram seccionados fragmentos dos ovários e estes submetidos a fixação com formol 10%. Posteriormente, os fragmentos ovarianos foram processados para análise histológica, com cortes seriados 5 mm de espessura, e cada quinta seção foi montada e corada com ácido periódico Schiff (PAS) -hematoxilina, e avaliadas através de um microscópio de luz (Nikon, Tokyo, Japão). Em cada tratamento, os folículos pré-antrais foram classificados em primordiais, primários e secundários, e quanto à sua viabilidade, em normais ou degenerados. Foi utilizado o teste G a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Foram avaliados 181 COCs bovinos a partir da coleta de 15 ovários, na estação chuvosa da região (Tab. 1).



Tabela 1: Viabilidade de complexos *cumulos oophorus* transportados a 6 e 18h.

Classificação	Temperatura				Total Geral
	4°C		37°C		
	Não corados	Corados	Não corados	Corados	
6 horas	31 (67%)aA	15 (33%)bB	32 (57%)aA	24 (43%)bB	
18 horas	18 (49%)aB	19 (51%)aA	11 (26%)aB	31 (74%)bA	
Total	49	34	43	55	181

Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) a,b linha A,B coluna.

Pode-se observar que os ovários foram transportados por um período de tempo de até seis horas apresentaram complexos *cumulos oophorus* com maior viabilidade (67%) do que aqueles que foram transportados por 18 horas (26%). Estudos recentes com bovinos apontam que os COCs parecem não sofrer influência da temperatura, quando transportados em solução salina a 4°C ou 37°C, no período de até três horas, durante a estação chuvosa (Custódio et al., 2014).

Os ovários transportados no tempo de seis horas apresentavam-se em bom estado de conservação, com aparência semelhante à quando coletados, e de fácil aspiração. Foram analisados 46 COCs na temperatura de 4°C, sendo destes 67% viáveis, e 56 COCs na temperatura de 37°C, onde deste 57% estavam viáveis. Diante dos valores podemos observar que não ocorre consideráveis diferenças entre as temperaturas de transporte. Porém levando em consideração a obtenção de melhores resultados, e a conservação dos ovários, o transporte a 4°C se torna mais eficiente. No tempo de 18 horas os ovários já se apresentavam descaracterizados e de difícil aspiração. Os transportados em 4°C apresentavam-se um pouco menos danificados, mais rígidos e ainda mantinham a coloração original, diferentemente dos de 37°C, que apresentavam-se mais degradados, mole a palpação, pálidos, e com odor fétido. Foram analisados 37 COCs na temperatura de 4°C, onde 49% apresentavam-se viáveis, e 42 COCs na temperatura de 37°C, sendo deste apenas 26% viáveis. O que indica que quanto menor a temperatura de transporte, mais conservados estes ovários e folículos iram se apresentar. Em um trabalho realizado com catetos, Lima (2014) obteve melhores resultados que estes, sendo 63,9% dos folículos viáveis utilizando PBS, transportados por 24H em 4°C.

Para a análise da morfologia dos folículos ovarianos, foram contados e avaliados 743 folículos quanto à integridade da morfologia dos folículos, obtendo os seguintes resultados descritos nos quadros abaixo:

Com a avaliação morfológica dos folículos, foi possível observar que a associação entre temperaturas mais amenas e um período de tempo menor de transporte de ovários, para obter bons resultados na manutenção da viabilidade folicular. Dos 318 folículos primordiais transportados a 4°C no tempo de seis horas, 52% apresentavam-se viáveis contra apenas 8% dos 169 contados a 37°C. O mesmo ocorrido é possível de observar com os demais FPA.

No tempo de transporte de 18 horas, a viabilidade dos folículos a 4°C diminuiu significativamente, quando comparado à 6 horas, apresentando 42% de viabilidade dos 160 folículos primordiais avaliados. E a 37°C 100% dos folículos foram considerados não viáveis, comprovando mais uma vez que temperaturas elevadas e longo período de tempo são prejudiciais aos folículos e células da granulosa. Trabalhos realizados com bovinos e seguindo uma linha de pesquisa semelhante indicam que temperaturas elevadas degeneram os folículos, como descrito por Luna (2010), que relata que no grupo exposto ao estresse calórico de seu trabalho, 42°C, todos os FPA analisados apresentaram alteração nuclear, caracterizada por condensação da cromatina. Este fato indica possível degeneração induzida pelo calor e mostra extrema sensibilidade dos FPA ao estresse calórico. Assim, o transporte de ovários bovinos por um curto período de tempo, em baixa temperatura mantém a viabilidade folicular.

Conclusão

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que a viabilidade dos COCs e dos folículos pré-antrais está diretamente relacionada com a temperatura e tempo de transporte.

Referências

- Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, Bão SN, Figueiredo JR.** Effect of Braun-Collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.195-208, 2001.
- Custódio ACO, Sousa AGCN, Lima BP, Lima AKF.** Efeito da temperatura de transporte ovariano sobre a qualidade dos COC bovinos: resultados preliminares. 41º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, onde foi em Gramado, RS, acesso em <http://sovergs.com.br/site/conbravet2014/area_13.htm>.
- Luna HS, Munhoz ALR, Zuccari CESN, Silva VB, Laura IA.** Efeito do estresse calórico in vitro em folículos pré-antrais de Bos indicus. *Veterinária em Foco*, v.8, p.80-88, 2010.
- Matos MHT, Andrade ER, Lucci CM, Bão SN, Silva JRV, Santos RR, Ferreira MAL, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and



TCM 199. *Theriogenology*, v.62, p.65-80, 2004.

Santos RR, Silva JRV, Costa SHF, Rodrigues APR, Lôbo RNB, Figueiredo JR. Effect of 0,9% Saline Solution and Phosphate Buffer Saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. *Braz J Vet Res Anim Sci*, São Paulo, v.39, p. 254-259, 2002.

Santos RR, Rodrigues APR, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. *Ciência Animal*, v.14, p.7-19, 2004.

Silva JRV, Ferreira MAL, Costa SHF, Santos RR, Carvalho FCA, Rodrigues APR, Lucci CM, Bao SM, Figueiredo JR. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goat. *Small Ruminant Res*, v.43, p.203-209, 2002.



Avaliação de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários com baixa e alta contagem de folículos antrais

Evaluation of bovine immature oocytes derived from ovaries with low and high antral follicle count

Maria Diana Cáritas Barros dos Santos, Maria Valéria de Oliveira Santos, Luanna Lorena Vieira Rodrigues, Pedro Henrique Fernandes de França, Maria Bárbara Silva, Luiza Bento de Queiroz Neta, Alana Azevedo Borges, Aleksandra Fernandes Pereira*

Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

*E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Abstract

The aim was to evaluate the quantity and quality of immature oocytes obtained from bovine ovaries with high and low antral follicle count (AFC). Therefore, ovaries were obtained from a slaughterhouse and the laboratory were divided in two groups: high count (HC: ≥ 20) and low count (LC: <20) follicles. After the follicular aspiration, retrieved oocytes were assessed by morphological appearance and brilliant cresyl blue test (BCB) in viable and non-viable. The data were analyzed by Fischer exact test ($P < 0.05$). After three replicates, 85 ovaries were recovered and distributed between the groups HC (22) and LC (63). There was no significant difference in the recovery rate. Furthermore, in the morphology and BCB test the viability rates were statistically similar between groups ($P > 0.05$). Therefore, it is concluded that the AFC does not influence the quantity and quality of oocytes.

Keywords: brilliant cresyl blue, morphological evaluation, *in vitro* embryo production.

Palavras-chave: azul cresil brilhante, avaliação morfológica, produção *in vitro* de embriões.

Introdução

O aumento da produtividade da pecuária mundial está intimamente associado à utilização de biotecnologias reprodutivas, especialmente a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Essa biotécnica tem como objetivo principal melhorar a eficiência reprodutiva de animais geneticamente superiores, aumentando o número de descendentes em um curto período de tempo (Stroebech et al., 2015). Nesse contexto, a espécie bovina vem sendo favorecida pela técnica de PIVE, destacando o Brasil no cenário mundial como o maior produtor de embriões bovinos por FIV usando a aspiração folicular *in vivo* (IETS, 2014). Contudo, apesar dos resultados positivos, a PIVE ainda apresenta limitações relacionadas principalmente a qualidade dos oócitos recuperados, especialmente quando se trata de animais de abatedouro onde se encontra a maior disponibilidade de material biológico. Inúmeros fatores podem influenciar na qualidade oocitária, dentre eles as características genéticas da fêmea são consideradas fundamentais. Nesse contexto, a contagem de folículos antrais (CFA) está diretamente relacionada ao padrão hormonal da fêmea, fator que influencia diretamente o desenvolvimento oocitário (Mossa et al., 2010). Diante disso, a CFA tem sido utilizada como parâmetro para prever o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas e, portanto, a qualidade dos seus gametas. Estudos anteriores mostram que fêmeas com elevada CFA apresentam desempenho reprodutivo superior quando comparadas àquelas de baixa CFA (Ireland et al., 2007; Mossa et al., 2012). Contudo, existe uma grande variabilidade quanto à classificação do número de folículos e resultados obtidos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a quantidade e qualidade de oócitos imaturos bovinos obtidos de ovários com alta e baixa CFA, de acordo com a população folicular das fêmeas criadas na região semiárida.

Material e Métodos

Ovários de vacas mestiças e histórico reprodutivo desconhecido foram obtidos em abatedouro local e transportados imediatamente para o laboratório em solução salina aquecida (NaCl 0,9%, 35-37°C), não ultrapassando o tempo de 2 h. No laboratório, ovários foram divididos de acordo com o número de folículos antrais (diâmetro 2-8 mm) em dois grupos: alta contagem (AC: 20 ou mais folículos) e baixa contagem (BC: menos de 20 folículos). Em seguida, foi realizada aspiração folicular com seringa com seringa de 5,0 mL acoplada a agulha de 21G contendo aproximadamente 1,0 mL de solução tampão fosfato (PBS). Após a aspiração, o líquido folicular foi mantido em repouso por 15 min e o conteúdo precipitado foi visualizado sob estereomicroscópio para a busca e classificação morfológica dos oócitos. A partir disso, oócitos apresentando mais de uma camada de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis, e àqueles com camada de células do *cumulus* incompleta ou ausente e citoplasma heterogêneo foram considerados não viáveis. Além disso, oócitos foram avaliados pelo ensaio bioquímico de azul cresil brilhante (ACB, 26 μ M), onde foram incubados durante 60 min e classificados em viáveis (cor azul) e não viáveis (incolor). Finalmente, as taxas de recuperação e de oócitos viáveis por morfologia e ensaio de ACB foram comparadas, expressas em percentual e analisadas pelo teste exato de Fischer ($P < 0,05$).



Resultados e Discussão

Após três repetições, um total de 85 ovários foi recuperado e distribuído de acordo com a contagem de folículos antrais nos grupos AC (22) e BC (63). A partir disso, foram recuperados 149 e 139 oócitos de 491 e 464 folículos antrais de ovários dos grupos AC e BC, respectivamente, não apresentando diferença significativa na taxa de recuperação ($P = 0,9438$; Tab. 1). Na avaliação morfológica, não foi observada diferença ($P = 0,1290$; Tab. 1) no percentual de oócitos viáveis recuperados dos grupos AC e BC. Ireland et al. (2007) estudando a CFA de fêmeas bovinas também não observou diferença estatística na qualidade morfológica de oócitos de fêmeas com baixa (≤ 15 folículos por animal) ou alta (≥ 25 folículos por animal) CFA. Quanto à viabilidade oocitária a partir do ensaio de ACB, foram obtidos percentuais de 49,0% e 57,6% para os grupos AC e BC, respectivamente, os quais foram semelhantes entre si ($P = 0,1575$, Tab. 1). Contudo, em contraste com os resultados apresentados, Luciano et al. (2013) observaram que em ovários com menos de 10 folículos antrais oócitos têm menor competência desenvolvimento e aumento da aneuploidia.

Tabela 1. Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários com alta e baixa contagem de folículos antrais (CFA).

CFA	Taxa de recuperação (n)	Viáveis por morfologia (n)	Viáveis por ACB (n)
Alta (≥ 20)	$30,3 \pm 1,4$ (149/491)	$63,8 \pm 15,1$ (95/149)	$49,0 \pm 6,2$ (73/149)
Baixa (< 20)	$30,0 \pm 10,2$ (139/464)	$72,7 \pm 2,1$ (101/139)	$57,6 \pm 4,5$ (80/139)
Valores de P	0,9438	0,1290	0,1575

Média (%) \pm erro padrão. Teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

Conclusões

Portanto, pode-se concluir que a CFA não influencia na quantidade e qualidade de oócitos bovinos imaturos recuperados de ovários de fêmeas de abatedouros. Finalmente, estudos adicionais para avaliar a CFA nas etapas subsequentes da PIVE são necessários.

Referências

- International Embryo Transfer Society (IETS).** Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. Embryo Transfer Newsletter, v.32, p.14-26, 2014.
- Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO.** Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. Hum Reprod, v.22, p.1687-1695, 2007.
- Luciano AM, Franciosi F, Lodde V, Tessaro I, Corbani D, Modena SC, Peluso JJ.** Oocytes isolated from dairy cows with reduced ovarian reserve have a high frequency of aneuploidy and alterations in the localization of progesterone receptor membrane component 1 and aurora kinase B. Biol Reprod, v.88, p.58, 2013.
- Mossa F, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ.** Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. Reproduction, v.140, p.713-720, 2010.
- Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, CARTER F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO.** Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. J Dairy Sci, v. 95, p. 2355-2361, 2012.
- Ströbech L, Mazzoni G, Pedersen HS, Freude KK, Kadarmideen H, Callesen H, Hyttel P.** *In vitro* production of bovine embryos-revisiting oocyte development and application of systems biology. Anim Reprod, v.12, p.465-72, 2015.



Avaliação do desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos após exposição à crotamina linear

Evaluation of bovine embryo in vitro development after exposure to linear crotamine

Mirelly Mirna Alves de Sousa Silva^{1,*}, Iana Sales Campelo¹, Camila Muniz Cavalcanti¹, Luciana Magalhães Melo¹, Gandhi Rádís Baptista², Dárcio Ítalo Alves Teixeira¹, Vicente José de Figueirêdo Freitas

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil; ²Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*E-mail: alves.mirelly.96@gmail.com

Abstract

The present study investigated the effects of different concentrations of linear crotamine (CrL), used as agent for cell transfection, on *in vitro* development of bovine embryos. Embryos were exposed to 0; 5 and 12.5 μ M of CrL in Synthetic Oviductal Fluid (SOF) for 6 h. Vehicle solution was NaCl 150 mM and not exposed embryos (in vitro fertilized-IVF group) was included. *In vitro* developmental competence was evaluated by cleavage (day 2), blastocyst (day 7 and 8), and hatching (day 8) rates. No difference ($P > 0.05$) was observed among CrL groups and control group (IVF) for all observed parameters. In conclusion, the use of the tested CrL concentrations for 6 h during *in vitro* culture of bovine embryos have no deleterious effects on embryo development.

Keywords: linear crotamine, cell-penetration peptide, embryotoxicity.

Palavras-chave: crotamina linear, peptídeo de penetração celular, embriotoxicidade.

Introdução

Nas últimas décadas, os peptídeos de penetração celular (PPCs) têm sido estudados devido a sua habilidade de translocar membranas e adentrar o interior de células (Poon e Gariépy, 2007). Alguns desses PPCs apresentam a capacidade de complexar moléculas de DNA e poderiam ser utilizados para a inserção de genes exógenos em embriões. Alguns PPCs foram descobertos a partir de toxinas animais, como, por exemplo, a crotamina, presente no veneno da cascavel da América do Sul (*Crotalus durissus terrificus*; Gonçalves e Polson, 1947). Sua atividade de penetração em células e embriões foi verificada (Kerkis et al., 2004). No entanto, quando utilizada em complexo com moléculas de DNA exógeno, não melhorou a expressão do transgene em embriões bovinos (Campelo et al., 2016a). Dessa forma, nosso grupo desenvolveu uma nova molécula, a crotamina linear (CrL), a fim de melhorar a capacidade de endereçamento de genes exógenos em embriões. Esse estudo teve por objetivo avaliar possíveis efeitos da CrL sobre o desenvolvimento de embriões bovinos.

Material e Métodos

Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), exceto se indicado de outra forma. A CrL foi produzida no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia (LABOMAR, UFC). Ovários bovinos foram colhidos em abatedouro e os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em meio TCM-199 suplementado com fatores de crescimento e hormônios a 38,5°C por 23 h em 5% de CO₂. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada com sêmen congelado-descongelado, selecionado em gradiente de Percoll (55/90%) e lavado duas vezes com meio Brackett-Oliphant (BO) suplementado de cafeína e heparina (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemanha). Logo após, o sêmen foi diluído em meio BO suplementado com albumina sérica bovina (BSA) e a concentração foi ajustada para 20×10⁶ espermatozoides/mL. Por fim, a FIV foi realizada em gotas de 100 μ L cobertas com óleo mineral a 38,5°C em 5% de CO₂ por 6 h. Após a FIV, os presumíveis zigotos tiveram suas células do *cumulus* removidas e foram distribuídos aleatoriamente nos grupos de exposição à CrL: 12,5 μ M (CrL 12,5); 5 μ M (CrL 5); ou NaCl 150 mM (CrL 0). A exposição foi realizada em gotas de 50 μ L compostas por 5 μ L de solução de NaCl 150 mM contendo ou não CrL e 45 μ L de SOF na ausência de aminoácidos, soro fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island, EUA) e BSA por 6 h a 38,5°C. Após exposição, os zigotos foram lavados e cultivados *in vitro* (CIV) por 8 dias em SOF contendo aminoácidos, SFB e BSA. Esses procedimentos ocorreram a 38,5° C em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. O grupo controle (FIV) foi aquele não submetido à exposição à CrL. A competência ao desenvolvimento foi avaliada pelas taxas de clivagem (dia 2), blastocisto (dia 7 e 8) e eclosão (dia 8), as quais foram comparadas pelo teste exato de Fisher com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir de quatro repetições estão resumidos na Tab. 1. A exposição à CrL não resultou em diferença estatística ($P > 0,05$) em termos de desenvolvimento embrionário para ambas as



concentrações testadas (12,5 e 5 μM) quando comparadas ao grupo CrL 0 e ao controle FIV. A inocuidade da CrL nas condições testadas foi similar a observação prévia que verificou a ausência de toxicidade da crotamina (0,1-10 μM por 24 h) também em embriões bovinos (Campelo et al., 2016b).

Tabela 1. Efeito da exposição (6 h) a diferentes concentrações de crotamina linear (CrL) sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos.

Tratamento	Concentração de CrL (μM)	Presumíveis zigotos	Clivagem (%) [*]	Blastocistos (%)		Eclosão (%) ^{**}
				Dia 7 [*]	Dia 8 [*]	
FIV	-	118	93 (78,8) ^a	54 (45,8) ^a	51 (43,2) ^a	8 (15,7) ^a
CrL	0	119	87 (73,1) ^a	50 (42,0) ^a	49 (41,2) ^a	13 (26,5) ^a
	5	162	126 (77,8) ^a	60 (37,0) ^a	62 (38,3) ^a	15 (24,2) ^a
	12,5	161	129 (80,1) ^a	69 (42,9) ^a	71 (44,1) ^a	18 (25,4) ^a

^{*}Calculado pelo número de zigotos em cultivo. ^{**}Calculado sobre blastocistos ao dia 8. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna mostram ausência de diferença estatística ($P > 0,05$).

Conclusão

É possível utilizar as concentrações de CrL testadas por 6 h durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos sem que ocorram efeitos deletérios ao desenvolvimento embrionário.

Referências

- Campelo IS, Canel NG, Bevacqua RJ, Melo LM, Rádis-Baptista G, Freitas VJF, Salamone DF.** Crotamine, a cell-penetrating peptide, is able to translocate parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos but does not improve exogenous DNA expression. *J Assist Reprod Genet*, v.33, p.1405-1413, 2016a.
- Campelo IS, Pereira AF, Alcântara-Neto AS, Canel NG, Souza-Fabjan JMG, Teixeira DIA, Camargo LSA, Melo LM, Rádis-Baptista G, Salamone DF, Freitas VJF.** Effect of crotamine, a cell-penetrating peptide, on blastocyst production and gene expression of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Zygote*, v.24, p.48-57, 2016b.
- Gonçalves JM; Polson A.** The electrophoretic analysis of snake venoms. *Arch Biochem*, v.13, p.253-259, 1947.
- Kerkis A, Kerkis I, Rádis-Baptista G, Oliveira EB, Vianna-Morgante A M, Pereira LV, Yamane T.** Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *FASEB J*, v.18, p.1407-1409, 2004.
- Poon GM, Gariépy J.** Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem Soc Trans*, v.35, p.788-793, 2007.



Avaliação do efeito da melatonina sobre o grau de qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Evaluation of the effect of melatonin on the quality grade of bovine embryos produced in vitro

Luiz Harlton Cavalcante Monteiro Mota^{1,*}, Felipe de Jesus Moraes Júnior², Felipe Pereira da Silva Barçante¹, Ícaro Oliveira Torres de Souza¹, Yndyra Nayan Texeira Carvalho¹, Marlon de Araujo Castelo Branco¹, Savio Ruan Sampaio de Sousa¹, José Adalmir Torres de Souza¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBR), UFPI, Teresina, PI, Brasil; ²Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBR), UEMA, São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: lhcmmta@icloud.com

Abstract

The present study evaluated the effect of melatonin on the degree of embryonic quality during the process of in vitro production of embryos. 512 cumulus-oocyte complexes of type I and II were submitted to in vitro production of embryos with 0 and 100 µM of melatonin in the maturation medium. There was no difference relative to the rate of cleavage 36.44% vs 32.93% and total viable embryos 16.44% vs 12.16% (P < 0.05). Likewise, there was no difference in the degree of embryonic quality (P < 0.05). Therefore, the medium supplemented with melatonin was not able to improve the cleavage rate, total viable embryos and quality of embryos fertilized in vitro.

Keywords: ROS, antioxidant, embryo quality.

Palavras-chave: ROS, antioxidante, qualidade embrionária.

Introdução

A qualidade e a integridade do oócito podem influenciar o sucesso da fertilização *in vitro*, assim como a competência do desenvolvimento até a fase de blastocisto. No entanto, durante o processo de ovulação, são produzidas dentro dos folículos espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam ao estresse oxidativo, prejudicando o desenvolvimento *in vitro* dos oócitos até a fase de blastocisto (Papis et al., 2007). A melatonina que é conhecida por modular a função ovariana em mamíferos, atua também como uma eliminadora dos ROS, agindo como um potente antioxidante, evitando o estresse oxidativo durante a maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário (Tsantarliotou et al., 2007). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos na melatonina adicionada ao meio de maturação *in vitro*, sobre a qualidade durante o desenvolvimento embrionário em bovinos.

Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBR), da UFPI, durante o período de abril a junho de 2013. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas no Frigorífico Marcantaria Santa Rita em Teresina-PI. No laboratório, os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram recuperados por aspiração e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV. Foram selecionados 512 CCOs de grau I e II, para maturação.

Os CCOs selecionados, foram maturados com 0 e 100 µM de melatonina, acrescido ao meio de maturação (Nutricell®), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral em incubadora a 38,5°C, por 22 horas, em 5% de CO₂ em ar. Após as 22 horas, os CCOs maturados foram transferidos para o meio de fecundação (Nutricell®) suplementado com Heparina e PHE (Nutricell®). O sêmen foi descongelado e submetido ao gradiente de Percoll. Em seguida foi determinada a concentração espermática e ajustada para 25 x 10⁶ espermatozoides vivos/mL. Após a FIV, os prováveis zigotos foram transferidos para o meio SOF (Nutricell®) suplementado com 5% de SFB e mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias. No quinto dia de cultivo foi realizado o (*feeding*). A avaliação da taxa de clivagem foi realizada com 48 horas de início da FIV e a formação de blastocisto após 168 horas. As taxas de clivagem e de blastócitos foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Qui-Quadrado (χ^2), e a comparação das medias pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados pelo programa SAS (Statistical Analysis System), versão 9.0.

Resultados e Discussão

No presente estudo, não houve diferença na taxa de clivagem (Tab. 1), 36,44% para 0 µM de melatonina no meio de MIV e 32,93% para 100 µM de melatonina no meio de MIV (P < 0,05). Da mesma forma não houve diferença no Total de embriões viáveis (Tab. 1), 16,41% para 0 µM de melatonina no meio de MIV e 12,16% para 100 µM de melatonina no meio MIV (P < 0,05). Com relação aos graus de qualidade embrionária (GI, GII, GIII) (Tab. 1), também não houve diferença significativa em (P < 0,05). Esses resultados corroboram com (Adona et al., 2007), onde a adição de 100 µM de melatonina no meio de maturação *in vitro*, não interferiu



na taxa de clivagem e nos diversos estágios de desenvolvimento embrionário. No entanto, esses resultados discordam com estudos em que a concentração de melatonina de 1 pM e 100 µM aumentou o desenvolvimento embrionário em bovinos (Tan et al., 1993).

Tabela 1. Taxa de clivagem, total de embriões viáveis e grau de qualidade embrionária em meio suplementado com melatonina

	0 µM	100 µM
Taxa de Clivagem (%)	36,44 ± 13,50 ^a (100/281)	32,93 ± 10,26 ^a (93/277)
Total de Embriões Viáveis (%)	16,41 ± 5,13 ^a (44/281)	12,16 ± 6,55 ^a (36/277)
GI	1,50 ± 0,63 ^a	1,37 ± 0,50 ^a
GII	2,62 ± 0,88 ^a	2,31 ± 1,25 ^a
GIII	1,68 ± 0,87 ^a	1,56 ± 0,81 ^a

Médias, seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não difere entre si pelo teste de SNK (P < 0,05). GI=Grau 1; GII=Grau 2; GIII=Grau 3.

Conclusões

Os meios suplementados com melatonina não foram capazes de melhorar a primeira divisão embrionária após a fecundação *in vitro*. Como da mesma forma não melhoraram o grau de qualidade embrionária, produzindo taxas de embriões viáveis similares aos obtidos pelos sistemas tradicionais de PIV.

Referências

- Adona PR, Pires PR, Quetglas MD, Schwarz KR, Leal CL.** Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes premature ed with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. *Anim Sci Reprod*, v.104, p.389-397, 2007.
- Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski J.** Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. *J Pineal Res*, v.43, p.321-236, 2007.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC.** Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrinology*, v.1, p.57-60, 1993.
- Tsantarliotou MP, Attanasio L, DE Rosa A, Boccia L, Pellerano G, Gasparrini B.** The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. *Italian J Anim Sci*, v.6, p.88-489, 2007.



Avaliação ultrassonográfica, andrológica e histopatológica de novilhos confinados em dieta hiperenergética

Ultrasonographic, soundness and histopathologic evaluation of feedlot steers high-energy diet

Michel Santos e Cunha^{1,*}, Augusto Ryonosuke Taira², Denis Vinicius Bonato³, Dayane Priscila Vrisman², Moises Moreira Lima⁴, Rodrigo dos Santos Albuquerque⁴, Victor Jose Corrêa Santos², Pedro Paulo Maia Teixeira⁴

¹ Universidade de Franca, Franca, São Paulo, Brasil; ² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Campus Jaboticabal, São Paulo, Brasil; ³ Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil; ⁴ Universidade Federal do Pará. Campus Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: michelcap3@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to andrologically evaluate confined young bulls submitted to a diet rich in starch, correlating andrological traditional data with ultrasonography and testicular histology. 40 bulls confined for 94 days were submitted to 4 assessments to obtain testicular biometry, ultrasound images and semen collection and evaluation of the testes after slaughter. There was a progressive increase in weight 341.7 ± 15 kg at baseline to 453.6 ± 30 kg at the end of feedlot in 94 days, and testis, with CE of 28.44 ± 3.36 cm to 34.68 ± 8.21 cm, VT 677.5 ± 234.7 mm³ to 2663.5 ± 1004 mm³. Ultrasound images showed changes from the 56th day. Histological analysis presented alterations from inflammatory findings and testicular degeneration. The study showed that feedlot bulls submitted to high-energy diet rich in starch presented progressive testicular development and weight, however, it resulted in sonographic, histopathologic and andrological alterations.

Keywords: feedlot, breeder, testicular stroma.

Palavras-chave: confinamento, reprodutor, estroma testicular.

Introdução

Pesquisas sobre afecções testiculares e fatores que alteram a qualidade espermática tem fundamental importância para a reprodução de diferentes espécies, do homem aos animais (Wisniewski et al., 2015). Estudos demonstram que, elevado fornecimento energético em touros pode influenciar o desempenho reprodutivo, por deposição de gordura intratesticular (Barth et al., 2008). Trabalhos avaliando arquitetura do estroma testicular estão em sua maioria, restritos a avaliação de imagem, não havendo informações histopatológicas testiculares sobre patologias (Teixeira et al., 2011; Teixeira et al., 2012). Objetivou-se neste trabalho avaliar andrologicamente touros jovens confinados sob dieta hiperenergética, correlacionando os dados do exame andrológico à ultrassonografia e histologia testicular.

Material e Métodos

O experimento foi realizado sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste (CEUA 29/2014). Foram utilizados 40 touros com idade média de $14 \pm 1,7$ meses, provenientes do cruzamento industrial (Angus x Charolês), com peso inicial médio de 341.7 ± 15 kg. A dieta dos animais foi composta por silagem de milho reidratado, concentrado proteico (Golden Beef 38%® - Cooperativa Agrária) e silagem de milho de planta inteira. Adotou-se critério de sobre de 5% da oferta, garantindo assim um consumo *ad libitum*. As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as exigências estimadas pelo NRC (2000). Os animais foram confinados por 94 dias e submetidos a quatro avaliações com intervalo de 28 dias. As avaliações biométricas testiculares foram realizadas de acordo com normas do CBRA (2013). Com paquímetro e fita métrica para mensurar a circunferência escrotal (CE), comprimento e largura dos testículos. O volume testicular (VT) foi obtido por meio de equações matemáticas (Fields et al., 1979; Bailey et al., 1998; Unanian et al., 2000) e o volume testicular total, pela soma dos volumes testiculares direito e esquerdo. Para avaliação ultrassonográfica utilizou-se aparelho Shenzhen mindray bio medical, com transdutor linear de 6,5 MHz. Classificando a ecogenicidade segundo metodologia adaptada por Teixeira et al. (2011). No dia anterior ao abate, realizou-se a coleta de sêmen em todos os touros com eletroejaculador, os ejaculados foram avaliados em volume, motilidade, vigor e concentração espermática por contagem em câmara de Neubauer. Após o abate, os testículos foram pesados e fixados em formol 10%, seguindo o processamento histológico. As lâminas foram avaliadas por microscopia óptica, sendo analisados 3 campos e avaliada arquitetura histológica dos testículos

Resultados e Discussão

O peso corporal (PC) seguiu uma tendência esperada, com crescimento progressivo, nos dias 0, 28, 56 e 84 de confinamento, os animais pesaram 341.7 ± 15 kg, 373.6 ± 18 kg, 408 ± 26 kg e 453.6 ± 30 kg respectivamente, indicando que esta alimentação em confinamento, influencia positivamente o desenvolvimento e corrobora Harstine et al. (2015). A média CE dos animais no D0 (28.44 ± 3.36 cm) foi semelhante à estipulada



por Fordyce et al. (2014) para touros criados a pasto, mas abaixo do preconizado pelo CBRA (2013). Ao final do confinamento, os animais alcançaram resultado médio de 34.68 ± 8.21 cm, considerado “muito bom” segundo CBRA (2013). Da mesma forma, o VT apresentou resultados superiores ao final do confinamento, alcançando cerca de 2663.5 ± 1004 mm³ contrastando com o início 677.5 ± 234.7 mm³, valor inferior ao encontrado por Dias et al (2007) em nelores criados extensivamente. Na análise espermática observou-se valores inferiores de motilidade, vigor, volume ejaculado e concentração espermática, $15.9 \pm 26.4\%$, 0.7 ± 1.2 , 5.7 ± 3.3 mL, $348.72 \pm 821.6 \times 10^6$ espermatozoides/mL, respectivamente, diferentemente de Monteiro et al. (2011) e Assumpção et al. (2013) que descreveram bons resultados em animais da raça nelore com idade semelhante. Nas imagens ultrassonográficas, observou-se no D0 e D28, homogeneidade do estroma testicular com mínimas alterações ecogênicas. Já no D56, visibilizaram-se imagens predominantemente homogêneas, porém, com de áreas hipocóicas. A partir do D84, encontrou-se animais com heterogeneidade em estroma testicular, com áreas hipocóicas e hiperecóicas, alguns casos com os dois padrões no mesmo testículo, o mesmo padrão não foi observado por Cardilli et al. (2012), que apenas descreve alteração ao sexto mês de avaliação. Na análise histológica, alterações provenientes de achados inflamatórios agudos, como infiltrados de células inflamatórias, alterações na espermatogênese, edema extra e intratubulares foram encontrados. Da mesma forma, achados degenerativos caracterizados pela presença de células com núcleos picnóticos, com citoplasmas vacuolizados, espessamento da membrana basal, células gigantes multinucleadas no lúmen dos túbulos e atrofia. Tais achados correspondem a áreas com alterações de ecotextura e heterogeneidade, no entanto, outros estudos sem avaliações histológicas, citam estes achados de heterogeneidade como microlitíase (Jucá et al., 2009; Cardilli et al., 2009; Silva et al., 2015).

Conclusão

O estudo demonstrou que novilhos confinados e submetidos à dieta hiperenergética, rica em amido, apresentaram desenvolvimento testicular e ponderal progressivo, contudo, houve aparecimento de patologias e alterações espermáticas evidenciadas nas avaliações ultrassonográfica, histopatológica e andrológica.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro para a execução do presente trabalho e as instituições UNIFRAN, UNICENTRO e UNESP.

Referências

- Assumpção TI, Souza MA, Alberton C, Pallaoro R, Kitagawa C, Silva NAM.** Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. *Rev Bras Ciênc Vet*, v.20, 2013.
- Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL.** Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. *Theriogenology*, v.49, p.581-594, 1998.
- Barth AD, Brito LFC, Kastelic JP.** The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*, v.70, p.485-494, 2008.
- Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Mercadante MEZ, Oliveira JA.** Padrão Ultrassonográfico do Parênquima, Mediastino e Túnicas Testiculares em Bovinos Jovens da Raça Nelore. *Ciênc Anim Bras*, v.11, p.899-905, 2010.
- Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Mercadante MEZ.** Alterações do padrão ultrassonográfico do parênquima testicular em bovinos jovens da raça Nelore. In Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2009. (CD-ROM).
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ªed. 2013. 49p.
- Dias JC, Andrade VJ, Vale VR, Silva MA.** Biometria testicular e aspectos andrológicos de touros Nelore (*Bos taurus indicus*), de dois e três anos de idade, criados extensivamente. *Veterinária Notícias*, v.13, p.31-37, 2007.
- Fields MJ, Burns WC, Warnick AC.** Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in Young beef bulls. *J Anim Sci*, v.48, p.1229-1304, 1979.
- Fordyce G, McGowan MR, Lisle A, Muller T, Allen J, Duff C, Holroyd RG, Corbet NJ, Burns BM.** Scrotal circumference of Australian beef bulls. *Theriogenology*, v. 81, p. 805-812, 2014.
- Harstine BR, Maquivar M, Helser LA, Utt MD, Premanandan C, Dejarnette JM, Day ML.** Effects of dietary energy on sexual maturation and sperm production in Holstein bulls. *J Anim Sci*, v.93, p.2759-2766, 2015.
- Jucá AF, Moura JCA, Gusmão AL, Bittencourt TC, Nascimento MC, Barbosa CMP.** Avaliação ultrassonográfica dos testículos e das glândulas sexuais anexas de carneiros Santa Inês. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.650-659, 2009.



Monteiro FM, Oliveira LZ, Oliveira CS, Tetzner TAD, Mercadante MEZ, Branco RH, Garcia JM. Avaliação andrológica de touros jovens de diferentes raças selecionados para peso pós-desmama. *Boletim de Indústria Animal*, v.68, p.37-43, 2011.

National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th edition, revised. Washington DC: National Academic Press, 2000. 248p.

Silva EG, Gonçalves MTC, Pinto SCC, Soares DM, Oliveira RA, Alves FR, Araújo AVC, Guerra PC. Análise quantitativa da ecogenicidade testicular pela técnica do histograma de ovinos da baixada ocidental maranhense. *Pesq Vet Bras*, v.35, p.297-303, 2015.

Teixeira PPM, Cardilli DJ, Padilha LC, D'Amato CC, Barros FFPC, Coutinho LN, Santos VJC, Mariano RS, Vicente WRR. Evaluation of the testicular stroma echogenicity in prepubertal ram. *Ciênc Anim*, v.22, p.25-29, 2012.

Teixeira PPM, Oliveira MEF, D'Amato CC, Rodrigues LFS. Avaliação ultrassonográfica da da ecogenicidade do parênquima testicular como exame complementar no andrológico de carneiros. *Nucleus Animalium*, v.3, p.31-36, 2011.

Unanian MM, Silva AEDF, McManus C, Cardoso EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. *R Bras Zootec*, 2000, v.29, p.136-144, 2000.

Wisniewski P, Romano RM, Kizys MM, Oliveira KC, Kasamatsu T, Giannocco G, Chiamolera MI, Dias-Da-Silva MR, Romano NA. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology*, v.329, p.1-9, 2015.



Bioestimulação e desmame temporário, objetivando a dinâmica folicular, taxa de concepção e de prenhez em vacas Nelore submetidas à IATF

Biostimulation and temporary weaning, aiming dynamics follicular, design and pregnancy rate in cows Nelore submitted to IATF

Paola Sena Almeida*, Manoel Lopes da Silva Filho, Glauciny Soares Lopes, Daniela Kunkel, Antônio Augusto Nascimento Machado Júnior, Homero Batista da Rocha, Hans Müller Vaz da Silva Braga Aguiar, Raynã da Silva Soares

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: paola.almeidamv@gmail.com

Abstract

We evaluated the biostimulation and temporary weaning aiming follicular dynamics, conception rate and pregnancy rate in Nelore cows. Are used two groups of 75 cows. NESD: control without biostimulation and calf at foot and BEDT56: biostimulation and temporary weaning for 56 hours. The interval between the beginning of the treatment and emergency surge in days was 3.37 ± 0.50 for NESD and 3.40 ± 0.27 for BEDT56. The gap between the implant removal and ovulation in time was $60,85 \pm 3,10$ (NESD) and $66,75 \pm 1,35$ (BEDT56). The larger diameter of the ovulatory follicle of the new follicular wave, cows with a diameter $>8,0$ mm, was $12,1 \pm 1,0$ mm in NESD and $15,2 \pm 0,7$ mm. The conception rate and pregnancy 37,3% (28/75) in NESD and 69,3% (52/75) in BEDT56. The association of biostimulation and temporary weaning increases follicular development, conception rate and pregnancy rate in Nelore cows.

Keywords: ovarian dynamics, bull effect, calf removal.

Palavras-chave: dinâmica ovariana, efeito touro, remoção de bezerro.

Introdução

Em um sistema de produção de bovinos de corte, a eficiência reprodutiva é o aspecto mais importante da atividade, por estar diretamente relacionada ao aumento na taxa de desfrute do rebanho (Ferraz et al., 2008). A reprodução entra como um componente de grande importância para um desempenho econômico lucrativo e de grande rentabilidade para a pecuária de corte (Xavier PR, 2011) sendo que esta pode ser considerada o principal pilar da cadeia produtiva da carne bovina, pois ela produz a matéria-prima dessa indústria, o bezerro. No entanto, no Brasil, persistem inúmeros pontos de estrangulamento no processo reprodutivo dos bovinos de corte, tais como taxas de gestação, parição e de desmama anuais, sendo consequências de intervalos de partos elevados e períodos de serviço pós-parto prolongados (Silva, 2004). Por isso, desenvolveu-se este projeto com o objetivo de avaliar pela ultrassonografia o efeito da bioestimulação e do desmame temporário na taxa de concepção e taxa de prenhez, de vacas Nelore submetidas a um mesmo protocolo hormonal.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido de agosto de 2015 até julho de 2016 na Fazenda Agropecuária Rotilli, no município de Currais, estado do Piauí, Brasil.

Foram utilizadas após a avaliação clínica ginecológica e clínica andrológica respectivamente, 150 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre 5 a 7 anos, múltiparas, com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 a 3,5 (escala de 1 a 5, segundo Lownman et al., 1976), e quatro rufiões da raça Nelore, com idade de 5 anos, mantidos nas mesmas condições de manejo e ambiente.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com dois tratamentos com 75 repetições por tratamento, constituídos por vacas paridas com bezerro ao pé de 45 a 60 dias, submetidos a protocolos hormonais: BEDT56: vacas com protocolo hormonal, bioestimuladas e com desmame de 56 horas. NESD: grupo controle, vacas com protocolo hormonais, não estimuladas e com bezerro ao pé. Como bioestimuladores, foram utilizados quatro touros na raça Nelore vasectomizados, na proporção de 75 fêmeas para quatro machos.

Inicialmente as fêmeas foram submetidas ao seguinte protocolo: receberam (D0) um dispositivo intravaginal, contendo 1g de progesterona e aplicação de 2mg por via intramuscular (2ml/IM) de benzoato de estradiol (BE) e, no sétimo dia (D7), ocorreu a aplicação de 300 UI (1,5ml/IM) de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 500 mg (2ml/IM) de cloprostenol sódico (PGF2alfa). No (D8), foram retirados os dispositivos intravaginais. Após 24 horas, ou seja no nono dia do experimento (D9), foi aplicado por via IM, 1,0 mg (1ml/IM) de BE, e após trinta e duas horas (D10) foi procedido a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em todas as vacas.

O diagnóstico de gestação foi procedido 40 dias após a inseminação com auxílio da ultrassonografia, Aparelho Sonovet R3®, equipado com transdutor retal de frequência de 7,5 MHz. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-UFPI, sob o protocolo número 017/14.



Resultados e Discussão

Os animais do grupo NESD e BEDT56, apresentaram regressão folicular após os tratamentos com progesterona e estradiol. Nos dois tratamentos, observou-se 100% de regressão dos folículos presentes no início do tratamento em diferentes estádios de desenvolvimento (Tab.1).

A taxa de prenhez e o número de serviços por concepção diferiram entre os tratamentos BEDT56 e NESD (Tabela 2). As vacas do tratamento BEDT56 apresentaram maiores taxas de prenhez que o tratamento NESD (Tabela 2). Em relação ao número de serviços por concepção, o tratamento BEDT56 apresentou menor valor que o tratamento NESD (Tabela 2).

Tabela 1. Dinâmica folicular durante o tratamento com progesterona associado ao estrógeno para sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação em vacas Nelore em pós-parto de 30 a 45 dia. Currais-PI 2016.

Variáveis analisadas	BEDT56	NESD
Intervalo entre o início do tratamento e o início da onda de crescimento folicular (dias)	3,40 ± 0,27 ^a	3,27 ± 0,50 ^a
Intervalo entre a retirada do implante até a ovulação (horas)	66,75 ± 1,35 ^b	60,85 ± 3,10 ^a
Intervalo entre a 2 ^a aplicação de BE2/ovulação (horas)	42,75 ± 1,35 ^b	36,85 ± 3,10 ^a
Diâmetro maior atingido pelo folículo dominante (mm)	15,2 ± 0,7 ^a	12,1 ± 1,0 ^b
Taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia)	1,1 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^a
Taxa de crescimento folículo subordinado (mm/dia)	0,5 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
Taxa de crescimento do folículo dominante após retirada do implante até ovulação (mm/dia)	1,3 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,2 ^a
Diâmetro maior do folículo no D9 (mm)	14,6 ± 0,6 ^a	12,1 ± 1,0 ^a

BEDT56 (Bioestimulação com desmame temporário de 56h); NESD (Não estimuladas e sem desmame temporário). Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si estatisticamente pelo teste t – Student a 5% (P < 0,05).

Tabela 2. Taxa de ovulação, taxa de prenhez e n° de serviços por concepção dos tratamentos BEDT56 E NESD em vacas Nelore em pós-parto de 30 a 45 dias. Currais, 2016.

Variáveis analisadas	BEDT56	NESD
Taxa de ovulação (%)	100 (8/8) ^a	87,5 (7/8) ^a
Taxa de prenhez (%)	69,3 (52/75) ^a	37,3 (28/75) ^b
N° de Serviço por Concepção	1,44 (52/75) ^a	2,68 (28/75) ^c

Valores percentuais seguidos por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem (P < 0,05) entre si pelo teste do qui-quadrado.

A associação do benzoato de estradiol à progesterona foi eficiente em promover a atresia dos folículos presentes no início do tratamento e sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (Rhodes et al., 1999).

O tratamento BEDT56 apresentou uma menor assincronia entre as ovulações quando comparado ao NESD. Stevenson et al. (1994) descrevem que a ação da mamada inibe a pulsatilidade da liberação do GnRH e consequentemente a supressão de LH, como observado no NESD que estavam com as fêmeas sobre efeito da mamada, esta supressão pode ter ocorrido contribuindo para a maior dispersão das ovulações neste grupo.

Webb et al. (2004) relataram a ocorrência de efeitos positivos na taxa de manifestação de estro pós-parto, sincronização de estro e taxa de prenhez, com relação à bioestimulação e desmame, efeitos bem evidentes foram observados nos animais do grupo da bioestimulação + desmame gerando folículos de maior diâmetro, consequentemente corpos lúteos maiores com grande capacidade de produção de progesterona, contribuindo para uma melhor manutenção da gestação.

Técnica de manejo que associem desmame temporário e bioestimulação, proporcionam maior atividade ovariana, induzem ovulações precoces elevando a taxa de prenhez, quando comparadas ao manejo tradicional com bezerro ao pé.

Consideração final

A associação da bioestimulação e o desmame temporário aumenta o desenvolvimento folicular, a taxa de concepção e de prenhez em vacas de corte, sendo viável economicamente, por reduzir o número de doses de sêmen por prenhez.

Referências

Ferraz HT, Viu MAO, Lopes DT, Oliveira Filho BD, Gambarini ML. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. PUBVET, v.2, artigo 135, 2008.



Lowman BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle. Bull. No. 6. East Scotland Coll Agric, Anim Prod, Advisory Dev Dep, p.1-13, 1976.

Rhodes FM, Clark BA, McDougall S, Macmillan KL. Insemination at the second of two induced oestrus periods in anoestrous dairy cows increased conception rates to first service. N Z Vet J, v.47, p.39-43, 1999.

Silva EC. Comportamento sexual de touros Nelore. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2004, Campo Grande. Anais... Campo Grande: SBZ, p.468-482. 2004.

Stevenson JS, Knoppel EL, Minton JE, Salfen, Beha Garverick HA. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. J Anim Sci, v.72, p.690-699, 1994.

Webb C, Galina CS, Molina R, Maquivar M, Estrada S. Efecto de dos tipos de destete y la aplicación de un progestágeno sobre la fertilidad en vacas cebuinas (*Bos indicus*). Arch Med Vet, v.36, p.147-154, 2004.

XAVIER PR. Características morfológicas do corpo lúteo de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) nos terços inicial, médio e final da gestação. 2011. 55f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2011.



Captopril na produção *in vitro* de embriões bovinos?

Captopril in production in vitro of embryos bovine?

Antonio de Sousa Junior^{1*}, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco², Luiz Harlilton Cavalcante Monteiro Mota², Felipe de Jesus Moraes Junior³, Isolda Marcia Rocha do Nascimento¹, Amilton Paulo Raposo Costa², Marlon de Araújo Castelo Branco², Jose Adalmir Torres de Souza²

¹Colégio Técnico Agrícola (CTT), Teresina, PI, Brasil; ²Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil;

³Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: sousajunior@ufpi.edu.br

Abstract

Objective to evaluate the effect of captopril in vitro production of bovine embryos. 472 COCs were used from abattoir ovaries, which were screened, sorted and selected in grades I and II, and submitted to the PIV process. The IVM treatments were added in the following concentrations: T1 - control; T2 - 5 mM of captopril; T3 - 10 uM of captopril; and T4 - 15 captopril uM, the COCs were subjected to IVM, IVF CIV. The results show that there was no statistically significant difference ($P > 0.05$) between treatments during maturation. The variables studied were cleavage and blastocyst rates. The captopril supplementation did not improve ($P > 0.05$) G1 cleavage rate - 61.84%; G2 - 71.00%; G3 - 68.87%; and G4 - 56.90%. Supplementation of 20 μ M of captopril influenced the amount of viable embryos.

Keywords: bovine, captopril, embryos.

Palavras-chave: bovino, captopril, embryos.

Introdução

A PIV é uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (Gonçalves, et al., 2007). Pesquisas conduzidas na Universidade Federal do Piauí têm demonstrado o envolvimento das angiotensinas na ovulação, maturação oocitária e esteroidogênese (Feitosa, 2014), principalmente a ANG II e ANG (1,7).

Estudos indicaram a presença da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) biologicamente ativa na superfície das células da granulosa, e relatam que 94-100% dos folículos em desenvolvimento e 89-96% dos folículos atrésicos continham altos níveis de ECA, o que sugere um possível papel desta enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular e atresia (Daud et al., 1990).

O objetivo deste experimento foi verificar a influência do inibidor de ECA, Captopril, na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Material e Métodos

Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados em solução fisiológica 0,9% a 37°C, ao laboratório, onde foram lavados em mesma solução e temperatura. No laboratório, os ovários foram aspirados, dos quais foram recuperados os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) por aspiração dos folículos que mediam entre 2 a 6 mm, utilizando agulha descartáveis de 21G, acoplado a seringa de 10 mL. O conteúdo do aspirado folicular, após 20 minutos de sedimentação, foi depositado em uma placa de Petri para rastreamento e seleção de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Leidfried; First, 1979).

Foram utilizados 472 oócitos (Grau I e II), os tratamentos foram adicionados a MIV, nas seguintes concentrações: T1 - controle; T2 - 5 μ M de captopril; T3 - 10 μ M de captopril; e T4 - 15 μ M de captopril. Foram realizados 12 repetições e utilizados 20 a 30 oócitos por tratamento.

Os CCOs selecionados foram submetidos MIV, FIV a CIV, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, a 38,5°C.

As taxas de maturação dos CCOs, de clivagem e de blastócitos, foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Qui-Quadrado (χ^2), e a comparação das medias pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados pelo programa ASSISTAT Versão 7.7. beta (pt).

Resultados e Discussões

No presente estudo, a taxa de clivagem (Tab. 1) não sofreu influência da introdução do captopril ao meio de maturação nos grupos experimentais. Mas, ao analisar e comparar os dados encontrados nesta pesquisa, se observa que foram muito próximos de outros pesquisadores que trabalharam com adição de suplementação do meio de maturação *in vitro* que foi 60,93 a 71,94% para suplementação do meio MIV com FGF10 (Pinto, 2012) e 54,0 e 84,0% para adição de soro de vaca em estro e células da granulosa, respectivamente (Coelho et al., 1998) e dos 69,11 e 70,31% quando se adicionou oócitos desnudos ao meio de maturação (Arruda, 2010) e superiores aos encontrados por Mota (2013) quando acrescentou ao meio de maturação 100 μ M de melatonina.

A taxa de clivagem é resultante de uma completa maturação oocitária e da qualidade espermática utilizada na FIV. As diferenças existentes entre touros são manifestadas tanto na capacidade de fecundação como no desenvolvimento. Segundo Coelho et al. (1980), para cada sêmen de reprodutor utilizado no sistema PIV, deve-se ajustar a concentração espermática e a dosagem de heparina com a finalidade de maximizar a capacidade



fecundante e competência de desenvolvimento embrionário. Fatos estes, que foram observados nesta pesquisa.

Em relação ao total de embriões viáveis (Tab. 1), também não se observou diferenças significativas entre os grupos, quando se correlaciona o número de embriões viáveis com o número de CCOs em FIV. Entretanto, quando comparamos o número de embriões viáveis com a quantidade de estruturas que clivaram observa-se melhor resultado no grupo com 20 μ M de captopril no meio de MIV ($P < 0,05$).

Tabela 1. Taxa de clivagem e número total de embriões viáveis em meio suplementado com captopril

Grupos	TCLIV (%)	TEV(%)	TEV/TCLIV(%)
0 μ M	61,05 ^a (58/95)	31,57 ^a (30/95)	51,72 ^a (30/58)
05 μ M	70,94 ^a (83/117)	41,02 ^a (48/117)	57,83 ^a (48/83)
10 μ M	64,29 ^a (81/126)	42,06 ^a (53/126)	65,43 ^a (53/81)
20 μ M	58,21 ^a (78/134)	42,27 ^a (62/134)	79,48 ^b (62/78)

*Médias, seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna não difere entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).
TCLIV=Taxa de clivagem; TEV=Total de embriões viáveis

O desenvolvimento embrionário envolve eventos variados, ativação do genoma embrionário, mitoses e alterações na ultraestrutura das células e do próprio embrião (Rizos, et al., 2002), desta forma, embora o desenvolvimento embrionário seja fruto de uma maturação eficiente não se pode creditar por completo o aumento de embriões viáveis a adição de 20 μ M de captopril ao meio MIV. Até mesmo porque ao se analisar o estágio de desenvolvimento embrionário não se observa, neste experimento, diferença estatística intra ou entre os tratamentos experimentais (Tab. 2).

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento de embriões viáveis maturados *in vitro* em meio suplementado com captopril.

GRUPOS	%MC	%BI	%BL	%BX
0 μ M	43,2 ^a (16/37)	8,1 ^a (3/37)	18,9 ^a (7/37)	29,7 ^a (11/37)
05 μ M	56,3 ^a (27/48)	4,2 ^a (2/48)	4,2 ^a (2/48)	35,4 ^a (17/48)
10 μ M	50,9 ^a (27/53)	0,0	13,2 ^a (7/53)	35,8 ^a (19/53)
20 μ M	56,5 ^a (35/62)	3,2 ^a (2/62)	8,1 ^a (5/62)	32,3 ^a (20/62)

*Médias, seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna não difere entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

Conclusões

A suplementação de captopril no meio MIV não interfere no estágio de desenvolvimento embrionário, entretanto pode influenciar a taxa de embriões viáveis, após cultivo *in vitro*. Sinalizando para um outro mecanismo de ação que não seja a inibição da ECA pelo captopril.

Referências

- Arruda NS.** Taxas de clivagem e de formação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após a adição de oócitos desnudos ao sistema de maturação. 2010. 46p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- Coelho LA, Esper CR, Garcia JG, Vantini R, Silva Filho IR, Almeida Jr IL.** Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Braz J Vet Res Anim Sci*, São Paulo, v.35, p.120-122, 1998.
- Daud AI, Bumpus FM, Husain A.** Characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of ACE inhibitor on ovulation. *Endocrinology*, v.126, p.2927-2935, 1990.
- Feitosa LCS.** Efeito de um inibidor da enzima conversora de angiotensina sobre esteróides sexuais, ang ii e ang-(1-7) em cabras sprd superovuladas e imunolocalização de ang ii, ang-(1-7) e eca ii em ovários de cabras. 2014. 75p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.
- Pinto RFP.** Efeitos do FGF10 na maturação oocitária e produção de embriões bovinos *in vitro*. 2012. 35p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP, São Paulo, 2012.
- Gonsalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.
- Leibfried L, First NL.** Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol Reprod*, v.23, p.705-709, 1980.
- Mota LHCM.** Efeito da melatonina sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2013. 58p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.234-248, 2002.



Caracterização da dinâmica folicular e ovulação de vacas mestiças na região norte do estado do Ceará

Follicular dynamics and ovulation in crossbred cows raised in the north of Ceará state, Brazil

Bruno Galvão de Matos Brito*, Francisco José Jorge, Eduardo Hálasson Araújo Alves, Giuliane Hálen Lima, Michael Nogueira de Medeiros, Emmanuelle Lima de Figueirêdo

Instituto de Teologia Aplicada, Faculdades INTA, Sobral, CE, Brasil.

*E-mail: brunogalvão@inta.edu.br

Abstract

Knowing the follicular dynamics and predicting the time of ovulation is fundamental to the success of breeding programs that use reproductive biotechnologies. The objective of this study was to characterize the follicular dynamics of crossbred cows reared in the northern region of the Ceará state, Brazil, identifying the moment of ovulation and correlating the time of ovulation with the rectal temperature. According to the data obtained, there was a time difference on the onset of estrus and ovulation period between the cycles analyzed in the dry season (≈ 27 hours) and the rainy months (≈ 33 hours). In addition, rectal temperature tends to decrease as ovulation approaches. These data show the importance of knowing the pattern of follicular dynamics to improve the pregnancy rate of herds in different conditions.

Keywords: ovulation, cow, follicle.

Palavras-chave: ovulação, vaca, folículo.

Introdução

O sucesso na produção de leite depende diretamente de uma máxima eficiência reprodutiva do rebanho. Desta forma busca-se uma redução no intervalo entre partos com a finalidade de se produzir um bezerro por vaca por ano (Hamudikuwanda et. al., 1987). Para que isso ocorra é importante que a vaca apresente nova gestação tão logo seu trato reprodutivo esteja apto a receber o novo embrião. As taxas de gestação são influenciadas por vários fatores (Alves et. al., 2009; Bilby et. al., 2009; Nobrega et. al., 2011; Cruz et. al., 2011) que interferem na ovulação, fecundação e implantação do embrião no endométrio. Assim, torna-se fundamental conhecer a dinâmica folicular para prever o momento da ovulação e com isso depositar o sêmen no trato reprodutivo da fêmea no momento correto para que haja capacitação espermática e posterior fertilização do óvulo em tempo hábil. A dinâmica folicular é variável de acordo com a espécie e com a raça, além de sofrer influência de fatores climáticos. O diâmetro folicular (Figueiredo et. al., 1995) e área luteal (Pathiraja et. al. 1986) de vacas zebuínas se mostraram menores em relação a vacas de raças europeias. Foi observada ainda variação sazonal na dinâmica folicular de vacas zebuínas, sugerindo menor eficiência reprodutiva em dias mais curtos (Randel, 1994). Segundo Zeitoun et al. (1996), as estações do ano não interferem na dinâmica folicular o que sugere que as variações observadas podem ter sido influenciadas pela nutrição (Randel, 1994). Estudos sobre a dinâmica folicular de vacas mestiças criadas em condições específicas do semiárido são escassos tornando-se necessário o conhecimento do padrão reprodutivo desses animais para o sucesso na reprodução e produção nessa região. Assim, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar a dinâmica folicular de vacas mestiças criadas sob condições características do semiárido, mensurando o diâmetro do folículo ovulatório e identificando a formação do corpo lúteo e o tempo decorrido entre a detecção de cio e a ovulação de vacas mestiças criadas no semiárido.

Material e Métodos

Foram utilizadas 15 fêmeas bovinas mestiças (zebu x europeu) multíparas, não lactantes e com escore corporal entre 3 e 4 (Ferreira, 1990), criadas sob sistema extensivo em piquetes de braquiária com acesso livre a sal mineral e água de boa qualidade. Todos os animais foram previamente submetidos a exame ginecológico, utilizando-se aqueles sem alteração clínica ou reprodutiva e que apresentavam ciclos reprodutivos regulares segundo observação prévia de dois ciclos estrais. A observação de cio foi realizada diariamente, 3 vezes por dia por 1 hora (de 7h às 8h, de 12h a 13h e de 17h às 18h). Após a observação do comportamento de cio foi realizado exame ultrassonográfico com equipamento portátil de uso veterinário (Mindray DP2200) e sonda retal linear com frequência de 5 Mhz a cada 6 horas até o momento da ovulação (caracterizado pelo intervalo médio entre a última avaliação em que o folículo esteve presente até o seu desaparecimento e posterior formação de tecido luteal). A avaliação da dinâmica folicular foi realizada por um único operador que registrou os diâmetros máximos do maior e do segundo maior folículo presente em cada ovário (Rhodes et al., 1995). Após esse período os animais foram monitorados diariamente por ultrassonografia para identificação do corpo lúteo. Foram utilizados os dados de pluviosidade oficiais da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME).



Resultados e discussão

De acordo com os dados obtidos podemos verificar que há uma queda na temperatura retal do início das manifestações de estro até a ovulação. O momento da ovulação diferiu entre os dados analisados em diferentes épocas do ano. Na primeira etapa (estação seca) a ovulação ocorreu precocemente (entre 24 e 30 horas após o estro) em 80% das vacas avaliadas, enquanto que na segunda etapa (estação chuvosa) a maioria das vacas (80%) ovulou entre 30 e 36 horas após manifestação de estro. Esses resultados mostram que o tempo entre a detecção visual de cio e a ovulação foram maiores que aquele observado por Nelson et al. (2016) onde se verificou a ovulação após 21 horas da detecção do estro em vacas. Isso confirma a importância de se conhecer o padrão de ovulação de vacas criadas sob condições diferentes. Com esses resultados preliminares sugere-se aumentar as repetições em cada época do ano analisada para consolidar os resultados.

Consideração final

A partir do exposto conclui-se que existe uma variação no momento da ovulação a partir da detecção do estro em vacas criadas no semiárido nordestino. Assim, é imprescindível que os protocolos de reprodução assistida utilizados em fazendas dessa região levem em consideração essas diferenças a fim de obter resultados mais positivos no que diz respeito a prenhes do rebanho e conseqüentemente a produção de leite da propriedade.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo incentivo e ao INTA por dar condições à execução do trabalho.

Referências

- Alves NG, Pereira MN, Coelho RM.** Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. Anais. Belo Horizonte: CBRA, 2009.
- Bilby TR, Thatcher WW, Hansen PJ.** Efeito do hormônio do crescimento na fertilidade: dependência de variações sazonais, dosagem e fase da lactação. In: Curso Novos Enfoques Na Produção e Reprodução de Bovinos, XIII, 2009. Anais... Uberlândia, 2009, p.31-41.
- Cruz LV, Angrimani DSR, Rui BR, Silva MA.** Efeitos do estresse térmico na produção leiteira: revisão de literatura. Revista Científica de Medicina Veterinária, v.9, 2011.
- Ferreira AM.** Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras. 1990. 134f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1990.
- Figueiredo RA, Barros CM, Rocha GP, Papa FO.** Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. Rev Bras Reprod Anim, v.19, p.200-211, 1995.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP.** Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. J Reprod Fertil, v.87, p.223-230, 1989.
- Hamudikuwanda H, Erb HN, Smith RD.** Effects of sixty day milk yield on postpartum breeding performance in Holstein cows. J. Dairy Sci, v.70, p.2355-2365, 1987.
- Nelson ST, Haadem CS, Nodtvedt A, Hesse A, Martin AD.** Automated activity monitoring and visual observation of estrus in herds of loose housed Hereford cattle: Diagnostic accuracy and time of ovulation. Theriogenology, 2016. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.08.025.
- Nóbrega GH, Silva, EMN, Souza, BB, Manguiera JM.** A produção animal sob a influência do ambiente nas condições do semiárido nordestino. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável, v.6, p. 67- 73, 2011.
- Pathiraja N, Oyedipe EO, Voh Jr AA, Dawuda PM.** Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of corpora lutea in Zebu cows. Br Vet J, v.142, p.467-471, 1986.
- Randel RD.** Unique reproductive traits of Brahman and Brahman based cows. In: Fields MJ, Sand RS. Factors affecting calf crop. Boca Raton, 1994. p.23-43.
- Rhodes FM, De'ath G, Entwistle KW.** Animal and temporal effects on follicular dynamics in Brahman heifers. Anim Reprod Sci, v.38, p.265-277, 1995.
- Zeitoun MM, Rodriguez HF, Randel RD.** Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. Theriogenology, v.45, p.1577-1581, 1996.



Comparação do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e do corpo lúteo formado, em diferentes protocolos de sincronização da ovulação em vacas mestiças

Comparison of the diameter of the dominant follicle at the time of TAI and the corpus luteum formed in different synchronization protocols of ovulation in crossbred cows

Atimaan da Silva Franco^{1,*}, Renato Pinto Corrêa¹, Danielli Barbosa de Lima¹, Gilberto Pereira Gonçalves², Tomaz Pina Maia³, Aluizio Otávio Almeida da Silva⁴, Adriana Novaes dos Reis⁴, José Silva Sousa⁴

¹Programa de Residência em Clínica Médica e Reprodução de Ruminantes e Equídeos, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil; ²Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, Pará;

³REPROGEN, Reprodução e Genética, Castanhal, Pará, Brasil; ⁴Central de Biotecnologia de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: atimaanfranco1@hotmail.com

Abstract

The beef cattle industry in Brazil is characterized as an activity that goes through a period of growth. The experiment was conducted at the Center of Animal Reproduction Biotechnology (CEBRAN-UFPA), in the municipality of Castanhal, Pará State. The herd consisted of 24 crossbred cows with body condition score ranging between 2.5 and 3, 5, divided randomly into 2 groups (G1 and G2) which were managed with different protocols. G1 (D0-Be+P4 implant; D7-Pgf2; D9-measurement of the largest follicle + CE + eCG; D11- new measurement of FD and D15- verification of the presence or absence of CL and its measurement) G2 (D0-Be + P4 implant, removal of implant D8 + FSH; D9- BE; D10-measurement of FD; D14- verification of the presence of CL). In the present study was not observed statistical difference for the size of follicular diameter at the moment of TAI and CL formed in different synchronization protocols.

Keywords: follicle, corpus luteum, diameter.

Introdução

A pecuária de corte no Brasil caracteriza-se como uma atividade que atravessa um período de crescimento significativo, principalmente devido a crescente demanda mundial por proteínas de origem animal e pela dificuldade dos países concorrentes no mercado externo, em aumentarem seu rebanho bovino, levando a uma maior exportação, associada à maior competitividade do Brasil em termos de efetivo bovino e o preço no mercado internacional, destacando o agronegócio brasileiro.

De forma geral a pecuária de corte brasileira ainda é uma atividade de produtividade reduzida, a exemplo disso, em 2014, o país apresentou o maior abate anual de bovinos, no entanto, com uma taxa de desfrute de 20,3%, relativamente baixa quando comparada à países como Estados Unidos, Austrália e Argentina, cujas taxas são de 35,5%, 33,0% e 27%, respectivamente (Scot Consultoria, 2015). Entre os principais fatores para a reduzida produtividade no país destaca-se, a baixa eficiência reprodutiva dos rebanhos, forçando o pecuarista a buscar novas tecnologias que melhorem os índices reprodutivos (Restle et al., 2002). Nesse sentido tem-se nos últimos anos pesquisado e avaliado a viabilidade econômica de várias alternativas de manejo, que visem à melhora na eficiência reprodutiva do rebanho.

Biotécnicas reprodutivas, tais como, Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), são métodos de boa eficácia na aceleração do melhoramento genético de um rebanho, entretanto, diversos fatores podem influenciar programas de sincronização da ovulação para IATF em fêmeas bovinas, dentre esses fatores, o tamanho do folículo dominante no momento da IA e a ocorrência do estro mais característico após o protocolo de sincronização, tem sido relacionados uma resposta positiva aos protocolos (Bridges et al., 2010).

O objetivo do presente experimento foi comparar os diâmetros do folículo dominante, no momento da IATF, e do corpo lúteo formado em diferentes protocolos de sincronização da ovulação em vacas mestiças.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN-UFPA), localizada no município de Castanhal, Estado do Pará. O rebanho foi constituído por 24 fêmeas bovinas mestiças, com escore de condição corporal variando entre 2,5 e 3,5, divididas de modo aleatório em 2 grupos (G1 e G2), os quais foram manejados com protocolos distintos. Os animais foram mantidos em regime de estabulação com alimento e água a vontade. As fêmeas do grupo G1 foram submetidas ao implante intravaginal de progesterona (1g, PRIME[®] - TECNOPEC) e a aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC BE[®] - TECNOPEC) no D0. No D7 foi feito a aplicação da 0,15 mg prostaglandina (Prolise[®] - TECNOPEC), e no D9 foi realizada a retirada do implante e a mensuração do maior folículo identificado (FD). Além disso, foi efetuada a aplicação de 0,6 mg Cipionato de Estradiol (ECP[®] - Pfizer Saúde Animal) e 300 UI de eCG (Novormon[®] -



ZOETIS). No D11, momento que seria feita a IATF, foi realizada uma nova mensuração do FD e no D15 realizou-se a verificação da presença ou não do CL e sua mensuração. Nas fêmeas do grupo G2 foi utilizado o implante intravaginal de progesterona (1g; PRIME® - TECNOPEC) e 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC BE® - TECNOPEC) no D0, no D8 foi feito a retirada do implante e a mensuração do maior folículo (FD) identificado, também a aplicação de 10 mg de FSH (Folltropin® - TECNOPEC). No D9 foi realizada a aplicação de 1 mg Benzoato de Estradiol (RIC BE® - TECNOPEC). No D10, momento que seria feita a IATF, realizou-se uma nova mensuração do FD e no D14 realizou-se a verificação da presença ou não do CL e sua mensuração.

O diâmetro do FD presente em cada momento descrito foi identificado, mensurado e categorizado em <7,5 mm ou >7,5 mm. Os ovários foram examinados com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (DP-2200 VET – Mindray) e sonda de 5 MHz.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 8 repetições, sendo 2 blocos e 12 repetições por bloco. As médias foram analisadas por análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

As médias do diâmetro do FD (11,23 mm e 11,10 mm) não foram diferentes entre os dois grupos avaliados (G1 e G2, respectivamente) (Tabela 1). Em trabalho realizado por Sá Filho (2012) verificou-se taxa de ovulação de 95,8% para folículos acima de 11 mm no momento da IATF, e para folículos menores de 73,9%. Este mesmo autor relatou ainda, que o diâmetro do folículo esta relacionado diretamente com sua capacidade ovulatória, com isso vacas com um folículo pequeno tendem há não ovular e, quando ovulam, geram um óvulo de qualidade inferior e um CL pequeno, mantendo uma taxa de P4 abaixo dos níveis ideais, que muitas vezes não mantêm a prenhez.

A ovulação de folículos pequenos em vacas em anestro tende a ter menor taxa de ovulação e consequentemente menor diâmetro de CL (Burke et al., 2001). Semelhante ao que foi encontrado no presente trabalho, onde quanto maior o diâmetro do FD, maior também o diâmetro do CL.

Tabela 1. Comparação entre os diâmetros do FD e do corpo lúteo formado.

	Diâmetro do FD no momento da IATF e do corpo lúteo	
	FD (mm)	CL (cm)
G1	11,23 ± 4,1 ^a	1,49 ± 0,2 ^b
G2	11,10 ± 4 ^a	1,41 ± 0,3 ^b

Conclusão

Não houve diferença estatística para o diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e do corpo lúteo formado nos diferentes protocolos de sincronização. Em ambos os protocolos tanto o diâmetro folicular no momento da IATF quanto o diâmetro do corpo lúteo formado foram satisfatórios.

Referências

- Burke CR, Mussard ML, Grum DE, Day ML.** Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.161-174, 2001.
- Bridges GA, Mussard ML, Burke CR, Day ML.** Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.208-215, 2010.
- Restle J, Neumann M, Brondani IL, Alves Filho DC, Silva JHS, Gonçalves JM, Kuss F.** Produção do super precoce a partir de bezerros desmamados aos 72 ou 2010 dias de idade. *Rev Bras Zootec*, v.31, p.1803-1813, 2002.
- Sá Filho MF.** Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte. 2012. 124 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação: Reprodução animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- Scot Consultoria.** Rebanho brasileiro e participação nos abates. Disponível em: <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/40105/rebanho-brasileiro-e-participacao-nos-abates.htm>. Acesso em: 22 de fev. 2016.



Condição metabólica e integridade das membranas, plasmática e acrossomal, da célula espermática bovina após criopreservação em diferentes meios diluidores acrescidos com diferentes tipos de insulina

Metabolic condition and integrity of membranes, and plasma acrosomal, cell bovine sperm after cryopreservation in different extenders greater with different kinds of insulin

Cristian Alex Aquino Lima¹*, Caio Fernando Sousa Moraes², Anderson Pereira Reis², Carla Janaina Rebouças Marques do Rosário³, Ana Karoline Sousa Mendes Simas¹, Ferdinan Almeida Melo³, Fernando Andrade Souza⁴

¹Mestrando em Ciência Animal (UEMA), São Luís, MA, Brasil; ²Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária (UEMA), São Luís, MA, Brasil; ³Doutorando Bionorte (UFMA), São Luís, MA, Brasil; ⁴Professor Doutor do Departamento de Patologia (UEMA); ⁴Professor Doutor em Reprodução Animal (UFAC), Rio Branco, AC, Brasil.

*E-mail: caiofernandosmoraes@gmail.com

Abstract

*Seminal plasma is a fluid with essential role in sperm functions in vivo, from ejaculation to fertilization. Among the hormones present in this medium, insulin stands out, due to its key role in the structure and motility, favoring fertilization. Insulin acts as preservation factor not able sperm and may be the crux of sperm preservation when using cryogenic processes. This study aimed to evaluate the metabolic and structural condition of bovine sperm cells after freezing using extenders plus different types of insulin and different types of egg yolk. Our results showed that sperm motility was not affected by treatments used (insulin and yolk). In conclusion, the type of egg yolk, the paw (*Anas platyrhynchos*), increased the viability of cryopreserved sperm cells, regardless of the type of insulin used.*

Keywords: spermatozoon, freezing, motility.

Palavras-chave: espermatozóide, congelamento, motilidade.

Introdução

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para as funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação até a fecundação. Dentre os hormônios presentes neste meio, destaca-se a insulina, por apresentar papel primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação (Tena-Sempere e Barreiro, 2002). Segundo van Tilburg et al. (2008), a insulina atua como fator de preservação do estado não capacitado, podendo, desta forma, ser ponto crucial da preservação espermática quando se utiliza processos criogênicos. Além disso, a capacidade autônoma do espermatozoide de liberar insulina sugere que ele, por meio de um circuito de alça curta autócrina, pode fornecer o recrutamento de substratos energéticos, de acordo com as suas necessidades metabólicas (Andò e Aquila, 2005). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a condição metabólica e estrutural da célula espermática bovina após a congelamento utilizando meios diluidores acrescidos de diferentes tipos de insulina e diferentes tipos de gema de ovo.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Jataí no município de Itapecuru Mirim - MA e no Núcleo de Bovinos da Universidade Estadual do Maranhão campus São Luís - MA, sendo utilizados 4 touros da raça Nelore e 2 da raça Gir com médias de 42 meses e 500 kg selecionados como aptos a reprodução, segundo CBRA (1998). As coletas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação. As análises laboratoriais ocorreram no Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Medicina Veterinária – UEMA, São Luís-MA. Neste trabalho foram criopreservados apenas um ejaculado por touro o qual apresentou motilidade igual ou superior a 65% de motilidade total e vigor mínimo de 3 (escala de 1-5). Assim, minimizando-se a influência do ejaculado, bloqueando o efeito do touro, sendo que o mesmo foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática utilizando microscopia óptica (Microscópio modelo XSZ-107, Coleman). Utilizou-se o diluidor NAGASE, preparado com gema de ovo de galinha e de pata, para a congelamento do sêmen. Após a avaliação da motilidade e vigor das amostras, o ejaculado de cada animal foi dividido em seis alíquotas, de mesmo volume, ficando três alíquotas para cada diluidor (GEMA DE OVO DE GALINHA e PATA) utilizando-se para cada uma delas um tipo de insulina (NPH ou REGULAR) na concentração de 500uUI/mL, atingindo uma concentração de 50×10^6 sptzs/mL. Os tubos contendo as seis alíquotas de sêmen diluído, foram envasadas em palhetas de 0,5 mL (25×10^6 sptzs/palhetas). A criopreservação foi realizada com o sistema programável (TK3000), utilizando a curva P1S2 (queda positiva de 0,5°C/min). Para avaliação do sêmen criopreservado foram realizados os seguintes testes funcionais: teste de termo resistência rápido (TTR), teste hiposmótico (HOST) e Azul de tripan/Giemsa (Feliciano Silva, 1998).

Resultados e Discussão

A motilidade espermática não foi afetada pelos tratamentos (GEMA e INSULINA) ($P > 0,05$; Tab. 1).

Tabela 1. Efeito da adição do tipo de insulina e do tipo de gema de ovo no meio extensor sobre a motilidade espermática.

Momentos de avaliação		Teste de termo resistência			
		Tempo 0	Tempo 10	Tempo 20	Tempo 30
Gema de Galinha	Controle	37,50 ± 11,73	25,83 ± 10,68	10,00 ± 7,00	7,00 ± 9,59
	Insulina NPH	26,67 ± 7,53	15,00 ± 7,75	10,83 ± 7,36	4,67 ± 5,47
	Insulina regular	25,00 ± 12,25	20,00 ± 13,42	8,67 ± 11,43	1,67 ± 4,08
Gema de Pata	Controle	31,67 ± 11,69	20,83 ± 7,36	12,50 ± 4,18	7,50 ± 6,12
	insulina NPH	30,00 ± 6,32	17,50 ± 10,37	10,00 ± 8,94	5,83 ± 8,01
	Insulina Regular	27,50 ± 11,81	15,83 ± 11,09	4,17 ± 4,79	2,50 ± 2,50

Não houve diferença entre os tratamentos pelo teste de Friedman. Cada insulina foi adicionada na concentração de 500uUI/mL.

A capacidade autônoma do espermatozoide de liberar insulina sugere que ele pode fornecer o recrutamento de substratos energéticos, de acordo com as suas necessidades metabólicas (Andò e Aquila, 2005). No entanto, segundo os dados aqui apresentados, o tipo de gema de ovo teve efeito direto na integridade da membrana plasmática, segundo avaliação do HOST (Fig. 1). Onde a gema de ovo de pata apresentou melhor resultado. Nesta avaliação se pode verificar menor resposta da insulina REGULAR na manutenção da integridade da membrana.

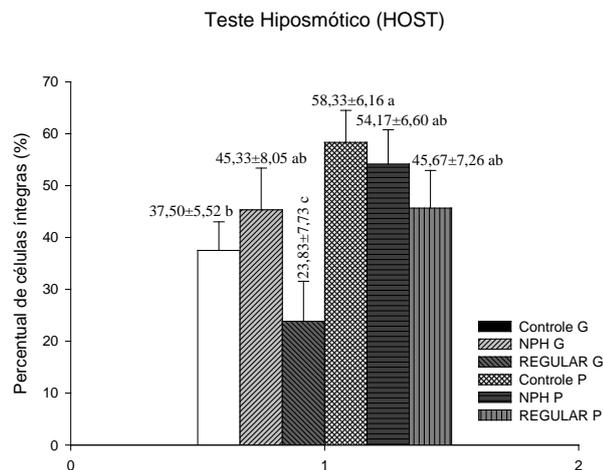


Figura 1. Porcentagem de células íntegras segundo o teste hiposmótico. G: gema de galinha. P: gema de pata. (média ± erro padrão).

Os resultados da integridade da membrana acrossomal estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Efeito da adição do tipo de insulina e do tipo de gema de ovo no meio extensor sobre motilidade espermática.

Momentos de avaliação		Giemsa/Azul de TRIPAM			
		VCA	VSA	MCA	MSA
Gema de Galinha	Controle	3,67 ± 3,14	0,17 ± 0,41	90,67 ± 5,99	5,50 ± 4,23
	Insulina NPH	9,33 ± 10,37	0,17 ± 0,41	83,17 ± 6,49	7,33 ± 4,59
	Insulina Regular	7,83 ± 5,12	2,00 ± 3,03	83,50 ± 8,29	6,67 ± 3,20
Gema de Pata	Controle	9,17 ± 3,19	0,00 ± 0,00	84,83 ± 5,46	4,50 ± 5,68
	Insulina NPH	5,17 ± 6,34	0,00 ± 0,00	87,83 ± 4,49	7,00 ± 4,69
	Insulina Regular	7,17 ± 5,46	0,33 ± 0,82	87,50 ± 4,64	4,83 ± 2,79

VCA: vivos com acrossoma; VSA: vivos sem acrossoma; MCA: mortos com acrossoma e MSA: mortos sem acrossoma. Médias comparadas pelo teste t student. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos quando analisados dentro de cada categoria, havendo diferença ($P < 0,05$) apenas dentro de tratamento.

Conclusões

Podemos concluir nesse estudo que o tipo de gema de ovo utilizada, o de pata (*Anas platyrhynchos*), aumentou a viabilidade das células espermáticas criopreservadas, independente do tipo de insulina utilizada.



Referências

Andò S, Aquila S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.245, n.1-2, p.1-6, 2005.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

Feliciano Silva AED. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p., (Embrapa Recursos Genéticos, Documentos, 35), 1998.

Tena-Sempere M, Barreiro, ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.188, p.9-13, 2002.

Tilburg MFV, Silva JFS, Dias AJB, Quirino CR, Fagundes, B. Influência da Insulina na Congelabilidade do Sêmen de Ovino. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, p.731-739, 2008.



Efeito da categoria vaca ou novilha na qualidade dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) de fêmeas da raça Girolando

Effect of cow or heifer category on the quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) from Girolando females

Sérgio Henrique Costa Júnior¹*, Douglas Lemes Dadalto², Brenda Karine Lima do Amaral¹, Andressa Mendes Alves¹, Hélder de Moraes Pereira⁵, Hamilton Pereira Santos⁶, Ricardo de Macêdo Chaves⁴, Felipe de Jesus Moraes Júnior³

¹Graduandos em Medicina Veterinária, CCA/UEMA, São Luís, MA, Brasil; ²Mestre em Ciência Animal, Mestrado em Ciência Animal, UEMA, São Luís, MA, Brasil; ³Bolsista de Pós-Doutorado, Mestrado em Ciência Animal/CAPES, UEMA, São Luís, MA, Brasil; ⁴Professor Adjunto III – Departamento das Clínicas, CCA/UEMA, ⁵Professor Adjunto IV – Departamento das Clínicas, CCA/UEMA, São Luís, MA, Brasil; ⁶Professor Adjunto IV – Departamento de Patologia, CCA/UEMA, São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: sergiocosta94@outlook.com

Abstract

This study had the objective of evaluate the quality and the proportion of COCs collected by follicular aspiration Girolanda females. Eight cows and ten heifers were submitted in four OPU sessions with an interval of 15 days. The heifer category provides a larger amount of recovered structures (GIII and AT / DG) compared to cows, but cows had higher amount of GII.

Keywords: CCOs, Girolando, OPU.

Palavras-chave: CCOs, Girolando, OPU.

Introdução

A *Ovum Pick-up* (OPU) é uma das etapas do processo de Produção *in vitro* de embriões, sendo crucial para a obtenção de estruturas para biotécnicas reprodutivas visando um maior número de descendentes num período de tempo curto. Vacas e novilhas têm sido alvo de várias pesquisas, para que o aproveitamento mais racional de seus gametas seja possível. Segundo Hafez (2000), a fêmea bovina possui, aproximadamente 70.000 oócitos em seus ovários, que podem gerar perto de 0,01% de produtos viáveis, ou seja, um número próximo a dez descendentes em sua vida reprodutiva. O objetivo deste experimento consiste na avaliação dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) obtidos por fêmeas da raça Girolando.

Material e Métodos

Foram utilizadas novilhas (n = 10) e vacas (n = 8) pertencentes ao Núcleo de Ruminantes - UEMA. Foram realizadas quatro sessões de aspiração folicular (OPU) a intervalos de 15 dias. As doadoras foram contidas para a realização da OPU utilizando um aparelho de ultrassom (Chison, 9300VET), com transdutor convexo de 5,0 MHz acoplado a uma guia de aspiração transvaginal (WTA Ltda., Brasil). As aspirações foram realizadas introduzindo a guia de aspiração na vagina e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram posicionados na linha de punção indicada no ultrassom, os folículos acima de 2 mm sendo puncionados e aspirados. O material aspirado foi encaminhado para Laboratório de Reprodução Animal (UEMA) e transferido para um filtro de coleta de embriões (Nutricell®). Os CCOs foram transferidos para placas e classificados de acordo com a qualidade morfológica, conforme Leibfried e First (1979), apenas os CCOs (GI, II e III) foram considerados viáveis. Os dados para as variáveis estudadas foram comparados pelo teste do χ^2 , para P < 0,05.

Resultados e Discussão

Das quatro sessões de OPU, foram recuperados 778 CCOs totais (458 CCOs novilhas e 320 CCOs vacas) e 732 CCOs viáveis (427 CCOs novilhas e 305 CCOs vacas) das fêmeas doadoras.

O efeito da categoria (novilha e vaca) e número total de estruturas recuperadas por OPU são apresentados na Tabela 1. As novilhas foram superiores (P < 0,05) em relação as vacas quanto ao número de CCOs totais e viáveis.

Estes achados diferem aos relatados por Rizos et al. (2005), que observou a superioridade das novilhas dividindo-as em três grupos: 12-18, 19-24 e 25-30 meses obtendo, respectivamente, 708, 804 e 682 CCOs totais.

Neste sentido, fêmeas mais novas apresentam maior população folicular quando comparada com vacas, no entanto, os animais pré-púberes têm mostrado reduzida competência de seus oócitos para chegar até blastocisto (Revel et al., 1995).

A maior proporção de CCOs totais nem sempre corresponde em maiores taxas de blastocistos, visto que Rizos et al. (2005), observou que os oócitos das vacas mestiças foram mais competentes na produção de embrião em relação as novilhas mestiças.

O efeito das categorias sobre a proporção de recuperação baseada na qualidade oocitária são apresentados na Tabela 2. Não houve diferença significativa quanto a proporção grau I entre as categorias. As



vacas foram superiores ($P < 0,05$) na proporção GII quando comparadas às novilhas. Porém, as novilhas apresentaram melhores proporções em GIII e atrésicos e/ou degenerados. Não houve diferença significativa para proporção GIV entre as categorias.

Ramos et al. (2006), obtiveram 55 CCOs de GI ao aspirar vacas da raça Gir sem estimulação hormonal. Os CCOs GI possuem maior capacidade de clivagem na produção *in vitro* (Seneda et al., 2003).

Independentemente da sua origem (vaca ou novilha), os CCOs de boa qualidade apresentam várias camadas de células do *cumulus* completas e compactas, citoplasma homogêneo e finamente granulado (Blondin et al. 1995).

Tabela 1. Número total de estruturas recuperadas por OPU.

Estruturas recuperadas	Categorias			
	Novilhas		Vacas	
	n	%	n	%
Totais	458	58,8 ^A	320	41,2 ^B
Viáveis	427	58,3 ^A	305	41,7 ^B

^{A, B} letras desiguais na linha diferem estatisticamente pelo teste do χ^2 , para $P < 0,05$.

Tabela 2. Proporção de recuperação baseada na qualidade oocitária entre os tratamentos e entre os graus de qualidade oocitária conforme classificação morfológica.

Estruturas recuperadas	Categorias			
	Novilhas		Vacas	
	n	%	n	%
GI	98	23,0 ^A	75	24,6 ^A
GII	116	27,2 ^B	149	48,9 ^A
GIII	213	49,8 ^A	81	26,5 ^B
GIV	3	0,7 ^A	1	0,3 ^A
AT/DEG	28	6,1 ^A	14	4,4 ^B

^{A, B} letras desiguais na linha diferem estatisticamente pelo teste do χ^2 , para $P < 0,05$.

GI - Grau 1; GII - Grau 2; GIII - Grau 3; GIV - Grau 4; AT/DEG - Atrésico e/ou Degenerado.

Conclusão

A categoria novilha proporcionou uma maior quantidade de estruturas recuperadas (GIII e AT/DG) em relação às vacas, porém as vacas apresentaram maior quantidade de GII.

Referências

- Blondin P, Sirard MA.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.54-62, 1995.
- Hafez ESE, Hafez B.** Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. *Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap.5, p.68-82, 2000.
- Leibfried-Rutledge M L, First NL.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*, v.48, p.76-86, 1979.
- Ramos AA, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA, Viana JHM, Henry MRJM.** Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.58, p.341-347, 2006.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y.** Low developmental capacity of in vitro matures and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil*, Cambridge, v.103, p.115-120, 1995.
- Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee J, O'Farrell K, Boland M.** Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donos for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, v.63, p.939-949, 2005.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB.** Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v.59, p.1435-1440, 2003.



Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbST) no perfil plasmático da progesterona, estradiol, hormônio do crescimento e IGF-1 de fêmeas bovinas

Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on the plasma levels of progesterone, estradiol, growth hormone and IGF-1 of females bovines

Hallef Mithchel Pereira Trovão^{1,*}, Brenda Karine Lima do Amaral¹, Sérgio Henrique Costa Júnior¹, Carla Janaína Rebouças Marques do Rosário², Ferdinan Almeida Melo³, Hamilton Pereira dos Santos⁴, Ricardo de Macêdo Chaves⁴, Felipe de Jesus Moraes Júnior⁵

¹Graduandos em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil; ²Mestranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil; ³Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil; ⁴Departamento das Clínicas, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil;

⁵Departamento do Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão.

*E-mail: halleftrovao@live.com

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of recombinant bovine somatotropin on the plasma levels of progesterone, estradiol, growth hormone and IGF-1. 8 cows Girolando were divided into three groups: control, 250 mg rbST and 500 mg rbST. Blood samples were collected 60 days prior to aspiration, in 12-day intervals, with the samples taken on the same days of rbST applications. For hormone measurements, ELISA commercial kits were used. The hormone concentrations were subjected to the normal pattern Cramer-von Mises and for average of comparison, the test Student-Newman-Keuls (SNK) was used, with 5% probability. It was not possible to measure the plasma concentration of GH hormone. The rbST administration had no effect on plasma concentrations of progesterone, estradiol and IGF-1 among the groups treated with 250 mg and 500 mg and the untreated group, there was also no significant variance between the days of application and OPU.

Keywords: bovine, rbST, hormones.

Palavras-chave: bovinos, rbST, hormônios.

Introdução

O conhecimento das particularidades reprodutivas dos bovinos, com concomitante uso das ferramentas de biotécnicas reprodutivas, visa à maximização genética desses animais e uma maior geração produtos em um curto espaço de tempo. A Somatotropina é um hormônio hipofisário que age, no âmbito reprodutivo feminino, direta ou indiretamente sobre a maturação do oócito: aumenta os receptores de gonadotropinas e, assim, exerce influência na foliculogênese (Sirotkin e Makarevich, 2002). Considerando a importância da caracterização do eixo endócrino-reprodutivo no sentido de estabelecer o melhor aproveitamento das técnicas aplicadas à reprodução, este estudo teve por razão determinar as concentrações plasmáticas progesterona, estradiol, hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) de vacas e novilhas em função do tratamento com somatotropina recombinante bovina (rbST).

Material e Métodos

Utilizou-se 8 fêmeas da raça Girolando divididas em três grupos: controle (n = 2), 250 mg rbST (n = 3) e 500 mg rbST (n = 3) oriundas do Núcleo de Ruminantes da UEMA. Foram coletadas amostras de sangue (plasma) de cada fêmea doadora 60 dias antes da primeira aspiração folicular, em intervalos de 12 dias, realizadas nos mesmos dias das aplicações de rbST e das aspirações foliculares (intervalos de 7 dias), diretamente da veia ou artéria coccígea, com posterior centrifugação, armazenagem e determinação das concentrações plasmáticas hormonais pelo teste ELISA. As concentrações plasmáticas dos hormônios foram submetidas ao Teste de normalidade Cramer-von Mises e para comparação de média foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls (SNK) 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Não foi possível mensurar a concentração plasmática do hormônio GH por falha na leitura do espectrofotômetro. As concentrações médias de progesterona durante o período de aplicação de rbST e OPU em fêmeas bovinas estão representadas no Figura 1 e demonstraram variação (P < 0,05) entre os dias de coleta das amostras. Estas foram inferiores a 8 ng/mL para todos os animais dos três grupos monitorados durante o período das aplicações do hormônio, com posterior emergência para valores superiores a 10 ng/mL durante o período das OPU. Não foi observada diferença estatística nas concentrações plasmáticas de progesterona entre os grupos tratados com diferentes doses de rbST e o grupo não tratado, dados que corroboram com o resultados obtidos por Da Silva Haas et al. (2007) que, com a aplicação única de 250 mg de rbST em novilhas mestiças receptoras de embrião durante o estro, não observaram efeito na concentração sérica de progesterona entre o sexto e o oitavo dia. Entre os grupos experimentais tratados e não tratados com somatotropina recombinante bovina e entre os

dias das aplicações e OPUs não foi observada diferença estatística nas concentrações plasmáticas médias de estradiol (Fig. 2), ou seja, a somatotropina recombinante bovina não surtiu efeito positivo ou negativo sobre o estradiol plasmático. As concentrações plasmáticas médias de estradiol dos animais variaram em grupo controle de 100 a 137 ng/mL; grupo tratado com 250 mg de rbST de 75 a 333,3 ng/mL; e grupo tratado com 500 mg de rbST de 75 a 333,3 ng/mL durante todo o período experimental. Schemm et al. (1990) também não observou efeito positivos da rbST sobre a flutuação sérica de E2. Os níveis circulantes de IGF-1 não teve interação significativa entre os tratamentos e entre os períodos de aplicação/OPUs ($P < 0,05$), exceto durante a última OPU, onde o grupo tratado com 500mg de rbST obteve média de 23,33 ng/mL, estando abaixo das outras médias encontradas durante o período experimental (frequentemente superiores a 50 ng/mL). As maiores amplitudes das concentrações séricas médias de IGF-1 foram encontradas na proporção de 225 ng/mL (OPUV), 350 ng/mL (OPUV) e 133,33 (AIV) para os grupos controle, 250mg e 500mg, respectivamente, indicando homogeneidade entre os grupos na concentração sérica dessa variável (Fig. 3). A diminuição no consumo ou baixa qualidade de alimentos pode reduzir a magnitude dos resultados da ação da rbST (Rausch et al., 2002), onde as concentrações séricas do IGF-1 mudam em resposta à condição nutricional (Lucy, 2000). Isso pode sugerir que a resposta nula da somatotropina recombinante bovina sobre os níveis circulantes de IGF-1, neste trabalho, pode advir da condição de escore corporal dos animais utilizados nos grupos experimentais, que estavam entre 2 – 2,5 (escala proposta por Ferreira e Torres, 1993).

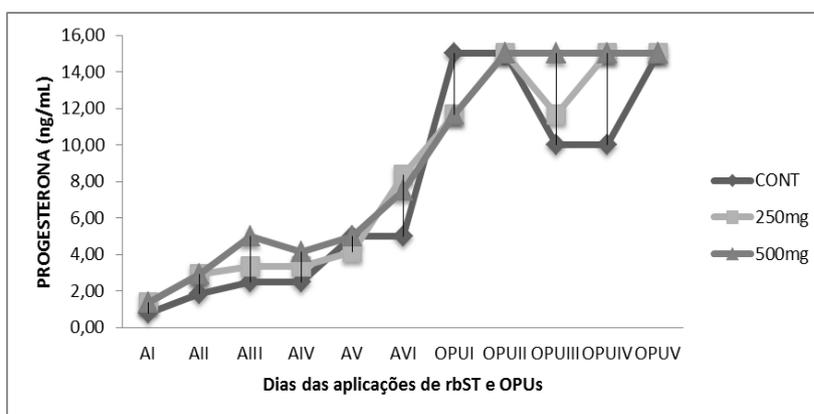


Figura 1. Média das concentrações plasmáticas de progesterona de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum-pick up*.

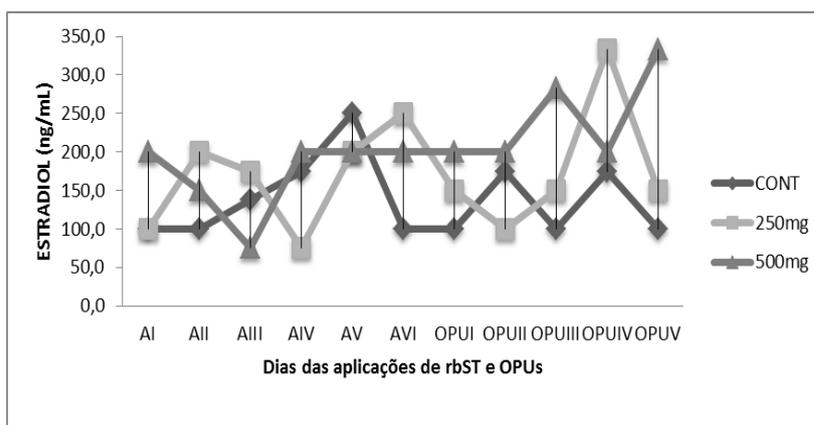


Figura 2. Média das concentrações plasmáticas de estradiol de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum-pick up*.

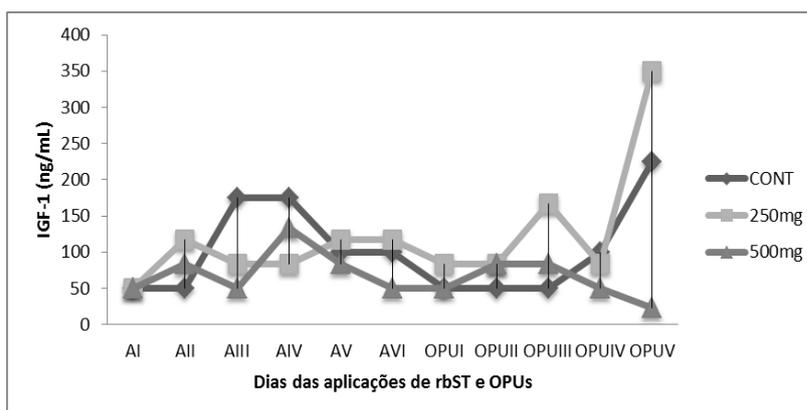


Figura 3. Média das concentrações plasmáticas de IGF-1 de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração Ovum-pick up. a,b Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Conclusão

A administração de somatotropina recombinante bovina em intervalos de 12 dias por 60 dias não surtiu efeito sobre a dinâmica hormonal de fêmeas bovinas nas concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e IGF-1 entre os grupos tratados com 250 mg e 500 mg e o grupo não tratado, não havendo também variância significativa entre os dias de aplicação e OPUs.

Referências

Da Silva Haas GT, De Carvalho Fernandes CA, Da Costa EP, Alves Torres CA, Fernandes Marques PA, Guiselli Lopes F, Rêgo de Paula TA. Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbst). *Revista Ceres*, v.54, p.26-32, 2007.

Lucy MC. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*, v.83, n.7, p.1635-1647, 2000.

Rausch MI, Tripp MW, Govoni KE, Zang W, Webert WJ, Crooker BA, Hoagland TA, Zinn SA. The influence of level of feeding on growth and serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I binding proteins in growing beef cattle supplemented with somatotropin. *J Anim Sci*, v.80, p.94-100, 2002.

Sirotkin AV, Makarevich AV. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. *Anim Reprod Sci*, v.70, p.111-126, 2002.

Schemm SR, Deaver DR, Griel LC Jr, Muller LD. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol Reprod*, v.42, p.815-821, 1990.



Efeito de diferentes meios e concentrações espermáticas na fecundação *in vitro* curta sobre a produção de embriões bovinos

Effect of different mediums and sperm concentrations in the short-in vitro fertilization on the bovine embryo production

Camila Muniz Cavalcanti*, Iana Sales Campelo, Mirelly Mirna Alves de Sousa Silva, Luciana Magalhães Melo, Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Vicente José de Figueirêdo Freitas

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*E-mail: camilacavalcanti89@hotmail.com

Abstract

The present study investigated the effect of two different mediums (IVF-TALP and BO) and sperm concentrations (16×10^6 and 20×10^6), during the short-in vitro fertilization (IVF) on bovine embryo production. Thus, after in vitro maturation (IVM), oocytes were randomly distributed into three groups: traditional IVF (control), IVF-TALP and Brackett-Oliphant (BO). The groups IVF-TALP and BO were subdivided according sperm concentration (16×10^6 and 20×10^6) used for short-IVF (6 h). For the control group, the IVF was performed for 18 h. Concerning the cleavage rate, the BO-20 group showed the best results (77,1%). On the other hand, for the blastocyst yield, the highest results were obtained in control and BO-20 groups: 20.8% and 24.6%, respectively. In conclusion, it seems that BO medium with 20×10^6 spz/mL positively influence the bovine embryo in vitro production. However, further studies should be performed.

Keywords: *in vitro* production, bovine embryo, short-IVF.

Palavras-chave: produção *in vitro*, embriões bovinos, FIV-curta.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma realidade no mundo e o Brasil já há algum tempo lidera a produção mundial (Thibier, 2004). Nesse processo, o sêmen congelado-descongelado tem sido utilizado com bastante frequência devido às vantagens de armazenamento por longos períodos e acesso a material genético de qualidade. No entanto, este sêmen possui uma curta sobrevivência nos meios de cultivo tradicionais e a realização da FIV de curta duração pode não ser suficiente para a capacitação *in vitro* dos espermatozoides (sptz). O meio de fecundação mais comumente usado é o Tyrode-albumina-lactato-piruvato (TALP; Parrish et al., 1986), acrescido de heparina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina (TALP-FIV). Além disso, para FIV de curta duração, poucos ensaios apresentam um protocolo satisfatório no que diz respeito à concentração de sptz e ao meio de FIV que promovam melhores taxas de fecundação e de produção de blastocistos. Desta forma, novos protocolos de FIV curta devem ser avaliados para garantir melhores resultados no desenvolvimento de embriões bovinos oriundos de PIV. Assim, este trabalho tem por objetivo realizar a comparação de diferentes meios de fecundação e de concentrações espermáticas para a FIV de curta duração na espécie bovina.

Material e Métodos

Ovários bovinos foram obtidos em abatedouros locais e transportados ao laboratório, onde os folículos acima de 2 mm de diâmetro foram aspirados para a colheita dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs), os quais foram classificados de acordo com Leibfried e First (1979). Os CCOs selecionados foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em meio TCM-199 suplementado com fatores de crescimento e hormônios a 38,5°C por 23 h em 5% de CO₂. Para a FIV, os CCOs foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: FIV tradicional (controle), FIV-TALP e BRACKETT-OLIPHANT (BO). Os grupos FIV-TALP e BO foram subdivididos em mais dois grupos de acordo com a concentração do sêmen (16×10^6 e 20×10^6 sptz/mL). A FIV para o grupo controle foi de 18 h e para os grupos experimentais foi de curta duração (6 h). O sêmen congelado-descongelado foi selecionado em gradiente de Percoll (45%/90%), lavado duas vezes e diluído no respectivo meio de fecundação de cada grupo e ajustado para a concentração desejada. Os CCOs foram coincubados com os sptz em gotas de 100 µL cobertas com óleo mineral a 38,5°C em 5% de CO₂. Após a FIV, os presumíveis zigotos foram cultivados *in vitro* por oito dias em fluido sintético de oviduto e em atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. O desenvolvimento *in vitro* foi analisado por meio da avaliação das taxas de clivagem (dia 2) e de blastocisto (dias 7-8). Essas taxas foram comparadas pelo teste exato de Fisher com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir de duas repetições estão resumidos na Tabela 1. O grupo BO-20 apresentou a maior taxa de clivagem (77,1%) e com diferença estatística entre os demais grupos, incluindo o controle, cuja taxa de clivagem foi 52,8% (P < 0,05). Este padrão se repetiu na taxa de blastocisto no dia 8, no



qual o grupo BO-20 apresentou maior taxa de blastocistos (24,6%), sendo estatisticamente diferente ($P < 0,05$) entre os demais grupos, porém similar ao grupo controle (20,8%). Além disso, não foram obtidos blastocistos no grupo FIV-TALP. No entanto, em búfalos, Hammam et al. (2010) encontraram melhores taxas de fecundação utilizando o meio TALP, indicando que outros ensaios devem ser realizados para confirmação desses resultados.

Tabela 1. Efeito da utilização de diferentes meios de fecundação *in vitro* e concentrações de espermatozoides/mL sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos.

Tratamento	Concentração ($\times 10^9$ spz/mL)	Presumíveis		Taxa de blastocisto (%)
		zigotos	clivagem (%)	
Controle	2	53	28 (52,8) ^a	11 (20,8) ^a
FIV-TALP	16	53	2 (3,8) ^b	0 (0,0) ^b
	20	58	11 (19,0) ^c	0 (0,0) ^b
BO	16	55	18 (32,7) ^{a,c}	4 (7,3) ^{a,b}
	20	61	47 (77,1) ^d	15 (24,6) ^{a,c}

Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística ($P < 0,05$).

Conclusão

Na FIV curta, o meio BO em uma concentração espermática de 20×10^6 spz/mL parece melhorar as taxas de fecundação de embriões bovinos. No entanto, ensaios posteriores devem ser realizados.

Referências

- Leibfried L, First NL.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*, v.48, p.76-86, 1979.
- Hammam AM, Whisnant CS, Elias A, Zaabel SM, Hegab AO, Abu-El Naga EM.** Effect of media, sera and hormones on in vitro maturation and fertilization of water buffalos (*Bubalus bubalis*). *J Anim Vet Adv*, v.29, p.27-31, 2010.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL.** Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- Thibier M.** Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. *International Embryo Transfer Society Newsletter*, p.12-19, 2004.



Efeito do captopril na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Effect of captopril in maturation in vitro of oocyte bovine

Antonio de Sousa Junior^{1*}, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco², Luiz Harlilton Cavalcante Monteiro Mota², Felipe de Jesus Moraes Junior³, Isolda Marcia Rocha do Nascimento¹, Amilton Paulo Raposo Costa², Marlon de Araújo Castelo Branco², Jose Adalmir Torres de Souza²

¹Colégio Técnico Agrícola (CTT), Teresina, PI, Brasil; ²Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil;

³Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: sousajunior@ufpi.edu.br

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of captopril on the in vitro maturation of oocytes. 1627 COCs cattle slaughter houses were used, were subsequently screened, classified into grades I and II, according to the morphological quality, and submitted to the IVM process, distributed in four treatments: T1 - control; T2 - 5µM of captopril; T3 - 10µM of captopril; and T4 - 15µM of captopril, incubated in an incubator at 38.5 ° C with an atmosphere of 5% CO₂. After 22 hours, the COCs were stripped to evaluate the rate of maturation, which were as follows: T1 - 56.60% (120/212); T2 - 60.60% (240/396); T3 - 52.88% (174/329) and T4 - 58.30% (207/355). The results show that there was no statistically significant difference ($P > 0.05$) between treatments during maturation, concluding that captopril supplementation did not affect the maturation of COCs.

Keywords: bovine, captopril, oocyte.

Palavras-chave: bovino, captopril, oócito.

Introdução

Diversos estudos tem sido realizados com o objetivo de otimizar e melhorar as biotecnologias, muitos ligados ao complexo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Mais recentemente, pesquisas relacionadas com o Sistema Renina Angiotensina (SRA) têm demonstrado a existência de peptídeos do SRA em diversos tecidos, tais como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores, permitindo distinguir um SRA local e um circulante (Obermüller et al. 2004). Pesquisas conduzidas na Universidade Federal do Piauí têm demonstrado o envolvimento das angiotensinas na ovulação, maturação oocitária e esteroidogênese (Feitosa, 2014), principalmente a ANG II e ANG (1,7).

Estudos indicaram a presença da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) biologicamente ativa na superfície das células da granulosa, e relatam que 94-100% dos folículos em desenvolvimento e 89-96% dos folículos atresícos continham altos níveis de ECA, o que sugere um possível papel desta enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular e atresia (Daud et al., 1990).

O objetivo deste experimento foi verificar a influência do inibidor de ECA, Captopril, na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Material e Métodos

Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados em solução fisiológica 0,9% a 37°C, ao laboratório, onde foram lavados em mesma solução e temperatura. No laboratório, os ovários foram aspirados, dos quais foram recuperados os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) por aspiração dos folículos que mediam entre 2 a 6 mm, utilizando agulha descartáveis de 21G, acoplado a seringa de 10 mL. O conteúdo do aspirado folicular, após 20 minutos de sedimentação, foi depositado em uma placa de Petri para rastreamento e seleção de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Leidfried; First, 1979). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos.

Foram utilizados 1657 oócitos (Grau I e II), cultivados na ausência ou presença de captopril, conforme os seguintes tratamentos: T1 - controle; T2 - 5µM de captopril; T3 - 10µM de captopril; e T4 - 15µM de captopril. Foram realizados 12 repetições e utilizados 20 a 30 oócitos por tratamento.

Os CCOs selecionados foram maturado de acordo com os tratamentos 0 à 20 µM de captopril, em meio de maturação acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, a 38,5 °C por 22 horas.

Após este período, os oócitos foram mantidos por 10 minutos em placa NUNCLON®, contendo 400 µL de meio de desnudamento (1 mL de TQC Holding + 10 mg/mL de hialuronidase), em seguida foram desnudados com auxílio de sucessivas pipetagens, e levados sob estereoscópio, para observação da extrusão do primeiro corpúsculo polar.

As taxas de maturação dos CCOs, foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Qui-Quadrado (χ^2), e a comparação das medias pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados pelo programa ASSISTAT Versão 7.7. beta (pt).



Resultados e Discussões

A taxa de maturação após 22 horas foi de 56,60; 60,35; 52,89 e 57,82%. A extrusão do primeiro corpúsculo polar foi identificada para classificar os oócitos maturados. A adição do captopril ao meio de maturação *in vitro* não alterou a maturação nuclear dos oócitos (Tab. 1).

Tabela 1. Taxa de maturação de oócitos bovinos com ou sem a adição de captopril no meio de MIV.

Grupo	Taxa de Maturação
0 μ M	56,60 % (120/212) a
5 μ M	60,35 % (240/396) a
10 μ M	52,89 % (174/329) a
20 μ M	57,82 % (207/355) a

Letras distintas, na mesma coluna, indicam diferença pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), ao nível de 5% de probabilidade.

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao CCOs expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Consistem em uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas do CCO, que devem ocorrer de forma simultânea, de modo a capacitar a fecundação e possibilitar o desenvolvimento embrionário adequado (Takada, 2008).

Alguns estudos sobre maturação *in vitro* têm avaliado o efeito de diferentes variáveis sobre a aquisição da competência e qualidade de oócitos bovinos. A adição de macromoléculas e suplementos no meio de maturação, a utilização de inibidores da maturação nuclear (Barreto et al., 2003), o efeito de co-cultivo (Ancioto et al., 2004) são exemplos de algumas pesquisas desenvolvidas.

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) foi identificada em ovários de rata, no epitélio germinativo ao redor do corpo lúteo, em células da granulosa, vasos sanguíneos e estroma ovariano (Speth; Husain, 1988), bem como no fluido folicular de bovinos (Nielsen et al., 2002). Estudos indicaram a sua presença biologicamente ativa na superfície das células da granulosa, e relatam que 94-100% dos folículos em desenvolvimento e 89-96% dos folículos atrésicos continham altos níveis de ECA, o que sugere um possível papel desta enzima nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular e atresia (Daud et al., 1990). O uso de inibidor da ECA, portanto, deveria influenciar positivamente a maturação oocitária, o que não foi observado neste experimento.

As taxas de maturação oocitária observadas neste experimento foram superiores aos encontrados por Mota (2013), trabalhando com melatonina no meio de maturação e aos de Marques et al., 2011 que avaliaram a maturação de oócitos após bloqueio da meiose com inibidores de Fator Promotor de Maturação (MPF), demonstrando que o uso do captopril, inibindo a ECA pode promover maturação oocitária adequada e necessária para um completo desenvolvimento embrionário.

Conclusões

A suplementação de captopril no meio MIV não altera a maturação nuclear de oócitos bovinos obtidos em abatedouro, sinalizando para um outro mecanismo de ação que não seja a inibição da ECA pelo captopril.

Referências

- Ancioto KL, Vantini R, Garcia JM, Mingoti GZ. Influência das células do *cumulus* e do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, supl., p.114, 2004.
- Barretto LSS Castro VSDC Garcia JM Mingoti GZ. Desenvolvimento embrionário a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* com IBMX e roscovitina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, supl., p.240-241, 2003.
- Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-containing follicles in the rat ovary during the estrous cycle and effects of ACE inhibitor on ovulation. *Endocrinology*, v.126, p.2927-2935, 1990.
- Feitosa LCS. Efeito de um inibidor da enzima conversora de angiotensina sobre esteróides sexuais, ang ii e ang-(1-7) em cabras sprd superovuladas e imunolocalização de ang ii, ang-(1-7) e eca ii em ovários de cabras. 2014. 75p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.
- Leibfried L, First NL. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol Reprod*, v.23, p.705-709, 1980.
- Marques MG, Mello MRB, Tavares LMT, Nicacio AC, Assumpção MEOD, Visintin JA. Maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores de MPF. *Braz. Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.248-250, out./dez. 2016. Disponível em www.cbra.org.br



Journal Veterinary Animal Science. São Paulo, v.48, p.468-477, 2011.

Mota LHCM. Efeito da melatonina sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

Nielsen AH, Schauser KH, Svenstrup B, Poulsen K. Angiotensin Converting Enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.81-85, 2002.

Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H, Gassler N. Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. *J Histochem Cytochem*, v.52, p.545-548, 2004.

Speth RC, Husain A. Distribution of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor binding sites in the rat ovary. *Biol Reprod*, v.38, p.695-702. 1988.

Takada L. Efeito da melatonina sobre a muturação dos oócitos em sistemas tradicionais de produção *in vitro* de embriões. 2008. 85f. Tese (Doutorado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.



Efeito do Inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) nos parâmetros cinéticos de espermatozoides criopreservados de touros Curraleiro Pé Duro

Inhibitor effect of plasminogen activator 1 (PAI-1) in the kinetic parameters of sperm cryopreserved of Curraleiro Pé-Duro bulls

Marlon de Araújo Castelo Branco^{1,*}, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco¹, Antonio de Sousa Junior², Felipe de Jesus Moraes Junior³, Filipe Nunes Barros¹, Isolda Márcia Rocha do Nascimento², Geraldo Magela Côrtes Carvalho⁴, José Adalmir Torres de Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil; ²Colégio Técnico Agrícola (CTT), Teresina, PI, Brasil;

³Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brasil; ⁴EMBRAPA Meio Norte, Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: Marlon70@gmail.com

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of different plasminogen activator inhibitor 1 concentrations (70 ng, 140 and 210 ng ng) in the kinetic parameters of sperm cryopreserved of Curraleiro Foot Hard bulls. Sperm kinetics were analyzed by means of a computer aided system (CASA). The variables evaluated were: (MT-%) (MOP-um / s), (VCL - um / s), (VSL - um / s), (VAP-um / s), (LIN -%) (Str-%) (ALH - uM) Wobble (WOB -%) and (BCF-Hz). The cryopreserved sperm in the presence of the inhibitor of plasminogen activator 1 in a concentration of 210 ng decreased velocity parameters in a straight line (VSL - um / s) and linearity (LIN -%). In conclusion, supplementation of the Inhibitor of plasminogen activator 1 (PAI-1), cryopreservation of bovine semen does not improve the kinetic parameters as compared to the control.

Keywords: bovine, PAI-1, sperm.

Palavras-chave: bovino, PAI-1, espermatozoide.

Introdução

O gado bovino Pé-Duro é uma raça nativa do norte e nordeste do Brasil proveniente dos rebanhos da Península Ibérica, que foram introduzidas no Brasil durante a colonização Portuguesa no século XVI (Salles et al., 2011). A criopreservação de sêmen é parcialmente prejudicial para os espermatozoides de mamíferos, pois induz ao choque térmico e osmótico, stress oxidativo e provoca modificações na composição lipídica da membrana plasmática, tornando-a mais reativa ao seu ambiente pós-descongelamento e provoca mudanças fisiológicas semelhantes à capacitação espermática em bovinos (Miah et al., 2011), o que é conhecido como criocapacitação (Reddy et al., 2010).

O Inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) pertence a família das enzimas serino proteases e possuem essa nomenclatura devido a presença do resíduo serina no sítio ativo da enzima, é a maior família de proteases, com base no conhecimento atual, envolvida no processo de fertilização dos gametas de mamíferos (Yanagimachi, 1994). Um papel tem sido proposto para a atividade das serino proteases na regulação da penetração do espermatozoide em oócitos de bovinos, mediada pela libertação do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) do oócito e ativação de plasminogênio em plasmina da protease da serina (Rekkas et al., 2002).

O objetivo deste experimento foi verificar o efeito do Inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) nos parâmetros cinéticos de espermatozoides criopreservados de touros Curraleiro Pé Duro.

Material e Métodos

Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé Duro, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Durante o experimento, os touros foram mantidos sob regime extensivo, com acesso a piquetes de capim-mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim milhã (*Digitaria sanguinalis*), água e sal mineral à vontade. As coletadas de sêmen foram feitas uma vez por semana, durante nove semanas, com o auxílio de um eletro estimulador controlado automaticamente (Biocon[®] Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Imediatamente após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37°C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume, turbilhonamento, motilidade total e vigor, em microscópio de contraste de fase. Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade total $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados nesse estudo. Quando aprovadas, amostras dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um *pool*, logo após a formação do *pool*, este foi dividido em quatro alíquotas e diluídas em meio Tris-Gema (37°C) contendo diferentes concentrações de Inibidor do ativador do plasminogênio 1 (70 ng, 140 ng e 210 ng), enquanto que uma alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,5mL (50×10^6 espermatozoides viáveis por palheta) e congelado em máquina TK 3000[®] na curva de congelamento rápida (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C) e, após atingir -120°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão criogênico. Após 30 dias de armazenamento as



amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à cinética espermática por meio de um sistema analisador de espermatozoide auxiliado por computador (CASA). As variáveis avaliadas foram: motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MOP- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), Wobble (WOB - %), frequência de batimento cruzado (BCF-Hz). O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro tratamentos: controle, PAI-1(70), PAI-1(140) e PAI-1(210) em nove coletas. Para comparação de média foi utilizado o teste paramétrico de Student-Newman-Keuls (SNK), na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

Resultados e Discussões

O inibidor do ativador do plaminogênio 1 (PAI-1) na concentração de 210 μg exerceu efeito negativo diminuindo os parâmetros de velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$) e linearidade (LIN - %) como mostrado na Tabela 1, os demais parâmetros permaneceram estatisticamente ($P > 0,05$) inalterados em relação ao controle quando os espermatozoides foram criopreservados nas diferentes concentrações de PAI-1.

Lamirande e Gagnon (1986) avaliaram o efeito de vários inibidores de serino proteases sobre a motilidade de espermatozoides de humano, rato e bovino. Eles usaram concentrações de 2000-2250 μM , mas não observou qualquer efeito inibitório sobre a motilidade dos espermatozoides. Em outros estudos, os espermatozoides de coelho permaneceram com a motilidade inalterada durante 8 horas quando estavam na presença de 200 μM do inibidor de serino protease tosil lisil clorometil cetona (TLCK) (Zaneveld et al., 1970), enquanto que a motilidade dos espermatozoides de hamster diminuiu após 15 minutos de incubação em concentrações a partir de 135 μM de TLCK (Miyamoto e Chang, 1973).

Tabela 1. Parâmetros pós-descongelamento da cinética dos espermatozoides de bovinos Curraleiro Pé-Duro criopreservados com inibidor do ativador do plasminogênio 1 – PAI.

Tratamentos	Parâmetros de cinética								
	MT	MP	VCL	VSL	VAP	LIN	SRT	ALH	BCF
Controle	53.7 \pm 10.7	34.8 \pm 16.2	87.5 \pm 10.1	51.1 \pm 14.8 ^a	62.1 \pm 13.2	57.7 \pm 9.4 ^a	81.2 \pm 6.4	3.1 \pm 0.3	10.5 \pm 0.6
PAI-1(70)	41.7 \pm 15.5	24.3 \pm 12.6	82.6 \pm 13.1	42.3 \pm 12.5 ^{ab}	54.9 \pm 13.6	50.5 \pm 8.0 ^{ab}	76.4 \pm 4.2	3.1 \pm 0.2	11.1 \pm 1.8
PAI-1(140)	50.3 \pm 8.2	26.8 \pm 8.4	78.9 \pm 14.5	38.8 \pm 9.3 ^{ab}	51.8 \pm 10.6	48.9 \pm 5.1 ^{ab}	74.5 \pm 3.3	3.1 \pm 0.3	11.3 \pm 0.6
PAI-1(210)	47.0 \pm 13.0	21.3 \pm 7.3	75.8 \pm 15.8	33.9 \pm 10.2 ^b	45.5 \pm 11.7	44.1 \pm 5.8 ^b	73.8 \pm 5.1	3.5 \pm 0.4	11.3 \pm 1.0

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

Valores de média com letras sobrescritas diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

Conclusões

A suplementação do Inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1, na criopreservação do sêmen bovino, reduziu os parâmetros cinéticos de velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$) e linearidade (LIN - %).

Referências

- Lamirande E, Gagnon C Effects of protease inhibitors and substrates on motility of mammalian spermatozoa. *The Journal of Cell Biology*, v.102, p.1378-1383, 1986.
- Miah AG, Salma U, Sinha PB, Hölker M, Tesfaye D, Cinar MU, Tsujii H, Schellander K. Intracellular signaling cascades induced by relaxin in the stimulation of capacitation and acrosome reaction in fresh and frozenthawed bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.125, p.30-41, 2011.
- Miyamoto H, Chang MC. Effects of protease inhibitors on the fertilizing capacity of hamster spermatozoa. *Biol Reprod*, v.9, p.533-7, 1973.
- Reddy NSS, Jagan MG, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.119, p.183-190, 2010.
- Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V. Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, v.57, p.1897-1905, 2002.
- Salles PA, Medeiros GR, Costa RG, Ramos CT, Coutinho B, Almeida JB, Rocha MJO, Rocha L, Mathias WL. Programa de conservação e melhoramento de uma raça bovina brasileira: Curraleiro Pé-Duro. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, v.18, p.453-456, 2011.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction*, 3.ed. New York: Raven Press Ltd; 1994: p.189-317.
- Zaneveld LJD, Robertson RT, Williams WL. Synthetic enzyme inhibitors as antifertility agents. *FEBS Letters*, v.11, p.345-7, 1970.



Efeito do pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbst) sobre complexos cumulus-oócitos (CCOs) de fêmeas bovinas

Effect of pre-treatment of somatotropin recombinant bovine (rbst) complex on cumulus-oocyte (COs) female bovine

Brenda Karine Lima do Amaral¹*, Ricardo de Macêdo Chaves⁶, Ana Lúcia Abreu Silva⁵, Naia de Britto e Alves³, Higor da Silva Ferreira², Hallef Mithchel Pereira Trovão¹, Sérgio Henrique Costa Júnior¹, Felipe de Jesus Moraes Júnior⁴

¹Graduando em Medicina Veterinária – CCA/UEMA; ²Mestrando em Ciência Animal – CCA/UEMA; ³Mestre em Ciência Animal – CCA/UEMA; ⁴Bolsista de Pós-Doutorado- Mestrado em Ciência Animal – CAPES/UEMA; ⁵Professora do Departamento de Patologia – CCA/UEMA; ⁶Professor Adjunto III-Departamento das Clínicas- CCA/UEMA, São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: brendakarinelima@gmail.com

Abstract

Objective to evaluate the effect of pre-treatment of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cumulus-oocyte complexes (CCOs) recovered from OPU. Using 12 females bovine race Girolando, which they were divided into three experimental groups: control 0mg, 250mg and 500mg rbST, applied at 12 day intervals. Then, were made five sessions of Ovum Pick Up (OPU) with the aid of ultrasound, with intervals of 7 days. The variables studied were submitted to normality test; normal data and standardized by mathematical transformations, were subjected to analysis of variance (ANOVA) or parametric test Student-Newman-Keulsto compare means. Obtained mean and standard deviation of the total pattern CCOs and CCOs viable according to the following treatments. So, the pre-treatment rbST not influence both in the proportion of CCOs viable and the morphological quality of CCOs of bovine female.

Keywords: bovine, ovum pick-Up, somatotropin.

Palavras-chave: bovinos, punção folicular, somatotropina

Introdução

A eficiência da associação das técnicas de punção folicular e produção in vitro de embriões dependem do estabelecimento de protocolos que garantam a recuperação de complexos cumulus-oócitos (CCOs) com maior potencial de desenvolvimento possível. O controle hormonal da função ovariana pode ser um valioso recurso para aumentar o número de embriões produzidos in vitro (Sá et al., 2004). Portanto, ferramentas auxiliares como a adição de somatotropina recombinante bovina (rbST) aos protocolos hormonais que precedem a técnica de aspiração folicular sugerem afetar a função reprodutiva do animal aumentando a síntese e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-I). Além disso, foi demonstrado um aumento da população folicular tendo efeito positivo na formação dos CCOs e na esteroidogênese (Pivato, 2006). Tendo em vista que as biotecnologias OPU-PIV são de extrema importância para aumentar a velocidade de ganho genético do rebanho com crescimento quantitativo da produção, o presente estudo visar aumentar os índices desta biotecnologia com incremento da rbST. Para tanto, este experimento teve como objetivo geral avaliar o efeito do pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre os de complexos cumulus-oócito (CCOs) recuperados.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Utilizando 12 fêmeas bovinas da raça Girolandas leiteiras criadas no núcleo de ruminantes da Escola de Veterinária da UEMA, sendo divididas em três grupos experimentais: controle 0mg (n = 4), 250mg (n = 4) e 500mg (n = 4) de rbST, as aplicações foram com intervalos de 12 dias. Foram realizadas cinco seções de *Ovum Pick Up* (OPU) com intervalos de 7 dias nos grupos experimentais como mostra na Figura 1. A OPU foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pieterse et al. (1988) e adaptada por Seneda et al. (2003) com o uso da ultrassonografia (ALOKA SSD 500V, Aloka Co., Japão), com transdutor convexo de 5,0 MHz acoplado a uma guia de aspiração transvaginal. As aspirações foram realizadas com agulhas descartáveis 20 G, acoplada a uma tubulação de silicone com 2 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento, que por sua vez foi conectada a um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio LAV (1 mL de PBS, 12,5 UI de heparina e 1% de soro fetal bovino). A pressão da bomba a vácuo (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada BV-003) foi mantida de 35 a 50 mmHg (fluxo de 15 mL de meio/min.). A guia de aspiração foi introduzida na vagina, posicionada no fundo de saco vaginal, junto à fôrnix cervical e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram posicionados na linha de punção indicada na tela do aparelho de ultrasonografia, com os folículos acima de 2 mm sendo puncionados e aspirados. Posteriormente, foi realizada a lavagem e seleção do conteúdo aspirado, onde os CCOs selecionados foram classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV. Os dados para as variáveis estudadas foram submetidas ao teste de normalidade; os dados normais e os

normalizados mediante transformações matemáticas (logarítmica, arco seno) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ou ao teste paramétrico de SNK (Student-Newman-Keuls) para comparação de médias, na probabilidade de 5%.

Figura 1. Protocolo de aplicação do rbST e as seções de OPU's dos grupos experimentais.



Resultados e Discussão

Das cinco sessões de OPU, obteve-se média e desvio padrão total dos CCOs ($9,85 \pm 6,83$; $7,75 \pm 3,09$ e $8,50 \pm 6,34$) e CCOs viáveis ($8,10 \pm 5,26$; $5,60 \pm 2,66$ e $5,27 \pm 5,96$) de acordo com os tratamentos: controle, 250 mg rbST e 500 mg rbST, respectivamente. Onde observa-se que a proporção de complexos *cumulus*-oócito viáveis no grupo controle teve uma resposta significativa ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos experimentais, como é demonstrado na Tabela 1. O presente estudo corrobora com os experimentos de Borges et al (2001), que em seus estudos utilizou 13 fêmeas bovinas mestiças holandês-zebu, onde foram divididas em dois grupos experimentais: controle e 500mg de rbST, obtendo-se média e desvio padrão de CCOs viáveis $11,5 \pm 10,00$ para o grupo controle e $8,5 \pm 8,3$ para o grupo de 500mg de rbST. O efeito do pré-tratamento com somatotropina recombinante bovina sobre a qualidade morfológica dos CCOs entre os tratamentos, são apresentados na tabela 1. Foram classificados como oócitos viáveis aqueles que apresentavam Grau I (GI), Grau II (GII) e Grau III (GIII). No presente estudo foi observado que os graus I e II tiveram resultados expressivos ($P < 0,05$) no tratamento controle comparados aos demais e o grau III apresentou-se significativo no tratamento de 500mg rbST. Não houve diferença significativa entre o Grau IV ($1,15 \pm 1,30$; $1,30 \pm 1,21$ e $0,94 \pm 1,10$) e os atrésicos e/ou degenerados ($0,60 \pm 0,82$; $0,85 \pm 1,13$ e $0,38 \pm 0,84$) para os tratamentos controle, 250mg rbST e 500mg rbST, respectivamente. De acordo com Moraes Jr et al. (2011), utilizando 14 fêmeas bovinas e dividindo-as em três grupos: controle, 250mg rbST e 500mg rbST, relataram que os grupos 250mg rbST e 500mg rbST tiveram maior número médio de CCOs de Grau III em relação ao grupo controle ($5,3 \pm 0,7$ e $4,8 \pm 0,6$ vs. $4,0 \pm 0,7$) e Grau IV ($6,0 \pm 1,0$ e $4,8 \pm 0,9$ vs. $2,9 \pm 0,6$) mostrando-se superior ao presente estudo.

Tabela 1. Número de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) totais, viáveis e por qualidade morfológica (média \pm d.p.) recuperados de fêmeas bovinas submetidas ou não previamente ao tratamento com rbST, seguido de cinco seções de aspiração folicular *in vivo*.

CCOs	Tratamento		
	Controle	250 mg rbST	500 mg rbST
Totais	$9,85 \pm 6,83^A$	$7,75 \pm 3,09^{AB}$	$8,50 \pm 6,34^B$
Viáveis	$8,10 \pm 5,26^A$	$5,60 \pm 2,66^{AB}$	$5,27 \pm 5,96^B$
GI	$3,50 \pm 2,21^A$	$2,10 \pm 1,07^{AB}$	$1,72 \pm 1,80^B$
GII	$3,45 \pm 4,41^A$	$1,80 \pm 1,50^A$	$1,55 \pm 2,28^A$
GIII	$1,15 \pm 1,26^A$	$1,70 \pm 2,00^A$	$2,05 \pm 3,18^A$
GIV	$1,15 \pm 1,30^A$	$1,30 \pm 1,21^A$	$0,94 \pm 1,10^A$
AT/DEG	$0,60 \pm 0,82^A$	$0,85 \pm 1,13^A$	$0,38 \pm 0,84^A$

Números seguidos de letras maiúsculas desiguais na linha diferem pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

Teste de normalidade utilizado Cramer-von Mises, foi realizado ANOVA e o teste utilizado para comparação de média foi SNK (Student-Newman-Keuls).

GI- Grau I; GII- Grau II, GIII- Grau III; GIV- Grau IV; AT/DEG- Atrésicos e/ou Degenerados.

Conclusão

O pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbST) não influenciou na proporção de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) viáveis e bem como na qualidade morfológica dos CCOs de fêmeas bovinas.

Referências

Borges AM, Torres CAA, Ruas JRM, Rocha Júnior VR, Carvalho GR. Resposta superovulatória de novilhas mestiças holandês-zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rbST). Rev Bras Zootec, v.30, p.1439-1444, 2001.

Moraes Júnior FJ, Schotz LF, Feltrin C, Martins LT, Neto SG, Salviano MB, Tavares KCS, Almeida JL,



Rodrigues VHV, Machado Júnior J, Fernades CCL, Santos BMS, Calderón CEM, Aguiar LH, Castro EV, Barbosa FJM, Bertolli LR, Sousa JAT, Bertolli M. Efeito cumulativo da somatotropina recombinante bovina (rbST) na produção *in vitro* de embriões de fêmeas guzolando lactantes. In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE, 2011, Cumbuco-CE, 2011.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v.30, p.751-762, 1988.

Pivato I. Aspiração Folicular em Bovinos - Efeito do BST. Workshop de Reprodução Animal - Palestras e Resumos/Embrapa Clima Temperado. Documentos 181, v.2, Dez., p.61-77, 2006.

Sá WF, Ramos AA, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA. Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir submetidas à estimulação hormonal. *Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa*, p.07, 2004.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB. Efficacy of linear and convextransducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v.59, p.1435-1440, 2003.



Eficiência da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à detecção de estro por marcação da cauda e presença de muco vaginal no dia da inseminação em vacas Nelore

Efficiency of artificial insemination in fixed time (FTAI) associated with estrus detection by marking the tail and the presence of vaginal mucus on the day of insemination in Nelore cows

Ícaro Oliveira Torres de Souza^{1,*}, Luiz Harlton Cavalcante Monteiro Mota¹, Cícero Soares dos Santos¹, Sávio Ruan Sampaio de Sousa¹, Filipe Nunes Barros¹, Felipe de Jesus Moraes Júnior², José Adalmir Torres de Souza¹, Amilton Paulo Raposo Costa¹

¹Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, Brasil; ²Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

*E-mail: icaro_torres@hotmail.com

Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficiency of artificial insemination in fixed time associated with estrus detection in Nelore cows. They used 917 females, all submitted to estrus synchronization protocol and formed two groups: G1 (n = 489), marked on the back with fluorescent dye and then checked if the croup was blurred or not, and had vaginal mucus or not and G2 (n = 428) were formed by females inseminated only synchronized. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound 30 days after insemination. In G1 and G2, pregnancy rates were, respectively, 46.01% and 41.12%. In G1, blurred females (52.19%), not blurred (21.78%), presence of mucus (62.57%) and no mucus (35.97%). Pregnancy rates did not differ between the groups G1 and G2. In G1, blurred females or mucus had higher rates. It is concluded that the detection of estrus, insemination favored the pregnancy rate.

Palavras-chaves: bovinos, sincronização do estro, inseminação artificial.

Keywords: cattle, synchronization of estrus, artificial insemination.

Introdução

A atual situação econômica da pecuária mundial exige alta produtividade como garantia de retorno do capital investido, a médio e curto prazo. Tendo em vista que a reprodução animal é um dos alicerces da cadeia produtiva, sua eficiência deve ser detalhadamente monitorada visando maximizar o desfrute garantindo alta rotatividade financeira numa propriedade rural (Baruselli et al., 2004).

Seguindo a evolução das principais biotecnologias adotadas e trabalhadas no Brasil, encontra-se em expansão a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), técnica que teve origem em função da dificuldade em se detectar o estro e conseqüentemente o momento ideal para realizar-se a inseminação artificial (Mapletoft; Bó e Adams, 2008).

Assim, os protocolos hormonais de indução e sincronização do estro servem como ferramenta para aumentar os índices reprodutivos. Dentre as principais vantagens destaca-se a possibilidade de viabilizar a inseminação artificial de vacas em lactação, reduzir o intervalo parto/concepção, concentrar os partos, antecipar a prenhez na temporada de monta, padronizar os lotes de bezerros e aumentar a eficiência no índice de desmame, refletindo diretamente na racionalização da mão-de-obra e no custo/benefício da atividade (Gonçalves et al., 2004).

Assim, objetivou-se com a presente pesquisa avaliar a eficiência da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à detecção do estro, previamente à inseminação, em vacas Nelore.

Material e Métodos

O projeto foi realizado na Fazenda Abelha, Município de Codó, Região Norte do Estado do Maranhão. Para tanto, foram selecionadas 917 vacas da raça Nelore, multíparas, com no mínimo 45 dias de pós-parto, com escore corporal 3,0 a 3,5 (escala de 1 a 5) e com condição reprodutiva favorável, estabelecida por avaliação clínico-ginecológica. Esse projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí sob o N° 086/14.

Os estros, em todas as fêmeas, foram sincronizados utilizando protocolo clássico para IATF: D0- aplicação de dispositivo intravaginal de progesterona e aplicação IM de 2mL de benzoato de estradiol; D9- retirada do dispositivo com progesterona e aplicação IM de 2,5mL de PGF_{2α}, 0,3mL de cipionato de estradiol e 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina; e no D11- inseminação, 48 a 54 horas após a retirada do dispositivo.

Foram formados dois grupos experimentais: G1 (n = 489), formado por fêmeas que, além do protocolo clássico de sincronização, foram marcadas na garupa com tinta fluorescente no D9 e, no D11, previamente à inseminação, foram avaliadas se a garupa estava borrada ou não e se apresentava muco vaginal ou não. O G2 (n = 428), formado por fêmeas que foram apenas sincronizadas e inseminadas. O diagnóstico de gestação foi feito 30-35 dias após a inseminação.

Os dados referentes à taxa de prenhez, foram avaliados pelo teste χ^2 (Qui-quadrado) ao nível de 1% de significância pelo Programa Bio Estat 4.0 (Bio Estat, 2007).



Resultados e Discussão

As taxas de gestação nos grupos G1 e G2, foram, respectivamente, de 46,01% e 41,12%, não apresentando diferença estatística entre os mesmos.

De modo geral, as taxas de gestação obtidas no presente trabalho estão próximas às observadas em diferentes pesquisas em vacas Nelore. Segundo Baruselli (2009), independente dos tratamentos utilizados como protocolo de sincronização de estros e inseminação artificial em tempo fixo, a taxa de concepção média nacional, oscila entre 45 e 55%.

Na Tabela 1 são apresentadas as taxas de gestação do G1, para fêmeas borradas (52,19%) ou não borradas (21,78%), apresentando diferenças significativas entre os dois subgrupos de fêmeas.

Em um estudo para avaliar o momento de ocorrência do cio ao longo do dia, verificou-se que 53,8% dos cios começam durante a noite e terminam durante o dia, e que 30,7% começam e terminam durante a noite (Barros et al., 1998), indicando que, efetivamente a detecção do estro é fator limitante para uso de técnicas que dependem desse registro.

Tabela 1. Taxas de gestação (%) em vacas Nelore do G1, submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à detecção de estro através de marcação da garupa.

Etapas	Borradas		Não Borrada	
	n	%	n	%
E1	116/140 (79,29)	53,45 ^a (62/116)	24/140 (17,14)	25,00 ^b (06/24)
E2	168/204 (82,35)	50,60 ^a (85/168)	36/204 (17,65)	16,67 ^b (06/36)
E3	105/146 (71,92)	53,33 ^a (56/105)	41/146 (28,08)	24,39 ^b (10/41)
Total	389/490 (79,39)	52,19 ^a (203/389)	101/490 (20,61)	21,78 ^b (22/101)

Letras minúscula diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), ao nível de 1% de probabilidade.

Comparando os resultados, vê-se que o percentual de fêmeas borradas, de 79,39% (389/490), foi inferior aos 94,00% obtido pelo uso do *ESTROTEC* (Jimenez et al., 2009) e similar aos 75% obtidos no estudo com TAIL PENT (Horn, Galina e Moraes, 2011). Referente à taxa de gestação de 52,19% (203/389) obtida nas fêmeas borradas, foi similar aos 56,80% obtidos com a utilização da técnica *HEAT-WATCH* e aos 51,40% quando utilizaram a observação visual (Borges; Greene; Roons, 1996). XU et al. (1998), também utilizando a técnica *TAIL PAINT*, obtiveram taxa de 65%, esta, também similar à observada no presente trabalho.

Ressalta-se ainda que, a despeito de 20,61% (101/490) não terem sido borradas, vindo sinalizar a não ocorrência de estros, e terem apresentadas índice de gestação de 21,78 (22/101), este dado coloca em dúvida a eficiência desse manejo na detecção do estro, previamente às inseminações.

A Tabela 2 mostra fêmeas do G1 que apresentaram ou não muco vaginal à inseminação e que tiveram índices gestacionais de 62,57% e 35,97%, respectivamente, com diferença significativa entre ambos.

Nesse estudo, 38,16% (187/490) apresentaram muco e destas, 62,57% (117/187) ficaram prenhas, enquanto 61,84% (303/490) não apresentaram muco, mas tiveram taxa de gestação de 35,97% (109/303). Para esse fato, constatou-se que muitas fêmeas não eliminaram muco quando da manipulação do útero à inseminação, não implicando que, necessariamente, não estejam em cio.

Tabela 2. Taxas de gestação (%) em vacas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à detecção de estro através da presença de muco vaginal.

Etapas	Com Muco		Sem Muco	
	n	%	n	%
E1	57/140 (40,71)	63,16 ^a (36/57)	83/140 (59,29)	38,55 ^b (32/83)
E2	81/204 (39,71)	56,79 ^a (46/81)	123/204 (60,29)	37,40 ^b (46/123)
E3	49/146 (33,56)	71,43 ^a (35/49)	97/146 (66,44)	31,96 ^b (31/97)
Total	187/490 (38,16)	62,57 ^a (117/187)	303/490 (61,84)	35,97 ^b (109/303)

Letras minúscula diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), ao nível de 1% de probabilidade.



Conclusão

As taxas de prenhez não diferiram estatisticamente entre os grupos G1 e G2. Já, no G1, o percentual de fêmeas borradas ou com muco, diferiram estatisticamente das não borradas ou sem muco.

Referências

- Barros CM, Moreira MBP, Fernandes P.** Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas inseminação artificial ou de transferência de embriões. *Arquivo Faculdade Veterinária, Supl.* 26, p.179-89, 1998.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA.** The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.479-486, 2004.
- Borger ML, Greene WA, Grooms DL.** Electronic pressure sensing system as an alternative to visual observation in beef cows with or without Syncro-mate B treatment. *J of Dairy Sci*, v.74, suppl. 1, p.244, 1996.
- Galina CS, Orihuela A, Budio I.** Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. *Anim Rep Sci*, v.42, p.465-470, 1996.
- Gonçalves PBD.** Anestro pós parto em vacas de corte. In: *Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 1., 2004, Londrina. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p.105-116.
- Horn MM, Galina CS, Moraes JCF.** Padrões de distribuição e métodos de identificação deaios em vacas de corte submetidas a sincronização com progestagênio/prostaglandina e monta natural. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.96, p.145-148, 2011.
- Jimenez F.** Evaluation of Four Methods for Heat Detection in Dual Purpose Heifers. *Revista Científica (Maracaibo)*, v.19, p.366-370, 2009.
- Mapletofy RJ, Bó GA, Adams GP.** Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. In: *III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 2008, Londrina. *Anais...* Londrina: 2008. p.15-25.
- Pinheiro OL, Barros CM, Figueredo RA, do Valle ER, Encarnação RO, Padovani CR.** Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-81, 1998.
- Xu ZZ, McKnight DJ, Vishwanath R, Pitt CJ, Burton LJ.** Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. *J Dairy Science, Champaign*, v.81, p.2890-2896, 1998.



Eficiência da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à determinação do diâmetro folicular e concentração de progesterona no dia da inseminação em vacas Nelore

Efficiency of artificial insemination in fixed time (FTAI) associated with determination of follicular diameter and progesterone concentration on the day of insemination in Nelore cows

Ícaro Oliveira Torres de Souza^{1,*}, Luiz Harliton Cavalcante Monteiro Mota¹, Cícero Soares dos Santos¹, Sávio Ruan Sampaio de Sousa¹, Filipe Nunes Barros¹, Felipe de Jesus Moraes Júnior², José Adalmir Torres de Souza¹, Amilton Paulo Raposo Costa¹

¹Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, Brasil; ²Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: icaro_torres@hotmail.com

Abstract

The objective of this study was to evaluate the association of IATF with FD on the reproductive efficiency of Nelore cows. It was used 917 females submitted to estrus synchronization protocol, with P4 device placed and applied 2mL BE in D0; In D9 removed the device, applied 2.5mL of PG, 0.3mL of CE and 300uL of eCG. The inseminations made on D11, 48-54 hours after withdrawal from the device. Blood collections were made on D0 and D11. G1 (n = 489) were formed, with synchronized females and, prior to insemination, measured FD, classified as large, medium or small; The G2 (n = 428), by females only synchronized and inseminated. Gestation rates in G1 and G2 were 46.01% and 41.12%, and did not differ between groups. In the G1, females with large and medium follicles rates did not differ, since females with small follicles had lower rates. P4 in the D0 indicated 47.19% of females in the follicular phase and 46.67% in the progesterone phase; In D11, the means of P4, considered low, medium or high, had rates of 82.14, 57.14 and 8.57%, respectively. It is concluded that females with small follicles or with P4 raised to insemination have low pregnancy rates.

Palavras-chaves: sincronização do estro, diâmetro folicular, inseminação artificial.

Keywords: synchronization of estrus, follicular dynamic, artificial insemination.

Introdução

Tendo em vista que a reprodução animal é um dos alicerces da cadeia produtiva, sua eficiência deve ser detalhadamente monitorada visando maximizar o desfrute garantindo alta rotatividade financeira numa propriedade rural (Baruselli et al., 2004).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF), técnica que teve origem em função da dificuldade em se detectar o estro e consequentemente o momento ideal para realizar-se a IA (Mapletoft; Bó e Adams, 2008), encontra-se em grande expansão no Brasil.

Os protocolos hormonais de indução e sincronização do estro servem como ferramenta para aumentar os índices reprodutivos. Dentre as principais vantagens destaca-se a possibilidade de viabilizar a inseminação artificial de vacas em lactação, reduzir o intervalo parto/concepção, concentrar os partos, antecipar a prenhez na temporada de monta, padronizar os lotes de bezerras e aumentar a eficiência no índice de desmame, refletindo diretamente na racionalização da mão-de-obra e no custo/benefício da atividade (Gonçalves et al., 2004).

Assim, objetivou-se com a presente pesquisa avaliar a eficiência da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada à determinação do diâmetro folicular e concentração de progesterona no dia da inseminação em vacas Nelore.

Material e Métodos

O projeto foi realizado na Fazenda Abelha, Município de Codó, Região Norte do Estado do Maranhão. Para tanto, foram selecionadas 917 vacas da raça Nelore, multíparas, com no mínimo 45 dias de pós-parto, com escore corporal 3,0 a 3,5 e com condição reprodutiva favorável, estabelecida por avaliação clínico-ginecológica. Esse projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí sob o N° 086/14.

Os estros, em todas as fêmeas, foram sincronizados utilizando protocolo clássico para IATF: D0-aplicação de dispositivo intravaginal de progesterona P4 e aplicação IM de 2,5mL de PGF, 0,3mL de cipionato de estradiol e 300UI de eCG; e no D11- inseminação, 48 a 54 horas após a retirada do dispositivo. Coletas de sangue foram realizadas no D0 e D11.

Foram formados dois grupos experimentais: G1 (n=489), formado por fêmeas que, além do protocolo clássico de sincronização, no D11, previamente à inseminação, foram avaliadas a mensuração por ultrassonografia do maior folículo ovariano, este qualificado como grande ($G \geq 10\text{mm}$), médio ($M = 6-10\text{mm}$) e pequeno ($P \leq 6\text{mm}$). O G2 (n=428), formado por fêmeas que foram apenas sincronizadas e inseminadas. O diagnóstico de gestação foi feito 30-35 dias após a inseminação.



Os dados referentes à taxa de prenhez, foram avaliados pelo teste χ^2 (Qui-quadrado) ao nível de 1 % de significância pelo Programa Bio Estat 4.0 (Bio Estat, 2007). As concentrações séricas de progesterona foram avaliadas quanto às Médias \pm DP.

Resultados e Discussão

As taxas de gestação nos grupos G1 e G2 foram, segundo Tabela 1, respectivamente, de 46,01% e 41,12%, não apresentando diferença estatística entre os mesmos.

Tabela 1. Taxas de gestação (%), em vacas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associada (G1) ou não (G2) à detecção de estro através de marcação da garupa, presença de muco vaginal e diâmetro do maior folículo ovariano.

Etapas	G1		G2		Prenhez	
	n	%	n	%	n	%
E1	68/140	48,57 ^a	33/74	44,59 ^a	101/214	47,20
E2	91/203	44,83 ^a	80/220	36,36 ^b	171/423	40,43
E3	66/146	45,20 ^a	63/134	47,01 ^a	129/280	46,07
Total	225/489	46,01 ^a	176/428	41,12 ^a	401/917	43,73

Letras minúscula diferentes na mesma linha difere entre si pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), ao nível de 5% de probabilidade.

De modo geral, as taxas de gestação obtidas no presente trabalho estão próximas às observadas em diferentes pesquisas em vacas Nelore. Segundo Baruselli (2009), independente dos tratamentos utilizados como protocolo de sincronização de estros e inseminação artificial em tempo fixo, a taxa de concepção média nacional, oscila entre 45 e 55%.

Na Tabela 2 são apresentaram os índices gestacionais de fêmeas do G1 que apresentavam à inseminação, folículo grande, médio ou pequeno, e que apresentaram, respectivamente, taxas de 51,85, 46,93 e 2,44%, não diferiram estatisticamente entre as fêmeas de folículos grandes e médios, porém diferiram significativamente entre estes e o grupo de fêmeas com folículos pequenos. Com o uso frequente da ultrassonografia na reprodução animal, particularmente na dinâmica folicular ovariana, tem sido possível o monitoramento do crescimento do folículo que se apresenta como dominante (FD) e então estabelecer associações entre o momento mais eficiente para a inseminação artificial.

Tabela 2. Taxas de gestação em vacas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), em três etapas (E1, E2 e E3) associadas ao desenvolvimento do maior folículo ovariano (Grupo Desafio).

Etapas	Grandes		Médios		Pequenos	
	n	%	n	%	n	%
E1	82/140	57,32 ^a	48/140	58,33 ^a	10/140	0 ^b
	-	(47/82)	-	(28/48)	-	(0/10)
E2	89/204	50,56 ^a	101/204	42,57 ^a	14/204	7,14 ^b
	-	(45/89)	-	(43/101)	-	(1/14)
E3	99/146	48,48 ^a	30/146	43,33 ^a	17/146	0 ^b
	-	(48/99)	-	(13/30)	-	(0/17)
Total	270/490	51,85 ^a	179/490	46,93 ^a	41/490	2,44 ^b
	-	(140/270)	-	(84/179)	-	1/41

Letras minúscula na mesma coluna não difere entre si pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

A Tabela 3 apresenta as concentrações séricas de progesterona (ng/ml) e taxas de gestação (%) em vacas Nelore no dia do implante (D0) e das inseminações (D11) do grupo G1. As concentrações de progesterona no D0, com média de 0,910 ng/ml, são de origem endógena e permitiram constatar que 62,50% das fêmeas apresentaram concentração >1,00 ng/ml (1,414) e 37,5% concentração <1,00 ng/ml (0,405), indicando ciclicidade às fêmeas em estudo, particularmente àquela na fase luteal, o que é esperado tendo em vista que a fase de diestro é a mais prolongado do ciclo estral. No D11, dia das inseminações, as concentrações de progesterona foram em média de 0,811 ng/ml.



Tabela 3. Concentração sérica de progesterona (ng/ml) e taxas de gestação (%) em vacas Nelore no dia do implante (D0) e das inseminações (D11), na Etapa 1 do Grupo Manejado.

Dia	P4 < 0,5		P4 0,5 – 1,0		P4 > 1,0	
	n	%	n	%	n	%
D0	19/72	57,89 ^a	8/72	37,50 ^a	45/72	46,67 ^a
	(0,31±0,15ng/ml)	(11/19)	(0,61±0,06ng/ml)	(3/8)	(1,41±0,35ng/ml)	(21/45)
D11	28/133	82,14 ^a	70/133	57,14 ^a	35/133	8,57 ^b
	(0,23±0,10ng/ml)	23/28	(0,72±0,15ng/ml)	40/70	(1,39±0,33ng/ml)	3/35

Conclusão

Conclui-se que as fêmeas com folículos identificados com pequenos à inseminação ou com concentrações elevadas de progesterona apresentam baixas taxas de gestação, podendo não serem inseminadas, minimizando os custos com sêmen e mão de obra.

Referências

- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA.** The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82- 83, p.479-486, 2004.
- Gonçalves PBD.** Anestro pós parto em vacas de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1., 2004, Londrina, PR, Brasil. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p.105-116.
- Mapletofy RJ, Bó GA, Adams GP.** Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. In III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2008, Londrina. *Anais...* Londrina: 2008. p.15-25.



Eficiência reprodutiva de vacas Nelore submetidas à IATF com protocolos DIB[®] e Crestar[®] e suas variações

Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to FTAI with DIB[®] and Crestar[®] protocols and their variations

Walterlana Julia Sousa Sampaio^{1,*}, Juliana da Silva Alves¹, Hallef Mithchel Pereira Trovão¹, Luciana Veloso Melo¹, Celiz de Sousa Pedrosa¹, Matheus Moreira Ribeiro¹, Ricardo de Macedo Chaves², Felipe de Jesus Moraes Júnior³

¹Graduandos em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão; ²Departamento das Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual do Maranhão, ³Departamento do Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

*E-mail: w.sampaio@outlook.com

Abstract

The economic efficacy of beef cattle is linked to the production of calves, which are destined to the meat production or replacement of the herd. Therefore the reproductive efficiency of the bovine females is shown to be of great importance, mainly in relation to occurrence of the gestations at certain moments during the reproductive season. Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) is a biotechnology that optimizes the reproductive management and guarantees satisfactory results. In this context, this research aimed to evaluate ovulation synchronization protocols (Crestar[®], DIB[®] and variations) used in breeding season, verifying the reproductive efficiency of Nelore cows submitted to FTAI. The results obtained from the FTAI program are within the predicted average, in which cows submitted to the DIB + BE protocol, used in the latter group, showed the best result, with a mean of 55.8% conception rate, being considered the most satisfactory within the four protocols used.

Keywords: reproductive efficiency, biotechnology, farm creates.

Palavras-chave: eficiência reprodutiva, biotecnologia, fazenda de cria.

Introdução

Durante os últimos anos, novas tecnologias aplicadas à reprodução animal, dentre elas, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), têm contribuindo de maneira importante para o melhoramento genético. No entanto, ainda existem muitas dificuldades para o amplo uso desta biotecnologia, por exemplo, a detecção do estro associada à sua incidência noturna, tempo de manejo, uso de mão de obra treinada e taxa de ciclicidade do rebanho, prejudicando assim a implantação de programas convencionais de IA. Devido a essas limitações, tornou-se de grande interesse econômico nos últimos anos, o desenvolvimento de tratamentos, com emprego de alguns fármacos, que tem por objetivo a indução e sincronização do estro e da ovulação. Assim, inúmeros protocolos hormonais vêm sendo desenvolvidos para realização da inseminação em tempo pré-determinado com taxas de concepção aceitáveis (Sá Filho et al., 2008). Existem várias moléculas de estrógenos disponíveis no mercado para utilização em protocolos de sincronização de cio. Os principais são: 17 β estradiol, benzoato de estradiol (BE), valerato de estradiol (VE) e o cipionato de estradiol (CE). Cada um deles tem um metabolismo diferente, alterando sua meia vida. Normalmente os estrógenos estão sempre associados aos progestágenos nos protocolos de sincronização do estro (Santin, 2010). Diante destas considerações, esta pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes protocolos de sincronização de ovulação (Crestar[®], DIB[®] e suas variações) utilizados em estação de monta, verificando a eficiência reprodutiva de vacas Nelore submetidas à IATF.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na fazenda Sagrisa localizada no município de Codó (MA), mesorregião central maranhense. Foram utilizadas durante o experimento 2.377 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*), com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 a 4 (escala de 1 a 5), com período pós parto de 45 a 60 dias, distribuídas em quatro tratamentos. No Dia D0 do protocolo experimental alguns animais receberam dispositivos auricular (Crestar[®], 3 mg de Norgestomet) e intravaginal (DIB[®], 1 mg de P4) associado a 2 mg valerato de estradiol (VE) ou 2 mg de Benzoato de estradiol (BE), aplicados por via intra-muscular. Para os animais que receberam DIB[®] e Crestar[®] associado com BE, a retirada dos dispositivos foi realizada no D8, juntamente com a aplicação de 0,75 mg de D cloprostenol (prostaglandina), 1 mg de cipionato de estradiol (CE) e 300 UI de eCG, enquanto os animais que receberam os mesmos dispositivos citados com associação de VE, a retirada foi realizada no D9 com aplicação de somente 300 UI de eCG. Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo nos dias D10 e D11, respectivamente, num intervalo máximo de 4 horas (48 a 52 horas após a retirada dos dispositivos). As partidas de sêmen dos touros utilizadas em experimento foram previamente analisadas e estavam de acordo com os critérios recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia (CHISON D600VET, USProducts do Brasil, transdutor linear transretal de 5,0 MHz) aos 30 dias após a IATF. Para análise estatística da variável taxa de concepção foi



adotada a distribuição binomial de Poisson (gestantes e não-gestantes; GUIDED DATA ANALYSIS do SAS®; SAS, 2001).

Resultados e Discussão

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, pôde-se observar influência da categoria animal sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas de corte, conforme relatado por diversos trabalhos de pesquisa (Whisnant et al., 1986; Brauner et al., 2008). De acordo com os dados da tabela 1, a taxa de concepção das vacas Nelore submetidas a diferentes protocolos de sincronização de ovulação (DIB vs. Crestar vs. DIB +VE vs. Crestar + BE) para IATF, foram variantes. Durante todo o período de estação de monta (90 dias), as 552 primíparas com o protocolo CRESTAR+VE, 278 (49%) ficaram gestantes, assim como as 1.038 nulíparas com o protocolo CRESTAR+BE, 502 (48%), as multíparas, das 787 vacas, com o protocolo DIB+VE, 113 (50,5%) e com DIB+BE, 315 (55,8%) também ficaram gestantes, concluindo que a categoria animal afetou a taxa de gestação. A taxa de concepção das multíparas foi superior a das primíparas e das nulíparas. A taxa de concepção em primíparas foi inferior às multíparas provavelmente ao fato desta categoria animal ser mais exigente em relação ao manejo, já que necessitam de maior atenção quanto aos requerimentos nutricionais, pois precisam de maior ingestão de energia para atender as necessidades de crescimento, lactação e reprodução (Spitzer et al., 1995). Outro fator importante é a variação do escore corporal, durante a estação de monta que influencia a retomada da atividade cíclica ovariana e a taxa de concepção (Swayer et al., 1991). Com isso, melhores condições nutricionais resultam em altas taxas de prenhez em vacas primíparas (Lobato, 1998; Lobato et al., 2000). Em relação aos protocolos utilizados, o da categoria de multíparas, protocolo DIB+BE foi o de melhor resultado, com 55,8% de taxa de concepção, sendo considerado o mais satisfatório dentro dos quatro protocolos utilizados.

Tabela 1. Taxa de concepção em vacas Nelore (*Bos indicus*) com diferentes categorias, protocolos de sincronização de ovulação para IATF e total de animais prenhes, Codó – MA.

Categoria	Protocolos	Prenhes	Total	% concepção
Primíparas	CRESTAR + VE	278	552	50,4
Nulíparas	CRESTAR + BE	502	1038	48,4
Multíparas	DIB + VE	113	223	50,5
	DIB + BE	315	564	55,8

Consideração final

Os resultados da IATF na Fazenda Sagrisa estão dentro da média prevista, mas pode ser melhorada por questões de manejo. Pois a taxa de concepção foi afetada pela categoria animal, o que pode indicar que as primíparas precisam de uma maior atenção em relação as suas exigências nutricionais, para que sua fertilidade não seja comprometida. O protocolo DIB+BE, utilizado na última categoria foi o de melhor resultado, com 55,8% de taxa de concepção, sendo considerado o mais satisfatório dentro dos quatro protocolos utilizados.

Referências

- Brauner CC, Pimentel MA, Lemes JS, Pimentel CA, Moraes JCF.** Reprodução de vacas de corte em lactação e solteiras submetidas à indução/sincronização de estro. *Ciênc Rur*, v.38, p.1067-1072, 2008.
- Lobato JFP.** Considerações efetivas sobre seleção, produção e manejo para maior produtividade dos rebanhos de cria. In: Lobato JFP, Barcellos JOJ, Kessler AM. (Eds). *Produção de bovinos de corte*. Porto Alegre: Edipuc, p.405-414, 1998.
- Lobato JFP, Muller A, Pereira Neto OA, Osorio EB.** Efeitos da idade à desmama dos bezerros sobre o desempenho reprodutivo de vacas de corte primíparas. *Rev Bras Zootec*, v.29(supl. 1), p.2013-2018, 2000.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- Sá Filho MF, Gimenes LV, Sales JNS, Crepaldi GA, Medalha AG, Baruselli PS.** IATF em Novilhas. In: III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, PR, p.54-67, 2008.
- Santín T.** Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. *Qualitas instituto de pós-graduação em medicina veterinária, pós-graduação em produção e reprodução em bovinos*, 2010.
- Spitzer JC, Morrison DG, Wettemann RP.** Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. *J Anim Sci*, v.73, p.1251-1257, 1995.
- Swayer GJ, Barker DJ, Morris RJ.** Performance of young breeding cattle in commercial herds in the southwest of Western Australia 2. Liveweight, body condition, timing of conception and fertility in first-calf heifers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.31, p.431-441, 1991.
- Whisnant CS, Kiser TE, Thompson FN.** Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. *J Anim Sci*, v.63, p.1445-1448, 1986.



Emprego de protocolo longo à base de progesterona para sincronização do estro de novilhas e vacas Girolando

Use of long term progesterone protocol for estrus synchronization of Girolando heifers and cows

Vitória Yuki Endo^{1*}, Karoline Antunes de Albuquerque¹, Maysa Ceci Soares Muniz¹, Cícero Antonio dos Santos Filho², Cláudio Coutinho Bartolomeu¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; ²Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária, João Pessoa, PB, Brasil.

*E-mail: vitoriaye@gmail.com

Abstract

This study evaluated the efficacy of a long term progesterone protocols associated with PGF2a and GnRH by measurement of follicular diameter (FD) in D14, D22 and D30; time between the end of treatment and the onset of estrus and conception rate in groups of Girolando heifers and Girolando cows (N1 and N2, V1 and V2). On D30, the diameter of FD for the groups V1, V2, N1 and N2 was 13.3 ± 0.11 mm, 13.8 ± 0.14 mm, 0.10 mm and $13.7 \pm 12.7 \pm 0.49$ mm respectively. The time between the end of the treatment and the onset of estrus for the groups V1, V2, and N1, N2 was 115,2hs, 103,2hs, 127,2hs, 129,6hs, respectively. Based on the results it can be concluded that the protocols were efficient for obtaining a dominant follicle in the PGF2a application day favoring a good conception rate.

Keywords: follicular diameter, Girolando, progesterone.

Palavras-chave: diâmetro folicular, Girolando, progesterona.

Introdução

Atualmente exige-se dos pecuaristas eficiência máxima na produção para garantia de retorno econômico. Desta forma, índices elevados de produção, associados à alta eficiência reprodutiva, devem ser metas que norteiem os técnicos e criadores para alcançar maior produtividade e retorno econômico satisfatórios na atividade (Baruselli, 2004).

A sincronização do estro e inseminação artificial (IA) fornece aos produtores ferramentas de gestão eficazes para maximizar o potencial reprodutivo de novilhas e vacas de seu rebanho incorporando genética superior em suas operações. No entanto, os produtores têm sido relutantes em implementar estas tecnologias, devido a limitações de tempo e trabalho. Portanto, o desenvolvimento de protocolos de sincronização de estro, que limitem o tempo e o trabalho, favorecem a adoção dessas tecnologias (Leitman et al., 2009).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar índices reprodutivos em novilhas e vacas da raça Girolando após o emprego de um protocolo longo à base de progesterona.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Boa Vista, Zona Rural de Esperança-PB. Foram utilizadas 20 novilhas Girolando nulíparas com idade variando entre 16 e 22 meses e 20 vacas Girolando em lactação entre 40 e 60 dias pós-parto com bom histórico de fertilidade. Todos os animais apresentaram um escore corporal entre 3 e 3,5 (escala de 1 a 5) segundo Ferreira et al. (1990). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois tratamentos (Fig. 1), no início do experimento (D0), as novilhas atribuídas ao Grupo N1 (n = 10) e as vacas atribuídas ao grupo V1 (n = 10) receberam um dispositivo intravaginal CIDR® contendo 1,9g de progesterona, por 14 dias (D0 – 14) seguido pela aplicação de 100mg IM de um análogo do GnRH no dia 23 e 530mg IM de um análogo da prostaglandina no dia 30. As novilhas atribuídas ao Grupo N2 (n = 10) e as vacas atribuídas ao Grupo V2 (n = 10) receberam a mesma dose de progesterona que os grupos anteriores, por 14 dias (D2-16) seguido pela aplicação de 100mg IM de um análogo do GnRH no dia 23 e 530mg IM de um análogo da prostaglandina no dia 30.

A inseminação artificial (IA) foi realizada aproximadamente 12 horas após o início do estro. Para o acompanhamento da dinâmica folicular as fêmeas foram avaliadas por ultrassonografia transretal, com aparelho Aquila equipado com um transdutor linear de 7,5 MHz, Pie Medical, de quatro em quatro dias após a retirada do dispositivo contendo Progesterona. A taxa de concepção à IA foi determinada 60 dias após as inseminações artificiais.

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 16.0, empregando-se a análise de variância (ANOVA). Sendo evidenciada diferença estatística, foi aplicado o teste de Turkey para os contrastes entre as médias. A variável taxa de concepção foi analisada pelo teste Qui-quadrado.

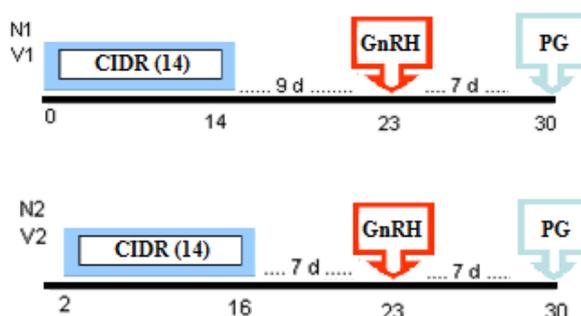


Figura 1. Esquema dos Protocolos para os grupos experimentais N1, V1 e N2, V2

Resultados e Discussão

O diâmetro folicular no D14 (Tab. 1), dia da retirada do implante, para o grupo V1 foi de 18,1mm e de 19,0mm para o grupo V2. Já o grupo N1 apresentou média de 14,0mm enquanto que o grupo N2 apresentou média de 12,9mm, observando-se diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

No D22, dia anterior à aplicação de GnRH, o diâmetro folicular médio do Grupo V1 foi de 12,5mm, enquanto que no grupo V2 foi de 11,5mm. Resultados semelhantes foram encontrados por Coutinho et al. (2007) que utilizaram vacas da raça Guzerá pluríparas, e obtiveram na segunda onda folicular o diâmetro máximo do foliculo dominante de $10,30 \pm 0,36$ mm.

Tabela 1. Comparação entre diâmetro folicular em novilhas e vacas da raça Girolando submetidas a tratamento com protocolo longo de progesterona.

Diâmetro máximo em (mm)	Grupo V1	Grupo V2	Grupo N1	Grupo N2
D14	$18,1 \pm 0,09^a$	$19,0 \pm 0,09^a$	$14,0 \pm 0,06^b$	$12,9 \pm 0,07^b$
D22	$12,5 \pm 0,15^a$	$11,5 \pm 0,13^a$	$9,0 \pm 0,13^a$	$10,0 \pm 0,05^a$
D30	$13,3 \pm 0,11^a$	$13,8 \pm 0,14^a$	$13,7 \pm 0,10^a$	$12,7 \pm 0,49^a$

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

O diâmetro folicular no D30, dia da aplicação da PGF2 α , para o Grupo V1 foi de 13,3mm, enquanto que no V2 foi de 13,8mm. Esses resultados assemelham-se com os de Figueiredo et al. (1997) que encontraram valores entre 11 e 12mm para os folículos pré-ovulatórios de vacas Nelore durante o ciclo estral normal. As novilhas do Grupo N1 apresentaram média de FD de 13,7mm e Grupo N2 apresentaram média de 12,7mm. Garcia e Salaheddine (2001) verificaram média de 13,60mm para o foliculo ovulatório de novilhas da raça Holandesa.

O efeito positivo da presença de um foliculo pré-ovulatório >10 mm sobre o desempenho reprodutivo de vacas *Bos indicus* já foi discutido em outros trabalhos. Gimenes et al. (2008) reportaram uma resposta ovulatória acima de 90% quando os folículos pré-ovulatórios atingem diâmetros superiores a 10 mm posteriormente, Sá Filho et al. (2010) demonstraram que a taxa de prenhez aumentou significativamente quando o tamanho dos folículos pré-ovulatórios foram superiores a 14,4 mm. Desta forma pode-se inferir que no presente estudo os diâmetros atingidos pelo foliculo ovulatório favoreceram tanto a exibição de estro quanto a ovulação.

Ao se avaliar o tempo entre o final do tratamento e o início das manifestações de estro, os grupos experimentais V1 e V2 apresentaram média de 115,2 h e 103,2 h, respectivamente enquanto que os grupos experimentais N1 e N2 apresentaram médias de 127,2 h e 129,6 h, respectivamente, não se observando diferença estatística ($P=0,82$). Ampla variação no intervalo da aplicação de prostaglandina ao início do estro também foi observada por Fuentes et al. (1998) em animais mestiços (72 a 168 h).

A taxa de concepção foi avaliada 30 dias após a inseminação de todos os animais, para os grupos de vacas as médias foram V1 de 70% e V2 foi de 80%, enquanto que para as novilhas foram N1 70% e N2 60%, não se observou diferença estatística ($P=0,47$). Esses dados corroboram a afirmação de Baruseli et al. (2004), de que os protocolos hormonais aplicados em vacas no pós-parto, possibilitam que a maior parte do rebanho retorne a ciclicidade e fique prenhe em um período reduzido de tempo.

Consideração final

Podemos concluir que os protocolos utilizados foram eficientes para promover o crescimento folicular e consequentemente, obter uma taxa de concepção eficiente. As vacas apresentaram folículos de diâmetro maior quando comparado com as novilhas e a média do tempo entre o final do tratamento e o início do estro é menor em vacas do que em novilhas.



Referências

- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO.** Técnicas de manejo para aperfeiçoar a eficiência reprodutiva em fêmeas *Bos indicus*. Grupo de Estudo de Nutrição de Ruminantes – Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, FCA/FMVZ/Unesp, Botucatu, São Paulo, 2004, p.18.
- Coutinho GTRM, Viana JHM, Sá WF, Camargo LS, Ferreira AM, Palhão PM, Nogueira LAG.** Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.1089-1096, 2007.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL.** Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- Fuentes JRB, Gutiérrez EP, Galina CS.** Comportamiento reproductivo de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* bajo programas de inseminación artificial a estro sincronizado y natural en condiciones del trópico seco de Costa Rica. *Veterinaria*, v.29, p.67-73, 1998.
- Garcia A, Salaheddine M.** Effect of oestrus synchronization with estradiol 17 β and progesterone on follicular wave dynamics in dairy heifers. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.301-307, 2001.
- Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NA, Torres-Júnior JR, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JB, Mapletoft RJ, Baruselli PS.** Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852-869, 2008.
- Leitman NR, Busch DC, Mallory DA, Wilson DJ, Eilersieck MR, Smith MF, Patterson DJ.** Comparison of long-term CIDR-based protocols to synchronize estrus in beef heifers. *Anim Reprod Sci*, v.114, p.345-355, 2009.
- Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JE, Perry GA, Baruselli PS.** Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.23-30, 2010.



Fracionamento de doses de sêmen bovino criopreservado para utilização na fertilização *in vitro* de embriões

Fractionation of bovine semen doses cryopreserved for use in vitro fertilization

Rodrigo de Moraes¹, Rodrigo dos Santos Albuquerque¹, Gilson Ferreira Araújo¹, Fábio Trindade Gonçalves*², Alysson Jorge de Oliveira Sousa³, Aluizio Otavio Almeida da Silva⁴, José Silva de Sousa⁴, Adriana Novaes dos Reis⁴

¹Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAM), Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil; ²Programa de Residência em Clínica Médica e Reprodução de Ruminantes e Eqüídeos - Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil; ³Instituto Federal do Pará (IFPA), Castanhal, Pará, Brasil; ⁴Central de Biotecnologia de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: fabio_551v@hotmail.com

Abstract

The use of frozen semen for PIVE is not fully utilized, as usually using a full dose of semen being wasted a large number of sperm that could be used in other PIVE, for these reasons, the objective of this work was to evaluate the fractionation of 0.25 ml straws in frozen bovine semen doses, divided into four equal sections for later use in IVF technique in order to avoid wasting sperm present in the straw. Motility, vigor and sperm concentration analyzes were performed. There was observed no effect of vane fractionation process on sperm parameters evaluated, such as motility 58,75%±7,6, vigor 2,75±1,6, and spermatic concentration average (3,7x10⁶) between the sectioned parts. Thus, it is concluded that the semen dose fractionation method of cryopreserved bull into four sections is viable for in vitro fertilization techniques, provided that there is no compromise on the number and viability of sperm cells.

Keywords: fractionated dose, IVP embryos.

Palavras chave: dose fracionada, PIVE.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem se tornando a biotécnica reprodutiva de eleição em virtude de proporcionar a maximização do número de descendentes com elevado valor zootécnico, acelerando o progresso genético dos rebanhos (Neves et al., 2010). A produção de embriões através da *ovium pick up* (OPU) seguida da PIVE na América do Sul corresponde a 72,7% da produção mundial, sendo o Brasil o maior produtor com cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014; Blondin, 2015). Vários estudos têm sido realizados na tentativa de incrementar a eficiência da PIVE, entretanto, o número de células que atinge o estágio de blastocisto ainda dificilmente supera 40%, além de que, a presença de fatores limitantes quanto ao uso da técnica impedem sua utilização em maior escala, como é o caso do custo elevado, sendo necessários estudos que viabilizem a redução dos gastos sem alterar o desempenho da técnica (Lonergan; Fair, 2008).

A utilização de uma dose de sêmen congelado para a PIVE pode se tornar subutilizada, quando o número de doadoras é pequeno, ou quando a quantidade de oócitos obtidos por OPU for reduzida, ou ainda quando diferentes doadoras são fertilizadas com sêmen de diferentes reprodutores, visando produtos com variadas características e aptidões, visto que, geralmente, independente do caso, no mínimo uma dose de sêmen será utilizada para este procedimento, sendo neste caso desperdiçado um grande número de espermatozoides potencialmente férteis da dose utilizada (Reichenbach et al., 2008).

Visando maximizar o aproveitamento do número máximo de espermatozoides das doses de sêmen congelado, o presente trabalho objetivou avaliar as possíveis alterações nos parâmetros seminais ocorridos após o fracionamento das doses, além de avaliar seu potencial para ser utilizado em programas de PIVE, evitando-se o uso imediato de toda a dose em um único procedimento, melhorando consideravelmente o custo/benefício da PIVE.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN-UFPa), localizada no município de Castanhal, Estado do Pará. Foram utilizadas 20 doses de sêmen de quatro touros Nelore, submetidos a colheita de sêmen por meio de vagina artificial.

Inicialmente foram realizadas avaliações de rotina do sêmen fresco, onde foram observados, motilidade progressiva retilínea (%), vigor espermático (1-5), concentração (10⁶ espermatozoides/mL), assim como morfologia, segundo classificação do CBRA (2013). As amostras consideradas viáveis foram diluídas em TES[®], para que a concentração final da amostra apresentasse 20x10⁶ espermatozoides/dose. Posteriormente, os ejaculados considerados viáveis foram envasados em palhetas de 0,25 ml e submetidos ao equilíbrio por 3 horas a 5°C em posição horizontal, seguido de permanência por 20 minutos no vapor de nitrogênio líquido, para posteriormente as doses de sêmen serem imersas em nitrogênio líquido a -196°C até o processo de fracionamento.

Para o fracionamento as palhetas de 0,25 ml foram manipuladas sob o vapor de nitrogênio líquido, onde inicialmente foram retiradas suas extremidades com limite de 17 mm do lado do êmbolo da palheta e 5 mm do lado da esfera de aço, ficando a palheta com 111 mm de comprimento total que foi dividido em 4 partes iguais, medindo aproximadamente 27 mm e contendo em torno de 0,06 ml de sêmen diluído em cada fração. Os cortes foram realizados utilizando-se tesoura e pinça em aço inox previamente esterilizados, e um suporte criado a partir de um aplicador de IA, modelo universal, cujo tamanho foi preparado para o encaixe das palhetas de sêmen, dando suporte para a medida e para o corte das mesmas.

Após o fracionamento das amostras, cada parte da palheta de 27 mm foi colocada dentro de um criotubo de 2 ml aquecido sendo o mesmo colocado sobre placa aquecida à 40°C por 20 segundos para a completa descongelação do sêmen. Em seguida as amostras foram avaliadas quanto a motilidade e o vigor. A verificação da concentração espermática pós-descongelação foi realizada através da contagem de uma alíquota em câmara de Neubauer.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 1% ($p < 0,01$) e as diferenças entre médias comparadas pelo teste Tukey (5%).

Resultados e Discussão

A avaliação inicial das amostras do sêmen fresco revelou médias de 80% de motilidade progressiva retilínea, vigor 3 e 70% de espermatozoides morfologicamente normais, demonstrando que o sêmen estava apto ao processo de criopreservação. Para os parâmetros de motilidade e vigor do sêmen congelado, não houve efeito significativo ($P > 0,01$) nas características avaliadas do sêmen após a realização dos respectivos cortes, visto que as amostras imediatamente após o processo demonstraram motilidade e vigor ($58,75\% \pm 7,58$ e $2,75 \pm 1,24$, respectivamente), assim como, a patologia espermática ($38,74 \pm 5,24$) compatíveis com os padrões mínimos sugeridos pelo CBRA para a avaliação do sêmen bovino descongelado. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2012) que compararam doses de sêmen convencionais e fracionadas, e obtiveram valores de motilidade de 54,3% e 58,1%, respectivamente, e vigor de 3,0 para ambos os grupos, além disso, não observaram diferenças nas taxas de concepção das vacas inseminadas com doses fracionadas e convencionais. Araújo (2010), realizando trabalho semelhante, entretanto com o fracionamento da dose de sêmen congelada em duas partes, observou resultados superiores para motilidade (67,8%) e vigor espermático (3,0).

As concentrações espermáticas de cada parte medindo 27 mm com 0,06 ml de sêmen congelado, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre elas ($3,7 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$; $4,3 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^6$; $3,8 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$; $3,0 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ espermatozoides/ml, para a primeira, segunda, terceira e quarta partes, respectivamente (Fig. 1). Camargo et al. (2000), utilizaram quatro concentrações espermáticas diferentes para a FIVE (0,5; 1,0; 2,0 e $4,0 \times 10^6$ espermatozoides/ml), onde as taxas de clivagem foram semelhantes (44,7%, 55,9% e 52%, respectivamente), exceto, na menor concentração avaliada ($0,5 \times 10^6$) que apresentou taxa de clivagem inferior (31%). No entanto, Coelho (2000) utilizando na FIVE uma concentração espermática mais elevada (5×10^6) atingiram 60,5% de clivagem, assim como, Ramos et al. (2000) que utilizaram 4×10^6 e alcançaram 72,9% de clivagem.

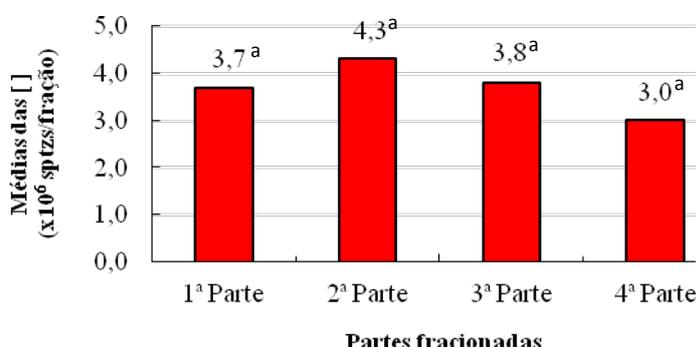


Figura 1. Concentrações médias de espermatozoides em cada porção do fracionamento da palheta de 0,25 ml. Valores com diferentes letras sobrescritas nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$).

Camargo et al. (2000) citam que elevadas concentrações tendem a aumentar a taxa de polispermia e reduzir o potencial de desenvolvimento dos oócitos devido à presença de enzimas hidrolíticas e radicais livres provenientes dos espermatozoides mortos. A concentração espermática ideal preconizada para a FIVE é de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/ml (Rheingantz et al., 2006). Levando em consideração que a média geral de espermatozoides de cada divisão da palheta do presente estudo foi de $3,7 \times 10^6$, sendo que deste total 58,75% dos



espermatozoides apresentavam motilidade progressiva retilínea, ainda assim, esta amostra estaria acima da concentração mínima necessária para a utilização da dose para a FIVE.

Conclusão

Os parâmetros espermáticos estudados não foram comprometidos pelo fracionamento das doses de sêmen congelado em quatro partes iguais, demonstrando ser um método viável a ser utilizado na FIVE, entretanto são necessárias mais pesquisas para avaliar o melhor desenvolvimento dessa técnica e sua avaliação *in vitro*.

Referências

- Araújo GF.** Viabilidade da dose fracionada de sêmen bovino criopreservado descongelada por diferentes métodos. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, Belém. 2010.
- Blondin P.** Status da produção de embriões no mundo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira Tecnologia de Embriões, 29, 2015, Gramado. *Anais...* Gramado:SBTE, 2015, p. 445.
- Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JMH, Freitas C.** Concentração espermática na fecundação *in vitro*, com sêmen de touro da raça Guzerá. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.52, p.59-64, 2000.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (BRA).** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte:CBRA, 2013, 104p.
- Coelho LA, Esper CR, Garcia JM, Vantini R, Almeida Junior IL.** Fecundação *in vitro* de oócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. *Rev Bras Zootec*, v.29, p.397-402, 2000.
- IETS.** Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*, v.32, n.4, p.14-26, 2014.
- Lonergan P, Fair T.** *In-vitro* produced embryo. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.
- Neves JP, Miranda KL, Tortorella RD.** Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.418, 2010.
- Reichenbach HD, Moraes JCF, Neves JP.** Tecnologia do sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2ª ed. São Paulo: Varela, 2008. p. 57-82.
- Rodrigues AL, Ferraz PA, Loiola MVG, Bittencourt RF, Chalhoub M, Andrade BHA, Ribeiro Filho AL.** Fracionamento de doses de sêmen em programas de IATF em bovinos. *Revista Magistra*, v.24, p.164-172, 2012.



Indução a Maturidade Sexual e Taxa de Prenhez com Progesterona de 3º uso em Fêmeas Nelores de 22 meses

Induction of Sexual Maturity and Prenature Rate with Progesterone of 3rd use in Females Nelores of 22 months

Wilton Figueiredo Lima^{1*}, Gustavo Alighiere Lopes da Silva¹, Carlos Vinicius da Silva Nascimento², Alvaro Chaves Neto¹, Marina Bezerra Macedo¹, Sebastião Tavares Rolim Filho¹, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro¹

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil; ²Gerente técnico-Agener Tecnopec.
*E-mail: limawilton1@gmail.com

Abstract

The objective of this study was to evaluate if the progesterone device (P4) of 3rd use would be efficient to induce the cyclicity and consequent pregnancy rate in nelore heifers. We used 65 animals with a mean weight of 338 kg. All kept in the same environmental and handling conditions. The induction of estrus was performed in 33 females with P4 implant of 3rd use, thus forming Group 1 (G1 = 33), those that did not receive the implant were allocated in Group 2 (G2 = 32). Thirty-two days post-induction protocol was performed on all animals for TAI. The data collected were tabulated in electronic spreadsheets and evaluated in the SAS software (2010). The TAI pregnancy rate was 21.21% (G1) (7/33) and 46.88% (15/32) for (G2) (P < 0.05). Thus suggesting that prior induction to puberty with P4 device of 3rd use was not effective.

Keywords: *Reproductive efficiency, heifers, puberty.*

Palavras-chave: Eficiência reprodutiva, novilhas, puberdade.

Introdução

Puberdade ou idade ao primeiro parto, constitui-se um dos parâmetros mais confiáveis quando se deseja mensurar e elevar a eficiência reprodutiva do rebanho, pois expressa, em linhas gerais, o melhor índice para avaliação da fertilidade inerente a uma fêmea (Marson et al.; *apud* Silva Filho et al., 2007). Vários fatores podem influenciar o momento em que a puberdade é manifestada dentre eles pode-se mencionar a genética, o estado nutricional, o ambiente e o efeito touro. No entanto, faz-se necessário o conhecimento sobre como estes fatores podem interferir no início da puberdade para que, a partir daí, produtores e profissionais ligados ao setor pecuário possam adotar medidas de manejo que visem reduzir a idade à puberdade em novilhas (Silva Filho et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar se a progesterona de 3º uso seria eficiente para induzir a ciclicidade e consequente taxa de prenhez em novilhas nelore púberes.

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado na cidade de Tucuruí no sudeste do estado do Pará. Foram utilizadas 65 novilhas nelore com idade média de 22 meses, peso médio de 338 kg e média de escore de condição corporal (ECC) de 3,2. Todas foram mantidas sob as mesmas condições ambientais e de manejo, com pastagem de capim Braquiarião (*Brachiaria Brizantha cv Marandu*) e Mombaça (*Panicum maximum*) com sal mineral e água *ad libitum*.

Todos os animais passaram por exame ginecológico antes do início do estudo. De forma aleatória foi realizado a indução do cio em 33 fêmeas que receberam um Dispositivo Intravaginal Bovino, de progesterona, P4, (DIB®, Zoetis-Syntex AS, Argentina) de 3º uso, no dia zero (D0), no dia dez (D10) foi retirado o implante e administrado 1 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (Gonadiol®, Coopers, São Paulo, Brasil), formando o Grupo 1 (G1= 33) e as que não receberam o dispositivo foram alocadas no Grupo 2 (G2=32). Trinta e dois dias após a indução foi realizado a sincronização de todos os animais e posterior IATF. O protocolo de IATF utilizado foi com implante auricular, Norgestomet 3.0mg (Crestar®, MSD Animal Health, São Paulo, Brasil) 1º uso, por via subcutânea, e administração de 2 mg de BE no dia zero (D0), no oitavo dia (D8) foi retirado do implante e administrado 265 mg de Prostaglandina, Cloprostenol (Ciosin®, MSD animal health, São Paulo, Brasil) e 300 UI de Gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis-Syntex AS, Argentina), no dia nove (D9) foi administrado 1 mg de BE e 24h após, no décimo dia (D10), foi realizada a IATF.

Os dados colhidos das fichas individuais foram tabulados em planilhas eletrônicas e avaliados no software SAS (2010). Para a análise das diferentes condições experimentais, a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey foram utilizados, adotando-se o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A taxa de prenhez após IATF das novilhas induzidas com progesterona de 3º uso (G1) foi de 21,21% (7/33) e o (G2) foi de 46,88% (15/32), ocorrendo diferença significativa, tabela 1, (P < 0,05). Não houve



variação significativa quanto a influencia do sêmen, escore de condição corporal e peso sobre a taxa de prenhez inicial.

Silva Filho (2006) obteve taxa de prenhez melhor que este estudo ao utilizar um método de indução de puberdade, associada a sincronização de cio e com a utilização de P4, E2 e ECG (análogo do GnRH). No dia zero, introduzir o progestágeno (CIDR) e injetar 2mg de BE. No dia 9, retirar a P4 e aplicar 200UI de eCG e inseminar 54 horas após a remoção do progestágeno. 90% das novilhas apresentaram sinais de estro 42 horas após a remoção do implante. Este protocolo apresentou 52% de prenhez.

Tabela 1. Taxa de prenhez de novilhas submetidas indução a maturidade sexual e a IATF de 4 manejos.

Grupos	N	Prenhez Positiva	Prenhez Negativa
G1	33	21,21%	78,79%
G2	32	46,88%	53,12%

Sendo observada influência significativa da raça para esta variável ($P < 0,05$).

Ambrose et al. (2005) obtiveram uma taxa de prenhez de 66,1% em novilhas púberes utilizando um protocolo hormonal com CIDR-B® e Cipionato de Estradiol, resultado superior ao encontrado neste experimento.

A taxa de prenhez final após repasse com touro foi de 42,42% (14/33), para as novilhas do G1 e de 59,37% para as do G2, com média geral de 50,77% (33/65), não diferindo estatisticamente (Tab. 2).

Tabela 2. Taxa de prenhez final, com IATF e repasse do touro.

Grupos	N	Prenhez Positiva	Prenhez Negativa
G1	33	42,42%	59,37%
G2	32	57,58%	40,63%

Não sendo observada influência significativa da raça para esta variável ($P > 0,05$).

Conclusão

O tratamento à indução previa a maturidade sexual e a taxa de prenhez com progesterona de 3º uso, não foi efetivo.

Referências

Ambrose JD, Kastelic JP, Rajamahendran R, Aali A, Dinn N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. *Theriogenology*, v.64, p.1457-1474, 2005.

Silva Filho AHS, Araújo AA, Rodrigues APR. Indução da Puberdade em Novilhas com uso da Hormonioterapia. *Ciência Animal*, v.17, p.83-89, 2007.

Silva Filho AHS. Métodos de Indução e Sincronização do estro e da ovulação em novilhas mestiças (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) pré-púberes e púberes. 2006. 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza CE, Brasil, 2006.



Influência da população folicular na taxa de prenhez de vacas Nelore PO submetidas à IATF

Influence of follicular population in the pregnancy rate of PO Nelore cows submitted to TAI

Keitiane Colares de Sousa^{1,*}, Sebastião Tavares Rolim Filho², Haroldo Francisco Lobato Ribeiro², Raphael Castro Conde², Eliene Souza Araújo², Geysse Maria Machado Lima³, Wilson Amaro Moreira Conde Sobrinho⁴, Evellyn Aryanne Lopes Carvalho

¹Médica Veterinária; ²UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia; ³UFPA – Universidade Federal Rural da Amazônia; ⁴Zootecnista, Belém, PA, Brasil.

*E-mail: keitiane_86@yahoo.com.br

Abstract

The aim of the study was to evaluate the influence of follicular population (PF) in the TAI of D0 in the pregnancy rate of Nelore PO cows. 36 cows were used, divided into two groups (≤ 10 and > 10 follicles) were submitted to the following protocol. In the D0 was introduced intravaginal P4 implant (DIB® 1g; Zoetis) and applied 2mL BE (Gonadiol®; Zoetis). In D8 was removed the implant and applied 300 IU (1.5 mL) of eCG (Novormon®; Zoetis) and 2.0 mL of PGF2 α (Ciosin®, Zoetis). In the D9 was applied 1mL BE (Gonadiol®; Zoetis) and 24h after TAI was made. The cows were subjected to ultrasound examinations Transvaginal in D0 to PF score. Pregnancy diagnosis was performed 30 days after TAI. The data were analyzed by SAS software (2009) and the pregnancy rate was compared using the chi-square test ($P < 0.05$). The pregnancy rate for PF ≤ 10 group was 54.55% and the PF group > 10 was 28.57% in the D0, with no statistical difference ($P > 0.05$).

Keywords: Nelore, follicular population, TAI.

Introdução

Segundo os dados do IBGE, o efetivo de bovinos em 2014 foi de 212,34 milhões de cabeças, obtendo um aumento de 0,3% em relação ao ano anterior. A região Centro-Oeste foi a que apresentou o maior índice desse rebanho com 33,5% desse total.

A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) é uma das biotécnicas mais utilizadas no rebanho nacional atualmente e se apresenta como ferramentas de maior impacto no melhoramento genético, no aumento da produtividade e da rentabilidade dos bovinos (Sá Filho et al., 2012). Baruselli et al. (2012) relatam que uma das possibilidades de se superar os índices de prenhez é a associação dos resultados alcançados na IATF com a população folicular antral em bovinos.

Ireland et al. (2011), afirmam que a quantidade de folículos antrais tem efeito sobre a qualidade oocitária e embrionária, além de afetar a capacidade de síntese de progesterona e de crescimento endometrial, em fêmeas taurinas com número consistentemente baixo de folículos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do número de folículos na taxa de prenhez de vacas Nelore PO submetidas à IATF no nordeste paraense.

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no município de Maracanã, localizado na região nordeste paraense, no período de 02 a 12 de julho de 2014. Foram utilizadas 36 vacas, divididas em dois grupos (≤ 10 e > 10 folículos), submetidas ao seguinte protocolo. No D0 foi introduzido implante intravaginal de P4 (DIB® 1g; Zoetis) de 1º uso associado a aplicação IM de 2mL de BE (Gonadiol®; Zoetis). No D8 foi retirado o implante e aplicado 300UI (1,5mL) de eCG (Novormon®; Coopers Zoetis) e 2,0mL de PGf2 α (Ciosin®, Zoetis). No D9 foi aplicado 1mL de BE (Gonadiol®; Zoetis) e 24h após foi feita a IATF. As vacas foram submetidas a exames ultrassonográfico por via transvaginal no D0 para contagem da população folicular. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF. Os dados foram avaliados através de software especializado SAS (2009) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). A taxa de prenhez foi comparada pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Resultados e Discussões

A taxa de prenhez para o grupo que apresentou ≤ 10 folículos foi de 54,55% (12/22) e para o grupo que apresentou > 10 folículos foi de 28,57% (4/14) no D0, não havendo diferença estatística ($P > 0,05$).

Cushman et al. (2009) observaram diferenças significativas entre as taxas de prenhez na PF de fêmeas taurinas, sendo de 85,5% (84) e 94,5% (178) para os animais que apresentaram até 15 folículos e acima de 25 folículos respectivamente. Os resultados desses autores mostraram-se superiores aos do presente estudo.

Rodrigues et al. (2013) trabalhando com 481 fêmeas Nelore, não observaram diferença estatística na taxa de prenhez de vacas com baixa, média e alta PF, sendo a taxa de 29,34%, 29,33% e 29,27%



respectivamente. Esses resultados são inferiores quando comparados aos do presente estudo.

Conclusão

O número de folículos presentes nos ovários no D0 da IATF não influenciaram na taxa de prenhez de vacas Nelore de elite.

Referências

Baruselli PS, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Sá Filho MF. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod*, v.9, p.139-152, 2012.

Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, Freetly HC. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci*, v.87, p.1971-1980, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção de pecuária municipal 2014. Disponível em: <http://ibge.gov.br>. Acesso em: 15 de agosto de 2016.

Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO, Folger JK. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.23, p.1-14, 2011.

Rodrigues AS, Oliveira SN, Loiola MVG, Andrade BHA, Ferraz PA, Ayres MCC, Bittencourt RF, Chalhoub M, Ribeiro Filho AL. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. *Pesq Agropec Bras*, v.48, p.801-804, 2013.

Sá Filho MF. Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte. 2012, 125f. Tese (Doutor em ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.



Influência do diâmetro do maior folículo na taxa de prenhez de vacas Nelore de elite submetidas à IATF

The largest follicle diameter influence on pregnancy rates of elite Nelore cows submitted to TAI

Eliene Souza Araújo^{1*}, Keitiane Colares de Sousa², Sebastião Tavares Rolim Filho¹, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro¹, Victor da Costa Mileo¹, Regivany do Socorro de Lima Chaves², Geysel Maria Machado Lima³, Evellyn Aryanne Lopes Carvalho¹

¹Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA); ²Médica Veterinária; ³Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brasil.

*E-mail: elienearaujo-ufra@hotmail.com

Abstract

The objective was to evaluate the influence of the largest follicle diameter (DMF) in the TAI D10 pregnancy rate of Nelore PO cows. 36 females were used, divided into two groups ($\leq 10\text{mm}$ and $> 10\text{mm}$) in the following protocol. In the D0 was introduced intravaginal P4 implant (DIB® 1g; Zoetis) and applied 2mL BE (Gonadiol®; Zoetis) IM. In D8 was removed the implant and applied 300 IU (1.5 mL) of eCG (Novormon®; Zoetis) and 2.0 mL of PGF2a (Ciosin®, Zoetis). In the D9 was applied 1mL BE (Gonadiol®; Zoetis) and 24h after TAI was made. Females were subjected to ultrasound examination by transvaginal the D10 for measurement of DMF. Pregnancy diagnosis was performed 30 days after TAI. Data were evaluated using SAS software (2009) and the pregnancy rate was compared using the chi-square test ($P < 0.05$). The pregnancy rate for the group with $DF \leq 10\text{ mm}$ was 16.6% (6/36) and $> 10\text{ mm}$ was 27.7% (10/36) with no statistical difference ($P > 0.05$).

Keywords: Nelore, follicular diameter, TAI.

Introdução

Com o avanço tecnológico da pecuária, foram desenvolvidos protocolos de sincronização de estro, que permitem inseminar um grande número de fêmeas num período de tempo pré-determinado. Esses tratamentos são conhecidos como protocolos de inseminação artificial em tempo fixo que são aplicados para o controle das ovulações de modo que as inseminações ocorram em horário pré-determinado. Os protocolos de IATF visam controlar o crescimento das ondas foliculares, regular a função do corpo lúteo e o momento da ovulação (Baruselli et al., 2004; Ribeiro et al., 2009).

Nos últimos anos, a ultrassonografia trans-retal tem sido frequentemente utilizada, na maioria das vezes, em estudos científicos que caracterizam a dinâmica folicular durante o ciclo estral, proporcionando entendimento das características do desenvolvimento e regressão folicular nos vários estádios (Borges et al., 2003).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do diâmetro do maior folículo no D10 na taxa de prenhez de vacas Nelore PO submetidas à IATF no nordeste paraense.

Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado em uma propriedade localizada no município de Maracaná, região nordeste paraense, no período de 02 a 12 de julho de 2014. Foram utilizadas 36 fêmeas, divididas em dois grupos ($\leq 10\text{mm}$ e $> 10\text{mm}$) submetidas ao seguinte protocolo. No D0 foi introduzido implante intravaginal de P4 (DIB® 1g; Zoetis) de 1º uso associado a aplicação IM de 2mL de BE (Gonadiol®; Zoetis). No D8 foi retirado o implante e aplicado 300UI (1,5mL) de eCG (Novormon®; Coopers Zoetis) e 2,0mL de PGf2a (Ciosin®, Zoetis). No D9 foi aplicado 1mL de BE (Gonadiol®; Zoetis) e 24h após foi feita a IATF. As fêmeas foram submetidas a exames ultrassonográfico por via transvaginal no D10 para mensuração do diâmetro folicular. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF. Os dados foram avaliados através de software SAS (2009) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). A taxa de prenhez foi comparada pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Resultados e Discussões

A taxa de prenhez de acordo com o diâmetro do maior folículo presente nos ovários das fêmeas no D10 da IATF foi de 16,6% (6/36) e 27,7% (10/36) para as que apresentaram diâmetro folicular $\leq 10\text{mm}$ e $> 10\text{mm}$ respectivamente.

Pugliesi et al. (2014) trabalharam com 783 vacas da raça Nelore dividido em dois grupos (controle e tratado). No grupo controle obteve taxa de prenhez de 41,9% para as fêmeas que apresentaram diâmetro folicular $< 11\text{mm}$. Esse resultado mostrou-se superior aos do presente estudo tanto para os animais com folículo $\leq 10\text{mm}$ quanto para os com $> 10\text{mm}$.

No grupo tratado, esses mesmos autores obtiveram taxa de prenhez de 42,3% para as fêmeas que apresentaram diâmetro folicular $< 11\text{mm}$. Esses dados também são superiores aos do nosso estudo.



Conclusão

O diâmetro do maior folículo presente nos ovários das fêmeas no D10 da IATF não influenciou na taxa de prenhez.

Referências

Baruselli PS, Reis EL, Marques MO. Técnicas de manejo para aperfeiçoar a eficiência reprodutiva em fêmeas *bos indicus*. Grupo de Estudo de Nutrição de Ruminantes – Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FCA/FMVZ/Unesp Botucatu, São Paulo, p.18, 2004.

Borges AM, Torres CAA, Ruas JRM, Rocha Junior VR, Carvalho GR, Fonseca JFMarcatti Neto A, Assis AJ. Características da Dinâmica Folicular e Regressão Luteal de Vacas das Raças Gir e Nelore após Tratamento com Cloprostenol Sódico. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.53, p.595-604, 2003.

Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Madureira EH, Nogueira E, Maio JRG, Silva LA, Binelli M. Impacto da suplementação de progesterona de longa ação durante o diestro inicial em vacas nelore submetidas a IATF. *J. Embrião*, v.54, p. 7-12, 2014.

Ribeiro PHPR, Costa Filho LCC, Rodrigues LA, Alves LGC, Silva AS, Nogueira E. Efeitos de diferentes indutores de crescimento folicular na taxa de prenhes de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Maringá: 2009.



Maturação de oócitos bovinos em meio suplementado com captopril

Maturation of Bovine oocytes in medium supplemented with captopril

Viviany de Sousa Rodrigues^{1,*}, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco¹, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva¹, Bruno da Silva Prado¹, Marlon de Araújo Castelo Branco¹, Antônio de Sousa Júnior², Geraldo Magela Côrtes Carvalho³, José Adalmir Torres de Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, Brasil; ²Colégio Técnico de Teresina, CTT, Piauí, Brasil; ³Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí, Brasil.

*E-mail: vivisousarodrigues@hotmail

Abstract

The aim of this research was to evaluate the effects of supplementation of maturation medium with captopril in oocyte *in vitro* maturation (IVM). 470 CCOs were recovered and classified into grades I and II, being divided into four groups: G1 (n = 56), that was control group; G2 (n = 152) 20 mM of captopril; G3 (n = 126) 40 μ M of captopril; and G4 (n = 136) 80 μ M of captopril, then these were subsequently submitted to IVM process for 24 hours at 38.5°C in 5% CO₂. After 24 hours of maturation, oocytes were denuded and evaluated for the first polar body extrusion and were, therefore, considered matured. The addition of the Captopril in medium of oocytes maturation has not improved the IVM rate.

Keywords: angiotensin, captopril, maturation.

Palavras chaves: angiotensina, captopril, maturação.

Introdução

A maturação oocitária é um processo fundamental na produção *in vitro* de embriões, visto que as etapas seguintes do processo são dependentes da maturação completa dos oócitos, porém o sucesso na maturação não garante sucesso nos eventos subsequentes (Sirard et al., 2006). Modificações nos meios usados para maturação de oócitos constitui uma alternativa para melhorar os índices de produção *in vitro*. Decifrar os mecanismos envolvidos na competência do oócito é um grande desafio da fisiologia reprodutiva (Gilchrist e Thompson, 2007).

O captopril é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), que impede a angiotensina I (Ang. I) de ser convertida em angiotensina II (Ang. II). A angiotensina II apresenta uma importante função no início da ovulação em bovinos, potencialmente atuando como um mediador intrafolicular do LH, também previne o efeito inibitório das células foliculares durante a maturação nuclear *in vitro* (Barreta et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação com captopril na maturação oocitária *in vitro*.

Material e Métodos

Os ovários utilizados no experimento foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas no Abatedouro e Marchantaria Santa Rita, no município de Teresina-PI e transportados até o laboratório em recipiente térmico com solução fisiológica 0,9% estéril a uma temperatura de 35°C. O tempo de transporte do frigorífico ao laboratório não foi superior a 30 minutos. No laboratório, os ovários foram lavados com solução fisiológica 0,9% a 35°C e os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos medindo entre 2 a 8 mm, utilizando agulha descartáveis 25 x 8 mm (21G), acoplado a uma seringa de 10 mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo tipo Falcon de 15 mL e armazenado em Banho-Maria a 35°C, durante 15 minutos para sedimentação.

Sob fluxo laminar os CCOs aspirados foram depositado em placa de Petri de 100 x 20 mm (Corning®) para pesquisa sob estereomicroscópio de oócitos grau I e II (Viana et al., 2004), que posteriormente foram lavados três vezes e colocados em cultura de meio MIV constituído de TCM 199 suplementado (2,4 mM de NaHCO₃; 2,2 mg/mL de piruvato de sódio; 5 μ g/mL de LH; 5 μ g/mL de FSH; 100 ng/ μ L de eGF; 1 μ g/mL de estradiol; 50 μ M de cisteína; 10 % de SFB e 1 % de gentamicina), e adicionado captopril em 0 μ M, 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M constituindo os tratamentos, respectivamente. Foram realizados sete repetições e utilizados 10 a 20 oócitos por 100 μ L/gota. Os CCOs foram incubados em atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5°C por 24 horas. Para avaliação da taxa de maturação foram avaliados 470 CCOs e, após 24 horas de maturação, os oócitos foram desnudados com hialuronidase 0,2% em tampão fosfato salino (PBS) com auxílio de um agitador tipo vortex por 4 minutos. Os oócitos que extrusaram o 1º corpúsculo polar foram considerados em fase de MII (maturados). As taxas de maturação dos CCOs, foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Kruskal Wallis (P < 0,05). Todas as análises foram realizadas segundo os procedimentos do PROC GLM pelo software SAS® versão 9.0 (2002).



Resultados e Discussão

Este estudo avaliou oócitos bovinos cultivados em quatro suplementações distintas de captopril, sendo a eficácia do meio mensurada através do número de oócitos em estágio de metáfase II (maturados).

O captopril é um antagonista de angiotensina II específico, entretanto, ao ser adicionado ao meio de maturação nas concentrações de 0, 20, 40 e 80 μM , não interferiu na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII após 24 horas de cultivo ($P > 0,05$) (Tab. 1). A eficácia de diferentes meios de maturação *in vitro* (MIV) no desenvolvimento embrionário tem sido foco de intensa discussão na literatura e objeto de inúmeros ensaios comparativos.

Tabela 1. Taxa de maturação de oócitos bovinos com ou sem a adição de captopril no meio de MIV.

Grupo	Taxa de Maturação
0 μM	38,03 ^a
20 μM	45,44 ^a
40 μM	36,67 ^a
80 μM	31,61 ^a

*Medianas seguidas de letras iguais não diferem entre-se pelo teste Kruskal Wallis ($P < 0,05$).

Giometti et al. (2005) mostraram que a Angiotensina II não atua diretamente no oócito, e seu efeito positivo sobre a maturação só pode ser observado quando as células foliculares estão presentes no sistema de cultivo *in vitro*. No presente trabalho não foi utilizado células da teca em co-cultivo com CCOs, por isso possivelmente não foi encontrado interferência do inibidor seletivo da ECA na clivagem, maturação e produção de embriões.

Em folicúlos bovinos, ambos os tipos de receptores de Ang II foram detectados em células da teca, mas não em células da granulosa (Brunswig-Spickenheier e Mukhopadhyay, 1992; Acosta et al., 1999), isto explica porque o efeito de Ang II ocorreu apenas quando as células da teca estavam presentes no sistema de cultura de oócitos (Giometti et al., 2005; Stefanello et al., 2006).

O Captopril foi utilizado neste estudo como desacelerador da maturação nuclear do oócito. O bloqueio da meiose fornece um tempo adicional ao oócito para sofrer alterações bioquímicas e estruturais que permitam suportar a fecundação e ter desenvolvimento embrionário normal (Dielemann et al., 2002).

Considerando as condições experimentais adotadas, concluiu-se que a adição de captopril ao meio de MIV de oócitos bovinos não influencia a maturação dos embriões, como evidenciado pelas porcentagens similares da maturação oocitária *in vitro*.

Bibliografia

- Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide systemin bovine mature follicles *in vitro*: Effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol Reprod*, v.61, p.1419-1425, 1999.
- Barreta MH, Oliveira JFC, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, Gonçalves PBD. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2 α . *Reproduction*, v. 136, n. 6, p. 733-740, 2008.
- Brunswig-Spickenheier, B.; Mukhopadhyay, A. K. Characterization of angiotensin-II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. *Endocrinology*, v. 131, n. 3, p. 1445-1452, 1992.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruij TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v.57, p.5-20, 2002.
- Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, v.67, p.6-15, 2007.
- Giometti IC, Bertagnoli AC, Ornes RC, da Costa LF, Carambula SF, Reis AM, de Oliveira JF, Emanuelli IP, Gonçalves PB. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, v.63, p.1014-1025, 2005.
- SAS. 2002. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.
- Sousa Júnior A. Utilização do captopril e da angiotensina II na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2014. 75p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Teresina, 2014.
- Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, Gonçalves PB. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, v.66, p.2068-2076, 2006.



O inibidor de serino protease Antipaina preserva a integridade do acrossoma de espermatozoides bovino Curraleiro Pé-Duro durante a criopreservação

The inhibitor of serine protease Antipain preserve the integrity in the acrosome of sperm bovine Curraleiro Pé-Duro for cryopreservation

Marlon de Araújo Castelo Branco^{1,*}, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho¹, Antonio de Sousa Junior², Felipe de Jesus Moraes Junior³, Luanna Soares de Melo Evangelista¹, Isolda Márcia Rocha do Nascimento², Geraldo Magela Côrtes Carvalho⁴, José Adalmir Torres de Souza¹

¹Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil; ²Colégio Técnico Agrícola (CTT), Teresina, PI, Brasil;

³Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, São Luís, MA, Brasil; ⁴EMBRAPA Meio Norte, Teresina/PI, Brasil.

*E-mail: Marlon70@gmail.com

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of different concentrations of inhibitor antipain serine protease (10 g, 50 ug and 100 ug) in supplementing the dilutive of bovine semen freezing. Thirty-six ejaculated four Curraleiro Pé-Duro cattle were used for cryopreservation. The epifluorescence microscopy was used to determine the acrosomal integrity and acrosome reaction rate was calculated after sperm were incubated for six hours heparin. Spermatozoa cryopreserved in the presence of antipain significantly increased acrosomal integrity, as they were able to complete the acrosome reaction in vitro. In conclusion, the inhibitor is antipain serine protease is able to preserve the integrity of cryopreserved sperm acrosomal cattle.

Keywords: bovine, antipain, sperm.

Palavras-chave: bovino, antipaina, espermatozoide.

Introdução

O gado bovino Pé-Duro é uma raça nativa do norte e nordeste do Brasil proveniente dos rebanhos da Península Ibérica, que foram introduzidas no Brasil durante a colonização Portuguesa no século XVI (Salles et al., 2011). A criopreservação de sêmen é parcialmente prejudicial para os espermatozoides de mamíferos, pois induz ao choque térmico e osmótico, stress oxidativo e provoca modificações na composição lipídica da membrana plasmática, tornando-a mais reativa ao seu ambiente pós-descongelamento e provoca mudanças fisiológicas semelhantes à capacitação espermática em bovinos (Miah et al., 2011), o que é conhecido como criocapacitação (Reddy et al., 2010).

As enzimas da família das serino proteases possuem essa nomenclatura devido à presença do resíduo serina no sítio ativo da enzima, é a maior família de proteases, com base no conhecimento atual, envolvida no processo de fertilização dos gametas de mamíferos (Yanagimachi, 1994). Um papel tem sido proposto para a atividade das serino proteases na regulação da penetração do espermatozoide em oócitos de bovinos, mediada pela libertação do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) do oócito e ativação de plasminogênio em plasma da protease da serina (Rekkas et al., 2002).

O objetivo deste experimento foi verificar o efeito do inibidor de serino protease Antipaina na criopreservação espermática de bovinos Curraleiro Pé-Duro, sobre importantes parâmetros de qualidade espermática: Integridade acrossomal e taxa de reação acrossômica (TRA).

Material e Métodos

Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé Duro, provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Durante o experimento, os touros foram mantidos sob regime extensivo, com acesso a piquetes de capim-mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim milhã (*Digitaria sanguinalis*), água e sal mineral à vontade. As coletadas de sêmen foram feitas uma vez por semana, durante nove semanas, com o auxílio de um eletro estimulador controlado automaticamente (Biocon[®] Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Imediatamente após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37°C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume, turbilhonamento, motilidade total e vigor, em microscópio de contraste de fase. Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade total $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados nesse estudo. Quando aprovadas, amostras dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um *pool*, logo após a formação do *pool*, este foi dividido em quatro alíquotas e diluídas em meio Tris-Gema (37°C) contendo Antipaina (10 μg , 50 μg e 100 μg), enquanto que uma alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,5mL (50 $\times 10^6$ espermatozoides viáveis por palheta) e congelado em máquina TK 3000[®] na curva de congelamento rápida (-0,25° C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C) e, após atingir -120°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico. Após 30 dias de armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30

segundos e avaliadas quanto à integridade do acrossoma, utilizando a sonda fluorescente FITC-PNA e ao teste de indução da reação acrossômica, no qual foi realizado adicionando 100 mg de heparina as amostras de sêmen e mantidas em estufa (Revco) a 39°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Nos intervalos (0 e 6 horas), sub-amostras foram tiradas e destinadas às colorações com FITC-PNA. A taxa de reação acrossômica (%RA) foi calculada com a seguinte fórmula: (porcentagem de espermatozoides que sofreram reação acrossômica após 6 horas de estimulação - porcentagem ao 0 minuto) / (100% - porcentagem ao 0 minuto) × 100 (Murase et al., 2001). O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro tratamentos: controle, Antipaina(10), Antipaina(50) e Antipaina(100) em nove coletas. Para comparação de média foi utilizado o teste paramétrico de Student-Newman-Keuls (SNK), na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

Resultados e Discussões

A integridade acrossomal dos espermatozoides foi influenciada pela criopreservação com diferentes concentrações do inibidor de serino protease Antipaina quando comparado com o respectivo grupo controle (Fig. 1). Na presença de Antipaina (10 µg, 50 µg e 100 µg), a porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto foi maior em relação ao controle ($P < 0,05$). Não houve diferença estatística na taxa de reação acrossômica (Fig. 2) dos tratamentos em relação ao controle. Quando comparados entre os tratamentos, o tratamento Antipaina 10 µg obteve uma maior taxa de reação acrossômica em relação à Antipaina 100 µg ($P < 0,05$).

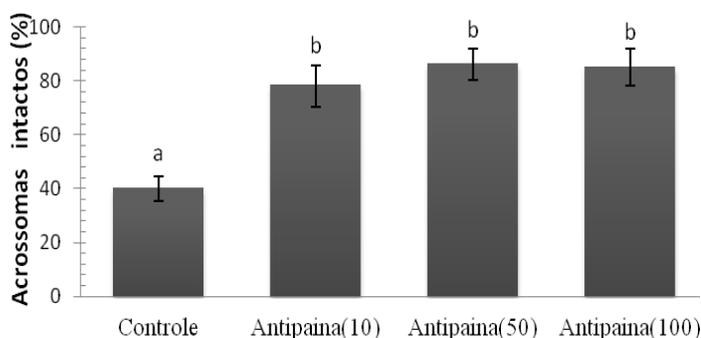


Figura 1. Integridade do acrossoma pós-descongelamento de sêmen bovino Curraleiro Pé-Duro criopreservado em diferentes concentrações do inibidor de serino protease Antipaina (10, 50 e 100 µg). Diferentes letras na coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

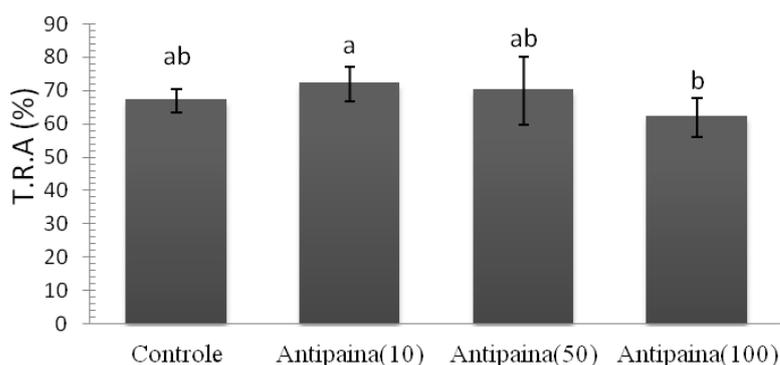


Figura 2. Taxa de reação acrossômica pós-descongelamento (T.R.A) de sêmen bovino Curraleiro Pé-Duro criopreservado em diferentes concentrações do inibidor de serino protease Antipaina (10, 50 e 100 µg). Diferentes letras na coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A melhoria da integridade acrossomal de espermatozoides criopreservados com Antipaina pode ter acontecido devido ao efeito inibitório da tripsina sobre a adenil ciclase, iniciando os mecanismos envolvidos com a capacitação espermática (Okamura et al., 1990). Espermatozoides que sofrem reação acrossômica são capazes de penetrar a zona pelúcida (ZP) e a exocitose do conteúdo acrosomal é um pré-requisito para a fertilização bem sucedida (Yanagimachi et al., 1994).

Estudos anteriores, demonstraram a interferência negativa dos inibidores de serino protease na reação acrossômica durante a fertilização *in vitro* de bovinos (Deppe et al., 2008), fato não evidenciado na presente pesquisa. Por isso, consideramos importante o fato da Antipaina ter protegido o acrossoma e não ter sido capaz de inibir a reação acrossômica, sendo ideal para ser utilizado no processo de fertilização *in vitro* de bovinos.



Conclusões

A suplementação do inibidor de serino protease Antipaina, na criopreservação do sêmen bovino, preserva a integridade do acrossoma, sem afetar a reação do acrossoma *in vitro* pós-descongelamento.

Referências

- Deppe M, Morales P, Sanchez R.** Effect of protease inhibitors on the acrosome reaction and sperm-zona pellucida binding in bovine sperm. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.713-9, 2008.
- Miah AG, Salma U, Sinha PB, Hölker M, Tesfaye D, Cinar M U, Tsujii H, Schellander K.** Intracellular signaling cascades induced by relaxin in the stimulation of capacitation and acrosome reaction in fresh and frozenthawed bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.125, p.30-41, 2011.
- Murase T, Mukohjima K, Sakaguchi S.** Characterization of frozen-thawed Japanese black bull spermatozoa by standard semen analysis, muçus penetration test and the ability to undergo the acrosome reaction in response to calcium and the calcium ionophore A23187. *J Reprod Dev*, v.47, p.237-243, 2001.
- Okamura N, Onoe S, Kawakura K, Tajima Y, Sugita Y.** Effects of a membrane bound trypsin-like proteinase and seminal proteinase inhibitors on the bicarbonate-sensitive adenylate cyclase in porcine sperm plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, v.1035, p.83-89, 1990.
- Reddy NSS, Jagan MG, Atreja SK.** Effects of adding taurine and trehalose to a tris- based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.119, p.183-190, 2010.
- Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V, Vainas E, Brem G.** Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, v.57, p.1897-1905, 2002.
- Salles PA, Medeiros GR, Costa RG, Ramos CT, Coutinho B, Almeida JB, Rocha MJO, Rocha L, Mathias WL.** Programa de conservação e melhoramento de uma raça bovina brasileira: Curraleiro Pé-Duro. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, v.18, p.453-456, 2011.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction*, 3.ed. New York: Raven Press Ltd; 1994: p.189-317.



Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em bovinos da Fazenda Escola de Alvorada do Gurguéia-Piauí

Serch for anti-leptospira agglutinins in bovines from the Alvorada do Gurguéia Farm School-Piaui

Dianna Soares do Bomfim¹*, Janara Laís Xavier Bispo Mendes¹, Fernando Maciel de Carvalho¹, Bernardo Guedes Paiva¹, Irlana Maria da Silva Cunha¹, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro², Vanessa Castro³, Larissa Maria Feitosa Gonçalves¹

¹Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Curso de Medicina Veterinária; ²Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias;

³Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

*E-mail: dianasoaresd1@gmail.com

Abstract

This study aimed to search for anti-leptospira agglutinins in cattle from the Alvorada do Gurguéia Farm School, in the state of Piaui. Blood samples were collected from sixty-five bovines from various ages and both sexes. The sorum was obtained by centrifugation of samples and sent to the Laboratory of Phisiopathology of Animal Reproduction, located at the Campus Ministro Petrônio Portela, in Teresina – PI, where the serological diagnosis was conducted through the microscopic agglutination test by using a colletion of serovars. None of the samples were found reactive to any of the serovars used, what shows that bovine leptospirosis is not present at the area studied.

Keywords: rebanho, leptospirose, diagnóstico.

Palavras-chave: rebanho, leptospirose, diagnosis.

Introdução

A leptospirose é uma zoonose causada pela infecção de diferentes sorovares de bactérias do gênero *Leptospira spp.* (Coelho et al., 2014), espiroquetas flageladas que podem permanecer por longos períodos em água parada ou em solos úmidos (Mims et al., 1999; Melo e Manhoso, 2007). Os sorovares patogênicos causadores de infecções no homem e nos animais domésticos pertencem a espécie *Leptospira interrogans*. A partir de 2007 as espécies passaram a ser separadas, baseadas em seu genoma e cada espécie possui uma diversidade de sorovares, que são as unidades taxonômicas básicas de classificação, identificados por meio de sorologia (Quinn et al., 2005; Machry et al., 2010; Melo et al., 2010; Rolim et al., 2012).

Cada sorovariabilidade da bactéria tem uma espécie hospedeira de manutenção, na qual geralmente provocam uma doença moderada. Neste caso o hospedeiro libera a bactéria no ambiente por um período longo e variado. Essas mesmas sorovariabilidades, no entanto, podem ter também hospedeiros acidentais, nos quais provocam doença mais grave (Quinn et al., 2005). Os reservatórios domésticos mais importantes são os caprinos, ovinos, suínos, caninos e bovinos (Simões et al., 2016). Estes últimos são os hospedeiros de manutenção do sorovar hardjo (Chiareli et al., 2012), mas podem também ser infectados acidentalmente pelos sorovares pomona, canicola, mitis, sejroe, hebdomadis, australis, grippotyphosa e icterohemorrhagiae (Radostiis et al., 2002). A transmissão dentro dos rebanhos, principalmente do sorovar hardjo, acontece através de animais infectados, com ou sem sintomatologia clínica da doença que eliminam as leptospirosas por meio da urina e de restos de aborto e placenta, permanecendo as bactérias por período variável no solo e infectando os animais. A monta natural, bem como outros tecidos de animais infectados são fontes potenciais de transmissão (Pires, 2010).

A infecção nas variadas espécies domésticas pode ocorrer de forma direta ou indireta. No primeiro caso, quando se tem contato com a urina contaminada dos animais doentes e na forma indireta, por alimentos e água contaminada (Ettinger et al., 1992; Quinn et al., 2005). A bactéria pode penetrar pelas mucosas e pele lesada, ou ainda pela pele íntegra (Juliano et al., 2000). Penetram no organismo, ganham a corrente sanguínea, seguindo para o trato genital, fígado e rins, onde se multiplicam. As bactérias instaladas nos rins não são destruídas pelo sistema de defesa e são eliminadas na urina. O sorovar hardjo pode permanecer por meses instalado no sistema reprodutor de machos e fêmeas bovinas desencadeando uma série de problemas reprodutivos (Pires, 2010).

A leptospirose tem grande importância nos rebanhos bovinos, visto os problemas reprodutivos e produtivos que ocasiona (Peiter et al., 2015), levando a perdas na reprodução com ocorrência de abortamentos e natimortalidade além da diminuição produtiva de leite (Mineiro et al., 2010), retenção de placenta e nascimento de animais fracos (Junqueira e Alfieri, 2006). Assim, este trabalho objetivou pesquisar a presença de aglutininas anti-leptospirosas em rebanho bovino da Fazenda Escola de Alvorada do Gurguéia-Piauí, que pertence a Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE) de Bom Jesus-Piauí.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras sanguíneas para obtenção de soro de 65 (sessenta e cinco) bovinos, de ambos os sexos, idades variadas e sem sinais clínicos da infecção. Após centrifugação das amostras e obtenção do soro este foi enviado ao Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, em Teresina- PI, onde foi realizado o diagnóstico sorológico pela prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM).



Resultados e Discussão

Das 65 amostras analisadas nenhuma foi reagente a qualquer um dos sorovares utilizados no teste diagnóstico. Resultado diferente deste foi encontrado por Mineiro et al. (2010), onde 83,33% (15/18) das fêmeas bovinas de um rebanho em Buriti dos Lopes- Piauí, apresentaram aglutininas anti-leptospira, predominantemente o sorovar hardjo. Ressalta-se que no rebanho da Fazenda Escola, objeto deste estudo, os animais não apresentavam qualquer problema reprodutivo, diferente daquele onde havia histórico de aborto e infertilidade. Assim também Coelho et al. (2014), encontraram bovinos reagentes, com predominância do sorovar hardjo, analisando amostras de animais abatidos em frigoríficos de São Luís- MA. No Paraná, Hashimoto et al. (2012), observaram que alguns fatores estariam associados a maior chance de ocorrência da leptospirose nas propriedades, tais como o aluguel de pastos onde a bactéria pode estar sendo disseminada, a compra de reprodutores que pode favorecer a introdução de animais infectados, a utilização de piquetes de parição onde os animais teriam mais chance de se contaminar com restos de parto ou aborto, e a presença de equinos que poderia favorecer a disseminação do sorovar hardjo. Todos esses fatores estão ausentes na propriedade estudada o que ajuda a explicar a ausência de animais reagentes. As leptospirosas tem a capacidade de permanecer em ambientes com solos úmidos ou com acúmulo de água (Quinn et al., 2005), uma situação que não ocorre na propriedade estudada visto a ausência de áreas alagadiças ou outra condição semelhante. Também não resistem a altas temperaturas e solos secos (Pires, 2010) que são condições constantes em nossa região e, portanto, não favoreceriam a manutenção da bactéria no ambiente.

Conclusão

Conclui-se que não foram encontradas aglutininas anti-leptospira no rebanho bovino estudado, demonstrando que a leptospirose não está presente na propriedade.

Referências

- Coelho ELM, Chaves NST, Sá JC, Melo SA, Silva ALA.** Prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís, MA. *Rev Bras Med Vet*, v.36, p.111-115, 2014.
- Chiareli D, Cosate MRV, Moreira EC, Leite RC, Lobato FCF, Silva JA, Teixeira JFB, Marcelino AP.** Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. *Pesq Vet Bras*, v.32, p.633-639, 2012.
- Ettinger SJ.** Tratado de Medicina Interna Veterinária. Editora Manole. 3ª edição. 1992. 4v.
- Hashimoto VY Dias JA Spohr KAH Silva MCP Andrade MGB Muller EE Freitas JC.** Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. *Pesq Vet Bras*, v.32, p.99-105, 2012.
- Juliano RS, Chaves NSTC, Santos CA, Ramos LS, Santos HQ, Meireles LR, Gottschalk S, Filho RACC.** Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia-GO. *Ciência Rural*, v.30, p.857-862, 2000.
- Junqueira JRC, Alfieri AA.** Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 27, n.2, p. 289-298, 2006.
- Marchry L, Ribeiro RL, Vital-Brasil JM, Balassiano IT, Oliveira ICM, Avelar KES, Pereira MM.** Caracterização de cepas de referência de leptospira spp. utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.43, p.166-169, 2010.
- Mello LPP, Manhoso FFR.** Aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil. *Unimar Ciências*, v.16, p.29-32, 2007.
- Melo LSS, Castro MB, Leite RC, Moreira EC, Melo CB.** Principais aspectos da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos. *Ciência Rural*, v.40, p.1235-1241, 2010.
- Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R.** Microbiologia Médica. Editora Manole. 2ª edição. 1999. 584p.
- Mineiro ALBB, Vieira RJ, Feitosa LCS, Bezerra EEA, Costa FAL.** Pesquisa de sorovares de leptospirosas em rebanho bovino leiteiro no estado do Piauí, Brasil. *Arq Inst Biol, São Paulo*, v.77, p.129-132, 2010.
- Pires AV.** Bovinocultura de corte. Editora FEALQ. v.2, 1510p, 2010.
- Peiter M, Rocha JFX, Pivoto FL, Aires AR, Rocha RX, Bragança JFM, Ferreira AGT, Leal MLR.** Prevalência sorológica de *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros na microrregião de Francisco Beltrão. *Veterinária e Zootecnia*, v.22, p.392-395, 2015.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC.** Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Editora Artmed. 2005. 511p.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW.** Clínica Veterinária: Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Editora Guanabara Koogan. 9ª edição. 2002. 1737p.
- Rolim MBQ, Silva VCL, Santana VLA, Souza MA, Harrop MHV, Mota RA, Oliveira MAL, Moura APBL, Lima PF.** Leptospirose em bovinos: revisão. *Medicina Veterinária*, v.6, p.26-31, 2012.
- Simões LS, Sasahara THC, Favaron PO, Miglino MA.** Leptospirose – Revisão. *Pubvet*, v.10, p.138-146, 2016.



Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* em bovinos da Fazenda Escola de Alvorada do Gurguéia-Piauí

Search for antibodies to Brucella abortus in bovines from the Alvorada do Gurguéia - Piauí Farm School

Dianna Soares do Bomfim^{1,*}, Fernando Maciel de Carvalho¹, Janara Laís Xavier Bispo Mendes¹, Bernardo Guedes Paiva¹, Irlana Maria da Silva Cunha¹, Sávio de Almeida Louzeiro¹, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro², Larissa Maria Feitosa Gonçalves¹

¹Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina Veterinária, Teresina, PI, Brasil; ²Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: dianasoaresd1@gmail.com

Abstract

Bovine brucellosis, which is caused by Brucella abortus, is characterized for causing reproductive losses. This study aimed to search for antibodies to Brucella abortus in cattle at the Alvorada do Gurguéia Farm School, in the state of Piauí, Brazil. Blood samples were collected from sixty five animals either male or female and from various ages. After serum was obtained by centrifugation of samples, it was sent to the Laboratory of Physiopathology of Animal Reproduction, located at the Campus Ministro Petrônio Portela, in Teresina – PI. There, it was conducted the serological diagnosis through the agglutination test by using the buffered acidified plate antigen (BAPA). All samples were found nonreactive to the test, which was possibly caused by the absence of some factors that would favor the occurrence of brucellosis in the farm area. Thus, the results show that bovine brucellosis is not present in the cattle of the studied area.

Keywords: brucellosis, reproductive, cattle.

Palavras-chave: brucelose, reprodutivo, rebanho.

Introdução

A Brucelose é uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Brucella*, que pode acometer várias espécies de animais domésticos e, devido seu caráter zoonótico, também o homem (Brasil, 2006). No Brasil a doença apresenta uma distribuição geográfica variável em função das características de cada região (Pires, 2010), mas todos os estados brasileiros já notificaram algum caso de brucelose (Paulin e Ferreira Neto, 2002).

As várias espécies de *Brucella* tem seus hospedeiros específicos, porém algumas delas podem infectar também hospedeiros não convencionais. As espécies conhecidas são *B. melitenses*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* que tem como hospedeiros os caprinos/ovinos, suínos, ovinos, caninos e ratos do deserto, respectivamente (Quinn et al., 2005). No caso dos bovinos a *Brucella abortus* é a espécie que apresenta maior importância e geralmente é introduzida no rebanho através de animais assintomáticos ou cronicamente infectados (Brasil, 2006; Pires, 2010).

Os animais infectados podem eliminar as bactérias através da urina, leite (Andrews et al., 1998), fluídos e anexos fetais liberados por ocasião do parto ou aborto, e ainda pelo sêmen de touros infectados (Brasil, 2006). Os prejuízos econômicos causados pela doença decorrem da diminuição do desempenho dos animais, com queda da produção leiteira, abortos e queda de fertilidade nas fêmeas, além dos prejuízos também para os machos que podem apresentar degeneração testicular (Quinn et al., 2005; Pires, 2010).

A infecção humana geralmente ocorre em pessoas que tem maior contato com os animais, nos chamados “grupos de risco” compostos por veterinários, tratadores e trabalhadores ligados a frigoríficos, bem como pessoas que habitam locais em condições precárias de saneamento e que consomem produtos de origem animal com qualidade não garantida (Pires, 2010).

A brucelose bovina causa um grande impacto na pecuária nacional, sendo também importante para a saúde pública. Diante do exposto, e devido a ausência de dados sobre a doença na propriedade estudada, objetivou-se com este trabalho pesquisar a presença de anticorpos anti-*Brucella abortus* no rebanho bovino da Fazenda Escola de Alvorada do Gurguéia- PI, que pertence a Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE) de Bom Jesus-PI.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras sanguíneas para obtenção de soro de 65 bovinos, de ambos os sexos e idades variadas, sem sintomatologia clínica da enfermidade. O sangue foi coletado da veia jugular, com seringas descartáveis estéreis e transferidos para tubos sem anticoagulante. O soro foi obtido por meio de centrifugação das amostras no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE) em Bom Jesus-PI. O diagnóstico sorológico para detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus* foi realizado pelo Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela em Teresina- PI, por meio do Teste



de Soro Aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). A técnica consistiu em colocar 30 μ L de cada amostra de soro sobre uma placa de vidro (placa de Huddlesson), adicionar 30 μ L do **á**gteno ao lado da amostra e mistura-los em movimentos circulatorios de modo a obter um pequeno círculo. A placa foi agitada em movimentos circulatorios por quatro minutos e a leitura do resultado realizada em caixa com luz indireta. Na interpretação dos resultados considerou-se formação de grumos ou ausência destes para soro reagente e soro não-reagente respectivamente.

Resultados e Discussão

Das 65 amostras analisadas nenhuma foi reagente ao Teste de Soro Aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado.

Algumas “situações” são consideradas como agravantes para que a doença ocorra no rebanho, são os chamados “fatores de risco”. A ocorrência ou não destes em uma determinada propriedade pode ser analisada de forma que permita compreender a existência ou não de animais reagentes naquele local. O tráfego de animais entre propriedades, por exemplo, é um fator de risco considerável (Brasil, 2006), pois a exigência do resultado sorológico negativo para brucelose, na ocasião da introdução de um novo animal, nem sempre é praticada pelos criadores e isso possibilita a entrada de animais infectados no rebanho. O sêmen dos reprodutores também se torna uma fonte potencial de infecção quando usado em inseminação artificial (Radostits et al., 2002). Assim a compra de reprodutores é um dos fatores de risco encontrado em várias propriedades onde a infecção está presente (Dias et al., 2009). Na propriedade avaliada não existe trânsito de animais, tampouco a aquisição de reprodutores, visto que o rebanho completo foi adquirido há cerca de cinco anos e não foram introduzidos novos animais.

Uma forma de infecção para os animais é por intermédio de pastagens contaminadas por animais doentes que ali passaram anteriormente. Assim, o aluguel de pastos (Klein-Gunnewiek et al., 2009) se constitui um fator de risco considerado importante na epidemiologia da doença. Assim também considerado importante é o número de pessoas que manejam os animais, pois Leite et al. (2014) observaram que o manejo quando realizado por um único funcionário serve como uma forma preventiva eficaz. A explicação seria o papel do homem como possível veiculador mecânico do agente etiológico, uma espécie de fômite. Estes dois fatores também estão ausentes na fazenda escola avaliada, onde não é realizado o aluguel de pastos pois no período de escassez de alimentos os animais ficam em pastagem nativa dentro da propriedade. E no caso do manejo diário, este é realizado por apenas dois funcionários, contribuindo também para a não disseminação da doença na propriedade.

Os “fatores de risco” supracitados referem-se a condições ou situações que facilitaríamos a ocorrência da doença no animal ou propriedade. Por ser um rebanho que pertence a uma instituição de ensino, os animais avaliados nesta pesquisa tendem, mesmo que teoricamente, a fugir do perfil da grande maioria dos rebanhos das propriedades comuns e assim as condições que se observa em outras propriedades estão ausentes neste trabalho, explicando o resultado encontrado.

Conclusão

Não foram encontrados anticorpos anti-*Brucella abortus*, demonstrando que a doença não está presente no rebanho bovino da Fazenda Escola da Universidade Federal do Piauí, localizada em Alvorada do Gurguéia-PI.

Referências

- Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG.** Medicina Bovina: Doenças e criação de bovinos. Editora Roca. 2ª edição.1998. 1067p.
- Brasil.** Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual técnico. Brasília, 2006. 192p.
- Dias RA, Gonçalves VSP, Figueiredo VCF, Lôbo JR, Lima ZMB, Paulin LMS, Gunnewiek MFK, Amaku M, Neto JSF, Ferreira F.** Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de São Paulo. Arq Bras Med Vet Zootec, v.61, supl.1, p.118-125, 2009.
- Klein-Gunnewiek MFC, Amaku M, Dias RA, Ferreira F, Gitti CB, Pereira LA, Figueiredo VCF, Lobo JR, Gonçalves VSP, Ferreira Neto JS.** Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Rio de Janeiro. Arq Bras Med Vet Zootec, v.61, supl.1, p.77-84, 2009.
- Leite AI, Coelho WAC, Silva GCP, Santos RF, Mathias LA, Dutra IS.** Prevalência e fatores de risco para brucelose suína em Mossoró-RN. Pesq Vet Bras, v.34, p.537-541, 2014.
- Paulin LM, Ferreira Neto JS.** A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. Arq Instit Biol, São Paulo, v.69, p.105-112, 2002.
- Pires AV.** Bovinocultura de corte. Editora FEALQ. vol. 2, 2010. 1510p.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC.** Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Editora Artmed. 2005. 511p.
- Radostits OM, GAY CC, Blood DC, Hinchcliff KW.** Clínica Veterinária: Um tratado de doenças de bovinos ovinos suínos caprinos e equinos. Editora Guanabara Koogan. 9ª edição. 2002. 1737p.



Prevalência de anticorpos anti-Vírus da Diarréia Viral Bovina em bovinos da microrregião de Teresina, Estado do Piauí, Brasil

Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus antibodies in cattle of the microregion of Teresina, Piauí State, Brazil

Priscyla Silva Lucena¹*, Francisco Felipe Ferreira Soares¹, Misael Das Virgens Santana¹, Júlia Caroline Paz dos Santos¹, Alcir Martins Pereira¹, Ana Lys Barradas Mineiro², Francisco Solano Feitosa Junior², Taciana Galba da Silva Tenório²

¹Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Brasil; ²Professor doutor adjunto da Universidade Federal do Piauí, Brasil.

*E-mail: priscyllalucena@hotmail.com

Abstract

One of the most important diseases and therefore worth mentioning in cutting cattle and milk for causing great productive and reproductive losses and bovine viral diarrhoea, infectious disease caused by the Flaviviridae family of viruses and pestiviruses. This is called Viral Diarrhoea Virus Bovina (BVDV). Animals affected by this disease are pathological changes in digestive, reproductive, respiratory, hematopoietic, and may develop mucosal disease and severe immunosuppression. As a result of this work was to study the prevalence of anti-virus bovine viral diarrhoea antibodies in cattle the Microregion of Teresina, state of Piauí, Brazil.

Keywords: Bovine Viral Diarrhoea, virus neutralization, serology.

Introdução

A bovinocultura é uma atividade em efetiva expansão, no país. O estado do Piauí possui um efetivo bovino de aproximadamente 1.667.456 cabeças, ganhando destaque de quinto maior produtor de rebanhos bovinos do Nordeste. IBGE et.al (2014). Uma das enfermidades mais importantes e, portanto que merece destaque na bovinocultura de corte e de leite por causar grandes perdas produtivas e reprodutivas e a Diarréia Viral Bovina, doença infecciosa provocada por vírus da família *Flaviviridae* e Gênero Pestivirus, este chamado de Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). O vírus é considerado um dos principais patógenos de bovinos que acarreta perdas econômicas significativas nas explorações bovina de corte e leite. Apesar de produzir, no hospedeiro, diversos efeitos deletérios nos diferentes sistemas do organismo, as perdas reprodutivas são notadamente, as mais evidentes (Grooms, 2004).

Tradicionalmente, as manifestações da infecção pelo BVDV são apresentadas em três categorias: infecção pós-natal ou BVD, infecção fetal e doença das mucosas (Bielefeld e Tohmann, 1995; Potgieter, 2004). Em vista disso o objetivo desse trabalho foi estudar a prevalência de anticorpos anti-Vírus Diarréia Viral Bovina em rebanhos bovinos da Microrregião de Teresina-PI.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em 14 unidades produtoras de bovinos nos municípios da microrregião de Teresina, localizada na mesorregião Centro Norte Piauiense do Estado do Piauí. São estes os municípios de Altos, Beneditinos, Demerval Lobão, José de Freitas, Lagoa Alegre, Lagoa do Piauí, Miguel Leão, Monsenhor Gil, Nazária, Pau D'Arco, União, Currálinhos e Teresina

Sendo que em todas as propriedades foram realizados inquéritos epidemiológicos com o objetivo de caracterizar os sistemas de criação dos rebanhos avaliados. As unidades produtoras de bovinos foram escolhidas por conveniência, sendo os rebanhos constituídos em sua grande maioria por animais mestiços, resultantes do cruzamento de Holandês com Zebuino.

Para a realização dos exames diagnósticos, amostras de soro sanguíneo bovino foram utilizadas neste projeto, oriundas de algumas propriedades rurais da Mesorregião do Centro Norte do Estado do Piauí. As propriedades rurais foram pré-estabelecidas e selecionadas de acordo com contatos prévio com os proprietários.

Foi realizado exame clínico dos bovinos a campo e a coleta de sangue destes animais por punção da veia jugular ou coccígea, o sangue após coletado, em seguida coagulado, sendo mantido a temperatura ambiente. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 G por 10 minutos e os soros obtidos serão acondicionados em microtubos tipo *ependorff*, separados em três alíquotas de 1,0 mL e estocados a -20°C, em freezer. As amostras do soro sanguíneo, foram separadas para serem enviadas e posteriormente processadas no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, foi realizado o teste sorológico de soroneutralização (SN).

Os resultados foram analisados através da estatística descritiva por meio de dispersão de frequências absoluta e relativa (Sampaio, 2007).

Resultados e Discussão

Foram analisadas um total de 420 amostras de soro sanguíneo de bovinos e verificou-se oscilações nos



percentuais de animais reagentes nos diferentes municípios estudados e alguns municípios como: Demerval Lobão, Miguel Leão, Altos e Curralinhos não apresentaram animais reagentes para BVDV. Os resultados obtidos com a aplicação dos questionários epidemiológicos nas propriedades estudadas, durante a coleta das amostras para realização desta pesquisa, assim como, a distribuição da frequência de animais reagentes e não reagentes conforme os aspectos relacionados aos fatores de risco que possivelmente estejam associados à soro reatividade para o BVDV em rebanhos bovinos dos diferentes municípios da Microrregião de Teresina no Estado do Piauí.

A prevalência da infecção pelo BVDV para as amostras examinadas foi de 25,2% (106/420) de animais reagentes e 74,8% (314/420) não reagentes, distribuídos em 100% (14/14) dos rebanhos estudados, conforme demonstrados em (Tab. 1), que enfatiza o número percentual de bovinos reagentes e não reagentes do total de amostras.

Tabela 1. Resultados obtidos da Diarreia Viral Bovina em rebanhos da Microrregião de Teresina no Estado do Piauí. Teresina – 2016.

Sorologia (RIFI)	Número de Animais	Frequência Relativa (%)
Reagentes	106	25,2%
Não Reagentes	314	74,8%
TOTAL	420	100

VN: Vírus Neutralização

Os resultados obtidos, com a realização da técnica de Vírus Neutralização para pesquisa de anticorpos anti-BVDV, em 14 rebanhos bovinos mestiços de cruzamento entre raças taurinas e raças zebuínas procedentes dos municípios de Altos, Beneditinos 13,3%(4/26), Demerval Lobão, José de Freitas 56,7%(17/13), Lagoa Alegre 6,7%(2/28), Lagoa do Piauí 16,7%(5/25), Miguel Leão, Monsenhor Gil 26,7%(8/22), Nazária 86,7%(26/4), Pau D' Arco 3,3%(1/29), Coivaras 13,3%(4/26), Teresina 10%(3/27), União 90%(27/3) e Curralinhos, pertencentes à Microrregião de Teresina, Mesorregião Centro – Norte Piauiense do Estado do Piauí.

O estudo dos fatores de risco possibilitará associar aspectos relacionados ao manejo nutricional, sanitário e reprodutivo com a propagação da infecção pelo BVDV nos rebanhos avaliados, desta maneira fortalecendo as medidas de prevenção e controle da Diarreia Viral Bovina dentro das propriedades, impedindo o alastramento do Vírus da Diarreia Viral Bovina nos animais do Estado do Piauí.

Diante dos estudos de Quincozes et al., (2007) e por Frandolozo et al., (2008) realizados, no estado do Rio Grande do Sul; em estudos epidemiológicos na região de Goiás e também com estudos de soro prevalência realizados com bovinos adultos por Samara et al., (2004) onde todos eles afirmam que a maioria dos animais analisados apontam soro reatividade contra o BVDV, é possível inferir que a prevalência da Diarreia Viral Bovina rebanho da Microrregião de Teresina no Estado do Piauí está um pouco abaixo do esperado, quando comparado a prevalência dos demais estados e regiões deste país.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o Vírus da Diarreia Viral Bovina está presente na população de bovinos da microrregião de Teresina, possivelmente esses resultados se deve a falhas de manejo, e a procedência dos bezerros comprados, é necessário implementar medidas sanitárias, evitando assim a disseminação do vírus e o avanço epidemiológico da Diarreia Viral Bovina e perdas na cadeia produtiva da bovinocultura piauiense, bem como a realização de novos estudos para um melhor conhecimento epidemiológico desta enfermidade.

Referências

- Baker JC.** Bovine viral diarrhea virus: A review. *J Am Vet Med Assoc*, p.1449-1458, 1987.
- Bielefeldt-Ohmann H.** The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection: A window on the pathogenesis. In: *Bovine Viral Diarrhea Virus*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, p.447-476, 1995.
- Figueiredo HCP, Vieira PR, Lage AP, Leite RC.** Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia bovina a vírus em Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.11-15, 1997.
- Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehle PM, Alfieri AA, Pítuco EM.** A infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq Vet Bras*, v.25, p.125-134, 2005.
- Guimaraes PLSN, Chaves NST, Silva LAF.** Acypreste, C.S. Frequência de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina em bovinos do Entorno de Goiânia, em regime de criação semi-extensivo. *Ciênc Anim Bras*, p.137-142, 2000.
- Oliveira EAS.** Caracterização antigênica de amostras de vírus da diarreia viral bovina com anticorpos monoclonais. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre. 65p, 1996.
- Samara SI, Dias FC, Moreira SPG.** Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.41, p.396-403, 2004.



Prevalência de hipoplasia testicular em touros de elite Nelore em uma fazenda no nordeste do Pará

Prevalence of testicular hypoplasia in Nelore elite bulls at a farm from northeast Pará

Fabício Reis Amador*, Luis Américo Lucas Barbosa, Ramon Barros da Cunha, Arthur Flavio Pardaul Lobato Tavares, Anelise Sanches Ramos, Gustavo Alighiere Lopes da Silva, Sebastião Tavares Rolim Filho, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

*E-mail: fra.veterinario@gmail.com

Abstract

We determined the prevalence of Nelore elite bulls able to reproduce in a property in northeast Pará, through clinical andrological exam of 17 bulls. This total, 15/17 (88.2%) were eligible as fit. However, 2/17 (11.76%) animals showed marked testicular asymmetry (unfit). In the semen of the unfit, wasn't difference in mean lower sperm defects ($11.25 \pm 5.70\%$) and total sperm pathologies ($15.37 \pm 7.12\%$) compared to suitable animals, whose averages were $2.66 \pm 1.18\%$ of minor defects and $5.40 \pm 1.88\%$ of total diseases. The averages of progressive motility ($73.33 \pm 6.18\%$), concentration ($1.25 \pm 0,82 \times 10^9 \text{mL}$) and higher sperm defects ($2.70 \pm 1.42\%$) of elected, did not differ statistically from the unfit. The two animals with testicular hypoplasia were diagnosed by histopathologic exam. The results were satisfactory, however the occurrence of testicular hypoplasia still persists in the region, being an aggravating future for female fertility.

Keywords: Nelore, fertility, hypoplasia.

Palavras-chave: Hipoplasia, nelore, fertilidade.

Introdução

Estudos realizados no Brasil, envolvendo número expressivo de touros que estavam sendo utilizados em monta natural em diversos Estados da Federação, indicaram haver mais de 53% deles com problemas de fertilidade. Segundo os autores, os fatores de meio ambientes desfavoráveis e o manejo indesejável constituíram as principais causas de baixa fertilidade para touros destinados como reprodutores em condições de Brasil Central. Assim, cuidadosos exames clínicos, sanitários e andrológicos são imprescindíveis para animais a serem usados como reprodutores, além de melhores critérios de seleção genotípica e melhor manejo (Barbosa, 2003).

O Objetivo foi verificar a prevalência de touros nelore de elite aptos a reprodução em uma fazenda no município de Maracanã, Estado do Pará.

Material e Métodos

O estudo foi realizado em uma fazenda no município de Maracanã, nordeste paraense, distante cerca de 160 km da capital do Estado, aonde se examinaram 17 touros de elite da raça nelore com idade entre 21 a 47 meses criados em sistema intensivo.

Foi realizada avaliação física do sêmen quanto ao volume (mL), cor, concentração ($\times 10^9$ spz/mL), turbilhonamento (0-5), motilidade progressiva (%), vigor (0-5) e morfologia (defeitos maiores, menores e totais), seguindo padrões de avaliação de acordo com Vale (1994; 1997) e Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

Os touros inaptos à reprodução foram submetidos à orquiectomia bilateral, e fragmentos dos testículos lesionados foram fixados em formol salinos a 10% e enviados ao laboratório do Centro Nacional de Primatas, para exames histopatológicos.

Os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA e teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Dos 17 touros, 15/17 (88,2%) foram considerados aptos à reprodução. Entretanto, 2/17 (11,76%) dos animais apresentaram uma assimetria testicular acentuada, sendo considerados inaptos à reprodução e posteriormente orquiectomizados (Tabela 1).

Tabela 1. Biometria, análises físicas e espermograma de 17 touros nelores, Maracanã, Pará, Fevereiro de 2015.

Touros	N	CE (cm)	Mot (%)	Conc (10^6)	DMA (%)	DME (%)	PT(%)
Aptos	15	$31,96 \pm 2,8^a$	$73,33 \pm 6,18^a$	$422 \pm 485,1^a$	$2,7 \pm 1,42^a$	$2,66 \pm 1,18^a$	$5,4 \pm 1,88^a$
Inaptos	02	26 ± 01^b	$61,25 \pm 30,9^a$	$202,5 \pm 309,13^a$	$4,12 \pm 2,0^a$	$11,25 \pm 5,7^b$	$15,37 \pm 7,12^b$

CE: circunferência escrotal; Mot: motilidade espermática; Conc: concentração; DMA: defeitos maiores; DME; Defeitos menores; PT: patologia total.



Os animais inaptos apresentaram tamanho médio de circunferência escrotal (CE) $26,0 \pm 0,1$ cm diferindo estatisticamente dos aptos, os quais tiveram média de $31,96 \pm 2,80$ cm. No espermograma dos animais inaptos, observamos diferença estatística nas médias de defeitos menores ($11,25 \pm 5,70\%$) e de patologias totais ($15,37 \pm 7,12\%$), em comparação aos animais aptos, cujas médias foram $2,66 \pm 1,18\%$ de defeitos menores e $5,40 \pm 1,88\%$ de patologias totais. Contudo, o que chama atenção na tabela 1 são as médias de defeitos maiores (DMA), pois não houve diferença estatística entre os touros aptos em comparação aos inaptos. Segundo Costa e Silva et al. (2015), a hipoplasia leva ao aparecimento de altas percentagens de patologias espermáticas maiores.

Nas análises físicas do sêmen, as médias de motilidade progressiva ($73,33 \pm 6,18\%$), concentração ($1,25 \pm 0,82 \times 10^6$ mL) e defeitos maiores ($2,70 \pm 1,42\%$) dos animais aptos não diferiram estatisticamente dos inaptos. Provavelmente em função do tipo de hipoplasia unilateral (Costa e Silva et al., 1993).

Nos exames histopatológicos observamos pequenas quantidades de tecido testicular constituído por túbulos seminíferos, revestidos apenas por células de Sertoli, apresentando um número reduzido de células da linhagem espermatogênica. Estes túbulos estão circundados e entremeados por grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso, na coloração de gomori evidenciou-se que essas áreas estavam azuladas denotando a presença de colágeno onde há áreas de calcificação. Artérias de médio calibre apresentaram redução do lúmen por tecido fibrovascular, na coloração de gomori alguns vasos apresentavam deposição de colágeno nessas áreas. O Epidídimo mostrava lúmen vazio, desprovido de espermatozoides.

Oliveira et al. (2011), obtiveram 8/68 (11,80%) animais da raça Brangus com hipoplásica testicular, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Já o estudo de Vale Filho et al. (1980), com 344 touros *Bos Indicus* e *Bos Taurus* e seus mestiços, candidatos a doadores de sêmen, encontraram 192 transtornos reprodutivos, responsáveis por baixa fertilidade e infertilidade; segundo os autores, 22 (11,48%) casos eram de hipoplasia testicular, sendo 09 em touros europeus e 11 em touros de raças indianas. No Estado do Pará, Conceição (2006), cita a ocorrência de 2,33% (7/300) de hipoplasia testicular em touros da raça Nelore, criados extensivamente. Os autores destacam a possibilidade nos rebanhos regionais, destas patologias estejam diretamente ligadas a problemas hereditários com envolvimento genético.

Conclusão

A prevalência de hipoplasia testicular em touros nelore de elite foi considerada preocupante, pois esta é uma herança genética desfavorável a qual deve ser preterida em protocolos de melhoramento genético dos animais, para que não haja mais recorrência deste problema crônico no rebanho bovino do Estado do Pará.

Referências

- Barbosa RT.** Manejo Reprodutivo em Sistemas Intensivos de Produção de Carne. Sistemas de Produção, Versão Eletrônica; 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoSudeste/reproducao.htm>; acesso em 26/11/2015.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ªed., Belo Horizonte: CBRA, 49p,1998.
- Conceição DJS.** Estudo das principais alterações reprodutivas que causam infertilidade e subfertilidade em touros Nelores, criados no estado do Pará. 2006. 49f. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) - ISPA, Universidade Federal de Rural da Amazônia, Belém, 2006.
- Costa e Silva EV.** Avaliação andrológica de touros Nelore e aptidão reprodutiva: taxa de gestação. *Rev Bras Reprod Anim*, v.17, p.97-109, 1993.
- Costa e Silva EV, Costa Filho LCC, Souza CC, Oliveira CC, Queiroz VLD, Zúccari CESN.** Seleção de touros para a reprodução a campo: novas perspectivas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.22-31, 2015.
- Ohashi OM, Sousa JS, Ribeiro HFL, Vale WG.** Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e mestiços, criados em clima amazônico. *Pesq Vet Brás*, v.8, p.31-35. 1988.
- Oliveira LZ, Carmo AS, Lima VFMH, Lima FM, Costa MZ.** Alta incidência de hipoplasia testicular em touros Brangus-Ibagé no Estado do Mato Grosso do Sul: relato de caso. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, 051-055, 2011.
- Vale Filho VR.** Patologia do Sêmen. 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 1980, 54p.
- Vale WG.** Collection processing and deep freezing of Buffalo Semen. *Buffalo J*, v.2, p.65-81. 1994.
- Vale WG.** Sperm Cryopreservation. Third Course on Biotechnology of Reproduction In Buffaloes, Caserto, Italy. In: *Bubalus bubalis*. *Journal Buffalo Science and Technique*, suppl. 4, p.129-140, 1997.



Prevalência e fatores de risco da neosporose bovina na microrregião de Teresina-PI

Prevalence and bovine neosporosis risk factors in the micro region of Teresina - PI

Julia Caroline Paz dos Santos^{1,*}, Alcir Martins Pereira¹, Priscyla Silva Lucena¹, Adrienne Mota de Alcântara², Rinaldo Aparecido Mota², Francisco Solano Feitosa¹, Dayse Andrade Barros³, Taciana Galba da Silva Tenório¹

¹Clínica de Grandes Animais- CGA, UFPI, Teresina, PI, Brasil; ²Laboratório de bacterioses, UFRPE, Recife, PE, Brasil;

³Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal- LBRA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: julia_kroline@hotmail.com

Abstract

A biggest problem in breeding cattle are fetal and newborn losses in the herd, which cause many economic losses to producers. These losses may be related to the protozoan Neospora caninum, which causes the disease known as neosporosis. The present study was carried in 14 production units of cattle in the municipalities near from Teresina. Blood collection was performed by jugular venipuncture, using a 15 ml collection tubes without anticoagulant. For the identification of anti-N antibodies. caninum used the technique of indirect immunofluorescence (IIF) for detection of antibodies of the IgG class. The prevalence of infection by the protozoan parasite for the samples examined was 15,23% (64/420) of seropositive animals and 84,76% (356/420) seronegative, distributed in 100% (14/14) of the herds studied. Also demonstrated in this study, the occurrence of at least one animal tested positive for N. caninum, in each flock evaluated.

Key words: cattle raising, *Neospora caninum*, RIFI.

Palavras-chave: bovinocultura, *Neospora caninum*, RIFI.

Introdução

Um dos maiores problemas na reprodução de bovinos são as perdas fetais e de recém-nascidos no rebanho, o que causam muitos prejuízos econômicos aos produtores. Estes prejuízos podem estar relacionados com o protozoário *Neospora caninum*, causador da doença conhecida como Neosporose. (Embrapa, 2001). A neosporose é uma enfermidade parasitária de distribuição mundial causada pelo protozoário *N. caninum* reconhecido como importante causa de abortamento bovino e neuropatia canina (Dubey, 1988). O agente etiológico pode ser transmitido aos bovinos através da ingestão de oocistos esporulados das fezes de cães que são os hospedeiros definitivos, onde ocorre o desenvolvimento sexual do parasito e produção dos oocistos (McAllister, 1998). Estes oocistos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário que é o bovino pelo ambiente, nos estágios de taquizoídios e bradizoídios, onde as células provocam lesões teciduais no trato intestinal desses animais (Lindsay, 1999). Porém, a via de transmissão mais importante é a vertical ou congênita, onde segundo (Cardoso, 2008) até 95% dos bezerros nascidos de vacas soropositivas, foram infectados congenitamente e clinicamente são normais. Essa porcentagem diminui segundo (Margarido, 2008), que afirma de 80% a 90% dos terneiros das vacas soropositivas são congenitamente infectados. Os sinais clínicos mais comuns da neosporose são abortamento, reabsorção embrionária, mumificação fetal, retorno ao cio, fetos autolisados, natimortos, nascimento de animais vivos seguido de morte, nascimento de animais vivos, clinicamente normais, porém cronicamente infectados e nascimento de bezerros com sinais neurológicos como encefalite, paralisias, ataxia motora e má formação. Os animais lactantes possuem um rendimento de leite 4% menor na lactação (Sousa, 2004). Com base nisto este trabalho teve como objetivo estudar os aspectos clínico-epidemiológicos das infecções pelo *N. caninum* em rebanhos bovinos da Microrregião de Teresina, Estado do Piauí.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em 14 unidades produtoras de bovinos (30 animais cada) nos municípios da microrregião de Teresina, localizada na mesorregião Centro Norte Piauiense do Estado do Piauí, totalizando 420 animais. Durante as visitas foi aplicado o inquérito sobre saúde animal e investigação sanitária da propriedade, sobre a doença estudada para análise dos fatores de risco associados à enfermidade. A escolha da microrregião de Teresina deveu-se a nela esta localizada a bacia leiteira de Teresina, um das principais produtoras de leite do Estado, além do mais, encontra-se nessa região os animais com maior potencial produtivo criados em propriedades estruturadas e tecnificadas. Sendo que em todas as propriedades foram realizados inquéritos epidemiológicos com o objetivo de caracterizar os sistemas de criação dos rebanhos avaliados. As unidades produtoras de bovinos foram escolhidas por conveniência, sendo os rebanhos constituídos em sua grande maioria por animais mestiços, resultantes do cruzamento de Holandês com Zebuino, de várias faixas etárias, criados em regime semi-intensivo e extensivo, com baixa produção leiteira e submetida à ordenha manual. Dos animais selecionados, foi feita a coleta de sangue para posterior realização da pesquisa de anticorpos específicos para a doença. A coleta do sangue foi efetuada por venopunção jugular, utilizando-se tubos de coleta de 15 ml, sem anticoagulante. O sangue coletado, após coagulação, foi mantido a temperatura ambiente. As



amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 G por 10 minutos e os soros obtidos acondicionados em microtubos tipo *ependorf*, separados em três alíquotas de 1,0 mL e estocados a -20°C , em freezer. Para a identificação de anticorpos anti-*N. caninum* foi utilizada a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG.

Resultados e Discussão

A prevalência da infecção pelo protozoário *N. caninum* para as amostras examinadas foi de 15,23% (64/420) de animais soropositivos e 84,76 % (356/420) soronegativos, distribuídos em 100% (14/14) dos rebanhos estudados, verificou-se oscilações nos percentuais de animais sororreagentes nos diferentes municípios estudados, com variação na ocorrência de 3% (1/30) até 33% (10/30) de animais infectados pelo *N. caninum*. Demonstrou-se ainda através desta pesquisa, a ocorrência de pelo menos um animal positivo para *N. caninum*, em cada rebanho avaliado. Um estudo realizado em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão, constatou que de 812 amostras de soro bovinos para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum*, observou-se uma prevalência de 50,74% (412) sororreagentes, indicando que estes animais em algum momento tiveram contato com o parasito. Das amostras positivas, verificou-se que os títulos de anticorpos variaram de 1:200 a 1:6400 e que somente 108 (26,21%) das amostras de soro apresentaram título de 1:200. (Teixeira, 2010). Ainda sim prevalência maior quando se comparada a presente pesquisa.

Tabela 1. Resultados obtidos para *N. caninum* em rebanhos da Microrregião de Teresina no Estado do Piauí. Teresina – 2016.

Sorologia (RIFI)	Número de Animais	Frequência Relativa (%)
Negativos	356	84,76
Positivos	64	15,39
TOTAL	420	100

RIFI: Imunofluorescência Indireta.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a infecção pelo *N. caninum* esta presente na população de bovinos da região estudada e que medidas sanitárias devem ser implementadas, evitando assim o avanço epidemiológico da Neosporose bovina e perdas na cadeia produtiva da bovinocultura.

Agradecimentos

A todos os colaboradores deste projeto, à Clínica de grandes animais da UFPI, em especial a Dr^a Taciana Galba da Silva Tenório, ao Laboratório de Bacterioses da instituição de ensino UFRPE, em especial ao Dr^o Rinaldo Aparecido Mota.

Referências

- Cardoso JMS, Funada MR, Soares RM, Gennari SM.** Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres da infecção. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.45, p.379-384, 2008.
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A.** Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v.192, p.1269-1285, 1988.
- EMBRAPA.** Campo Grande, MS 2001. Disponível em: <http://www.cnpge.embrapa.br/publicacoes/doc/doc104/03neoporsebovinos.html>. Acesso em 30 outubro de 2016.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, v.82, p.327-333, 1999a.
- Margarido RS, Lima DN, Monteiro JR, Neves MF.** Neosporose. *Rev Cient Eletr Med Vet Ano VI*, n.11, 7p, 2008.
- McAllister MM, Dubey J.P, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM.** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, v.28, p.1473-1478, 1998.
- Sousa LDG.** Neosporose. Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária, Faculdades Integradas – UPIS, Brasília, DF, p.35-44, 2004.
- Teixeira WC, Uzêda RS, Gondim LFP, Silva MIS, Pereira HM, Alves LC, Faustino MAG.** Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) em bovinos leiteiros de propriedades rurais em três microrregiões no estado do Maranhão. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.729-734, 2010.



Prevalência e fatores de risco da toxoplasmose bovina na microrregião de Teresina – PI

Prevalence and bovine toxoplasmosis risk factors in the micro region of Teresina - PI

Julia Caroline Paz dos Santos^{1,*}, Alcir Martins Pereira¹, Pryscyla Silva Lucena¹, Luciana Rodrigues Alves¹, Adrienne Mota de Alcântara², Rinaldo Aparecido Mota², Francisco Solano Feitosa¹, Taciana Galba da Silva Tenório¹

¹Clínica de Grandes Animais- CGA, UFPI, Teresina, PI, Brasil; ²Laboratório de bacterioses, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

*E-mail: julia_kroline@hotmail.com

Abstract

*Toxoplasmosis is caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, a cosmopolitan zoonosis that affects several warm-blooded animal species. The main transmission routes of *T. gondii* are fecal-oral, carnivorous and congenital. Congenital transmission, when the parasite reaches the concept via the transplanted route, is often more severe, which transmits tachyzoites to the fetus. The present study was carried in 13 production units of cattle in the municipalities near from Teresina. Blood collection was performed by jugular venipuncture, using a 15 ml collection tubes without anticoagulant. For the identification of anti-*T. gondii* used the technique of indirect immunofluorescence (IIF) for detection of antibodies of the IgG class. The prevalence of infection by the protozoan parasite for the samples examined was 17,44% (68/390) of seropositive animals and 82,56% (322/390) seronegative, distributed in 100% (13/13) of the herds studied. Also demonstrated in this study, the occurrence of at least one animal tested positive for *T. gondii*, in each flock evaluated.*

Keywords: protozoan, *Toxoplasma gondii*, RIFI.

Palavras-chave: protozoário, *Toxoplasma gondii*, RIFI.

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita que acomete o homem e outros animais homeotérmicos, tanto de produção quanto de companhia, domésticos e silvestres, sendo causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, a única espécie existente no gênero. A infecção dos Bovinos ocorre principalmente pela ingestão de oocistos nos alimentos e solos contaminados (Dubey, 1986) onde a estabulação de animais junto a locais contaminados com dejetos de felídeos pode aumentar o risco de infecção (Meireles, 2001). Embora os bovinos constarem entre os hospedeiros mais resistentes ao *T. gondii*, o papel da carne bovina na transmissão da toxoplasmose permanece obscuro e são necessárias pesquisas para a determinação de animais infectados dentre os bovinos abatidos (Dubey, 2001). A transmissão congênita, é quando o parasita atinge o conceito por via transplacentária, é frequentemente mais grave, que transmite taquizoítos para o feto (Tenter, 2000). Esta forma de distribuição normalmente acontece na fase aguda da doença ou reagudização da doença crônica (Kawazoe, 2005). Quanto menor for a idade gestacional maiores chances da fêmea ter abortos, embora quanto mais adiantada a gestação maior a probabilidade da infecção fetal, porém com menos riscos de fetopatias graves, e se não há o aborto, existe o risco de nascer com degenerações físicas e mentais (Wong, 1994). Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a prevalência e fatores de risco da toxoplasmose bovina da microrregião de Teresina, Piauí.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em 13 unidades produtoras de bovinos (30 animais cada) nos municípios da microrregião de Teresina, localizada na mesorregião Centro Norte Piauiense do Estado do Piauí, totalizando 390 animais. Durante as visitas foi aplicado o inquérito sobre saúde animal e investigação sanitária da propriedade, sobre a doença estudada para análise dos fatores de risco associados à enfermidade. A escolha da microrregião de Teresina deveu-se a nela esta localizada a bacia leiteira de Teresina, um das principais produtoras de leite do Estado, além do mais, encontra-se nessa região os animais com maior potencial produtivo criados em propriedades estruturadas e tecnificadas. Sendo que em todas as propriedades foram realizados inquéritos epidemiológicos com o objetivo de caracterizar os sistemas de criação dos rebanhos avaliados. As unidades produtoras de bovinos foram escolhidas por conveniência, sendo os rebanhos constituídos em sua grande maioria por animais mestiços, resultantes do cruzamento de Holandês com Zebuino, de várias faixas etárias, criados em regime semi-intensivo e extensivo, com baixa produção leiteira e submetida à ordenha manual. Dos animais selecionados, foi feita a coleta de sangue para posterior realização da pesquisa de anticorpos específicos para a doença. A coleta do sangue foi efetuada por venopunção jugular, utilizando-se tubos de coleta de 15 ml, sem anticoagulante. O sangue coletado, após coagulação, foi mantido a temperatura ambiente. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 G por 10 minutos e os soros obtidos acondicionados em microtubos tipo *ependorf*, separados em três alíquotas de 1,0 mL e estocados a -20°C, em freezer. Para a identificação de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG.



Resultados e Discussão

A prevalência de anticorpos da classe IgG, específicos para *T. gondii*, foram encontrados, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), onde 17,44% (68/390) das amostras foram soropositivas e 82,56% (322/390) soronegativas, distribuídos em 100% (13/13) dos rebanhos estudados. A ampla distribuição da toxoplasmose entre seus hospedeiros na natureza é consequência da diversidade dos mecanismos de transmissão do parasita e da enorme variedade de hospedeiros (Miller, 1972). A prevalência da infecção toxoplásmica pode variar de região para região. Estas variações nas frequências de anticorpos anti-*T. gondii* podem ocorrer em função do tamanho da amostra, do teste sorológico empregado e do limiar de positividade determinado para cada teste e sua consequente sensibilidade (Arias, 1994). Os resultados revelados na presente pesquisa (17,44%) são ainda superiores aos encontrados em avaliações semelhantes realizadas no Brasil, como as de (Luciano, 2011) que encontraram uma prevalência de 1,96% de soro-reagentes num estudo de 459 Bovinos no estado do Rio de Janeiro. (Spagnol, 2009) analisou 600 soros de bovinos abatidos nos matadouros sob Inspeção Municipal de Ilhéus e Itabuna, e no matadouro frigorífico sob Inspeção Federal em Jequié no estado da Bahia, para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* por imunofluorescência indireta, onde encontrou uma prevalência de 11,83% positivos. (Albuquerque, 2005) em um levantamento sobre toxoplasmose em bovinos da bacia leiteira Sul-fluminense, estado do Rio de Janeiro, coletou amostras de sangue de 589 animais de 29 granjas leiteiras localizadas nos municípios de Resende e Rio Claro, onde 14,8% dos animais foram soro-reagentes.

Tabela 1. Resultados obtidos para Toxoplasmose em rebanhos bovinos da Microrregião de Teresina no Estado do Piauí. Teresina – 2016

Sorologia (RIFI)	Número de animais	Frequência relativa (%)
Positivos	68	17,44
Negativos	322	82,56
TOTAL	390	100

RIFI: Imunofluorescência Indireta.

Conclusão

Com a análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se afirmar que a infecção pelo *T. Gondii* está presente na população de bovinos da região estudada e que medidas sanitárias devem ser implementadas, evitando assim o avanço da toxoplasmose e perdas na cadeia produtiva da bovinocultura.

Agradecimentos

A todos os colaboradores deste projeto, à Clínica de grandes animais da UFPI, em especial a Dr^a Taciana Galba da Silva Tenório, ao Laboratório de Bacterioses da instituição de ensino UFRPE, em especial ao Dr^o Rinaldo Aparecido Mota.

Referências

- Albuquerque GR, Munhoz AD, Flausino W, Silva RT, Almeida CRR, Medeiros SM, Lopes CWG.** Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet*, v.14, p.125-128, 2005.
- Arias ML, Chinchilla M, Reyes L, Sabah J, Guerrero OM.** Determination of *Toxoplasma gondii* in several organs of cattle by carbon immunoassay (CIA) testing. *Vet Parasitol*, v.55, p.133-136, 1994a.
- Dubey JP.** Toxoplasmosis in cats. *Feline Practice*, v.16, p.12-45, 1986
- Dubey JP, Morales ES, Lehmann T.** Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J Parasitol*, v.90, p.411-413, 2001.
- Kawazoe U.** *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11^a ed., São Paulo: Atheneu, p.428, 2005.
- Luciano DM, Menezes RC, Ferreira LC, Nicolau JL, Das Neves LB, Luciano RM, Dahroug MA, Amendoeira MR.** Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet*, v.20, p.351-3, 2011
- Meireles LR, Galisteo Junior AF, Andrade Jr HF.** Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.40, p.267-271, 2001.
- Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP.** Oral infections with toxoplasma cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. *J Parasit*, v.58, p.928-937, 1972
- Spagnol FH, Paranhos EB, Oliveira LLS, Medeiros SM, Lopes CWG, Albuquerque GR.** Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*, v.18, p.42-45, 2009.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM.** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, v.30, p. 1217-1258, 2000. Review Erratum in: *Int J Parasitol*, v.31, n.2, p. 217-220, 2000.
- Wong SY, Remington JS.** Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis*, v.18, p.853-861, 1994.



Produção *in vitro* de embriões bovinos oriundos de fêmeas previamente tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbST)

In vitro production of bovine embryos derived from females previously treated with recombinant bovine somatotropin (rbST)

Sérgio Henrique Costa Júnior^{1,*}, Brenda Karine Lima do Amaral¹, Hallel Mithchel Pereira Trovão¹, Ricardo de Macêdo Chaves⁴, Higor da Silva Ferreira², Hélder de Moraes Pereira⁵, Hamilton Pereira Santos⁶, Felipe de Jesus Moraes Júnior³

¹Graduandos em Medicina Veterinária - CCA/UEMA; ²Mestrando em Ciência Animal - Mestrado em Ciência Animal/UEMA; ³Bolsista de Pós-Doutorado - Mestrado em Ciência Animal/ CAPES-UEMA; ⁴Professor Adjunto III, Departamento das Clínicas, CCA/UEMA; ⁵Professor Ajunto IV – Departamento das Clínicas, CCA/UEMA; ⁶Professor Ajunto IV – Departamento de Patologia, CCA/UEMA, São Luís MA, Brasil.

*E-mail: sergiocosta94@outlook.com

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of rbST on in vitro production of Girolanda female embryos. Ovum Pick-Up (OPU) was performed to obtain the cumulus-oocyte complexes (COCs) were subjected to the PIV. Pretreatment of rbST in cows Girolando did not influence the embryo development rate in vitro production.

Keywords: cattle, OPU, PIV.

Palavras-chave: bovinos, OPU, PIV.

Introdução

A manipulação da dinâmica folicular em bovinos permitiu maior disponibilização de complexos cumulus-oócito (CCOs) pela técnica de *Ovum pick-up* (OPU) para uso em programas de produção *in vitro* de embriões (RAMOS et al., 2007). O uso da rbST antes do início das sessões de punção folicular pode ser um valioso recurso para aumentar o número e a qualidade dos oócitos coletados *in vivo* e dos embriões produzidos *in vitro*. Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito da rbST sobre a produção *in vitro* de embriões de fêmeas Girolandas.

Material e Métodos

Doze animais foram divididos em três grupos experimentais: controle 0mg (n = 4), 250mg (n = 4) e 500mg (n = 4) e submetidos a seis aplicações de rbST no intervalo de doze dias. A OPU foi realizada em intervalos de 7 dias. Os CCOs foram classificados e submetidos a maturação *in vitro* (MIV) pelo período de 24h. Posteriormente, os CCOs e os espermatozoides foram co-incubados por 22h. Após a fecundação *in vitro* (FIV), o desenvolvimento dos blastocistos foi avaliado aos sete dias (D7) após o início da FIV (D0). A análise estatística foi inteiramente ao acaso submetidas ao teste de normalidade, à análise de variância (ANOVA). Dados qualitativos foram comparados pelo teste do Qui-quadrado para P < 0,05. As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2002).

Resultados e Discussão

Foram realizadas cinco sessões de OPU com intervalos de 7 dias num total de 60 aspirações. As taxas de clivagem dos grupos em estudo são representadas na Tab. 1. Os grupos controle, 250 mg e 500 mg obtiveram, respectivamente, 51,85%, 51,78% e 56,86% na taxa de clivagem *in vitro* no D3. Não houve diferença estatística (P < 0,05) entre os tratamentos.

Tabela 1. Taxa de clivagem de CCOs de fêmeas bovinas da raça Girolando utilizados para a PIV e embriões, submetidas ou não ao tratamento com rbST.

Desenvolvimento Embrionário	Tratamentos								
	Controle			250 mg			500 mg		
Taxa de Clivagem	Clivados	n	% †	Clivados	n	% †	Clivados	n	% †
	84	162	51,85 ^a	58	112	51,78 ^a	54	95	56,86 ^a

^{a, b}Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para P < 0.05.

†Taxa de clivagem no D3 baseada no número total de estruturas colocadas em CIV.

De acordo com Lucci et al. (1998), a associação desta a outros hormônios poderia aumentar as taxas obtidas no presente estudo. As taxas de mórulas e blastocistos *in vitro* estão representadas na Tab. 2. O grupo 500 mg foi melhor estatisticamente em relação aos grupos controle e 250 mg no desenvolvimento embrionário no D7. Não houve diferença estatística (P < 0,05) entre os grupos controle e 250 mg de rbST submetidos ao protocolo experimental.

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento embrionário de CCOs de fêmeas bovinas da raça Girolando utilizados para a PIV de embriões, submetidas ou não ao tratamento com rbST em intervalos de doze dias.

Desenvolvimento embrionário	Tratamentos								
	Controle			250 mg			500 mg		
Taxa de mórula e blastocisto	CIV	n	% [†]	CIV	n	% [†]	CIV	n	% [†]
	162	55	33,95 ^b	112	34	30,35 ^b	95	45	47,36 ^a

^{a, b}Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

[†]Taxa de desenvolvimento no D7 baseada no número total de estruturas colocadas em CIV.

Coelho (1986), ao obter embriões no D7 de superovulação, também não observou diferença ($P > 0,05$) nas médias de mórulas e blastocistos, nos animais da subespécie *Bos taurus taurus*, assim como no número de mórulas e mórulas compactas em *Bos taurus indicus*, evidenciando variabilidade individual no desenvolvimento e na qualidade embrionária. Em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário (Fig. 1), a proporção de mórulas entre os tratamentos (controle, 250 mg e 500 mg) não obteve diferença estatística ($P < 0,05$). A taxa de blastocisto inicial não apresentou diferença estatística entre os grupos, sendo que o grupo 250 mg não apresentou blastocistos iniciais. A proporção de blastocistos para o grupo 500 mg não apresentou diferença estatística dos tratamentos controle e 250 mg, porém os grupos controle e 250 mg foram estatisticamente diferentes entre si.

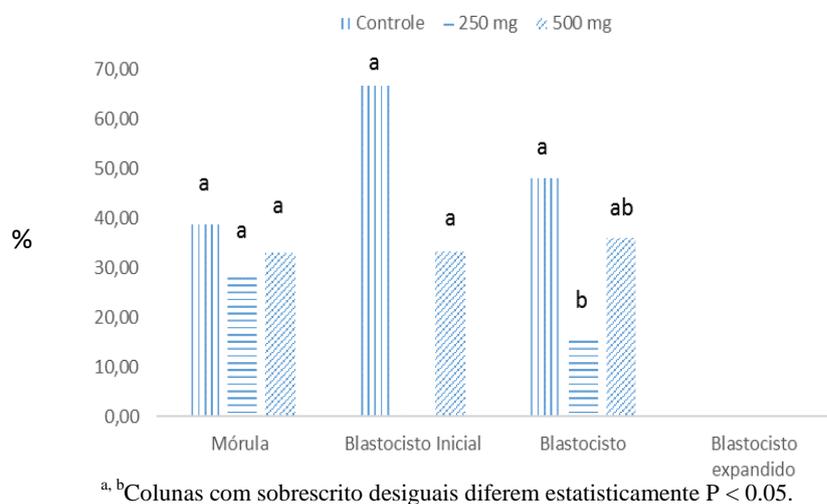


Figura 1. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos *in vitro* a partir de CCOs aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas bovinas.

Neves et al. (2005) obtiveram nos grupos controle, 250 mg e 500 mg, respectivamente, 39,37%, 63,11% e 54,03%, o que difere do presente estudo onde as aplicações de rbST não influenciou na proporção de embriões viáveis. Ramos et al. (2007) obtiveram dos grupos controle e rbST (160mg) taxa de blastocistos de 7,78% e 19,38%, respectivamente, não corroborando com os resultados onde a dose de 500mg não proporcionou taxas superiores aos demais grupos. Este aumento pode estar relacionado à influência direta ou indireta no microambiente folicular e ou no próprio oócito. Em relação a qualidade morfológica do embrião (Fig. 2), a proporção de embriões grau 1 no grupo controle foi estatisticamente superior aos grupos tratados com rbST, não havendo diferença estatística entre os grupos 250 mg e 500 mg. A proporção de embriões grau 2 não diferiu entre os grupos em estudo. Para embriões grau 3, não houve diferença significativa entre os grupos controle e 500 mg, porém o grupo 250 mg diferiu aos demais tratamentos.

Neves et al. (2005) estudaram o efeito da rbST sobre o número e qualidade dos embriões e constataram que tanto a administração de 250 como de 500mg de rbST aumentaram a qualidade embrionária. Maffili et al. (2001) descreveram que o uso da rbST, em associação com a superovulação não aumentou a quantidade de embriões produzidos, mas melhorou o desenvolvimento e a qualidade dos embriões.

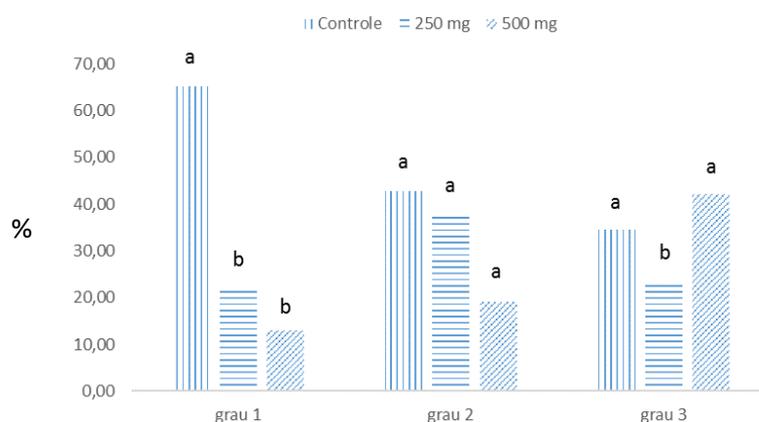


Figura 2. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos *in vitro* a partir de CCOs aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas bovinas.

Conclusão

O pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbST) nas fêmeas bovinas da raça Girolando não influenciou na taxa de desenvolvimento embrionário na produção *in vitro*.

Referências

Coelho EN. Alguns aspectos da transferência de embriões em bovinos. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária da UFMG, 1986. 83p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1986.

Lucci CS, Rodrigues PHM, Santos Jr EJ, Castro AL. Emprego da somatotrofina bovina (bst) em vacas de alta produção. Braz J Vet Res Anim Sci, v.35, p.46-50, 1998.

Maffili VV, Torres CAA, Soares Filho PM, Silva MR, Fonseca JF, Borges AM, Amorim LS. Efeito da somatotropina bovina na resposta superovulatória e na taxa de clivagem de zigotos de camundongos (*Mus musculus*). Rev Bras Reprod Anim, v.25, p.377-379, 2001.

Neves EF, Ramos AF, Marques Júnior AP. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. Arq Bras Med Vet Zootec, v.57, p.205-209, 2005.

Ramos A, Ferreira AM, Sá WF, Viana HM, Camargo LSA, Posseni J, Henry M. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir. Rev Bras Zootec, v.36, p.380-386, 2007.



Soroprevalência de anticorpos Anti-*Brucella abortus* em rebanhos bovinos da microrregião de Teresina, Piauí

Seroprevalence Anti-Brucella abortus antibodies in cattle herds in the microregion of Teresina, Piauí

Wendel De Souza Mendonça^{1,*}, Francisco Felipe Ferreira Soares², Misael Das Virgens Santana², Gustavo Henrique Chaves Martins³, Letícia Soares de Araújo Teixeira¹, Brenda Lurian do Nascimento Medeiros², Ana Lys Barradas Mineiro⁴, Taciana Galba da Silva Tenório⁴.

¹Médico Veterinário formado pela UFPI; ²Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Brasil; ³Médico Veterinário, residente multiprofissional em reprodução animal; ⁴Professor doutor adjunto da universidade federal do Piauí, Brasil.

*E-mail: wendel-w@hotmail.com

Abstract

The objective of this study is to estimate the prevalence in cattle herds of the micro-region of Teresina, state of Piauí. It was collected 406 serum samples from 14 herds, using as a screening technique buffered plate agglutination test (BPAT). Of the 406 samples, 15 (3.69%) responded to the BPAT, from the 14 herds studied, five showed at least one positive animal, given the prevalence of outbreaks of 35.7% (5/14). The results suggest that the disease is widespread in herds and could trigger a spreading agent in the region, requiring that prophylactic measures should be instituted by related official agencies, in maintaining the health of livestock.

Keywords: BPAT, Brucellosis, PNCEBT.

Introdução

A brucelose tem sido uma doença em permanente evolução desde de a identificação da *B. melitensis* por Bruce, em 1887. A brucelose é uma doença bacteriana causadora de aborto na maioria das espécies domésticas, ocorrendo geralmente no último terço da prenhez. Essa enfermidade causa inúmeros prejuízos aos rebanhos bovinos por causar quedas na produção de leite e carne, alterações nos índices reprodutivos manifestados por abortos, reabsorções, repetição deaios, natimortos, nascimento de crias fracas e infecções como metrite e mastite, são entre outras, condições que afetam consideravelmente a indústria agropecuária (Llano, 2013). Nesse sentido, a atualização de conhecimentos sobre a dinâmica da infecção nos animais e a possibilidade, assim como as implicações, de sua conexão clínico-epidemiológica é componente básico para qualquer plano de ação que vise o controle estratégico dessa silenciosa, mas insidiosa, doença no país, bem como, na região do Estado do Piauí (Tenório, 2007). Diante do exposto, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de estimar a soroprevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em rebanhos bovinos da Microrregião de Teresina, Estado do Piauí.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido com amostras sorológicas de bovinos, todos com idade acima de seis meses, armazenadas em soroteca na Clínica de Grandes Animais oriundas de 14 unidades produtoras de bovinos nos municípios da Microrregião de Teresina.

Em todas as propriedades foram realizados inquéritos epidemiológicos com o objetivo de caracterizar os sistemas de criação dos rebanhos avaliados. As unidades produtoras de bovinos foram escolhidas por conveniência não probabilística sendo os rebanhos constituídos em sua grande maioria por animais mestiços, resultantes do cruzamento de Holandês com Zebuino, de várias faixas etárias, criados em regime semi-intensivo e extensivo. Nenhum dos animais que participaram da pesquisa eram vacinados. Para estimativa da prevalência das doenças estudadas e sua distribuição nos rebanhos, o tamanho da amostra foi determinado estatisticamente, utilizando-se a fórmula a seguir recomendada por Thrusfield (2004).

$$n = p.q. z^2 / d^2$$

p = prevalência esperada (50,0%, visto que há dados da ocorrência de algumas das infecções estudadas na microrregião); q = 100 – p (85,4) ; z = intervalo de confiança (95,0%); d= erro amostral (± 3,0%; correspondendo ao intervalo de 11,5% a 17,5%).

Para a determinação do número de animais a serem examinados e considerando a prevalência de 50%, um nível de confiança de 95% (o que equivale a um valor de “z” igual a 1,96) e uma variação de 5%, a aplicação da fórmula apontou para a necessidade de examinar um total de 385 animais, obtido da seguinte maneira:

$$n = (1,96)^2 \times 0,16 \times 0,5 / (0,05)^2 = 385 \text{ animais}$$

Para a realização do teste de soroprecipitação com o AAT, os soros e o antígeno foram previamente deixados em descanso por pelo menos 30 minutos, para que atingissem a temperatura ambiente. Em seguida, o soro foi agitado em agitador por 10 segundos para deixar a amostra homogênea. Logo após esse período, foi



posto 30 μ L do soro a ser testado sobre uma placa de vidro com quadros delimitados, e dentro do mesmo quadro e lateralmente ao soro, foi adicionado 30 μ L do AAT. Posteriormente, o soro e o antígeno foram misturados por um período de 4 minutos com movimentos que lhe conferiam formato circular de aproximadamente 2 cm de diâmetro. E por fim, as amostras misturadas ao AAT na placa de vidro foram levadas para uma caixa com luz indireta, para ser feita a leitura.

De acordo com o PNCEBT a interpretação dos resultados é feita da seguinte forma, quando há a formação de grumos o soro é considerado como reagente. E quando há a ausência de formação de grumos o soro é considerado não reagente (Brasil, 2006).

Os resultados foram analisados através da estatística descritiva por meio de dispersão de frequências absoluta e relativa (Sampaio, 2007).

Resultados e Discussão

Das 406 amostras examinadas, 15 reagiram positivamente ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), apresentando uma prevalência de 3,69% como demonstrados em (Tab. 1). Os soros que se apresentaram reagentes no teste do AAT eram provenientes de cinco (35,71%) unidades dentre as 14 unidades produtivas que participaram da pesquisa. Dos 15 animais reagentes no teste AAT, apenas 2 não se confirmaram pelo teste 2-Mercaptoetanol.

Tabela 1. Resultados obtidos do teste do AAT* em rebanhos bovinos da Microrregião de Teresina no Estado do Piauí – 2016.

AAT*	Número de Animais	Frequência Relativa (%)
Reagentes	15	3,69%
Não Reagentes	391	96,31%
Total	406	100

AAT*: Antígeno Acidificado Tamponado.

Em 2003, Silva et al., submeteu 4.640 animais ao teste do AAT no Estado de Sergipe, encontrando uma prevalência de 3,36 % de animais reagentes para brucelose; semelhante a prevalência encontrada na presente pesquisa (Silva et al., 2009). Também em 2003, Ogata et al., em pesquisa no Estado do Tocantins encontrou uma prevalência de 4,43 % para a brucelose testando 20.908 animais (Ogata et al., 2009), sendo esta um pouco acima do encontrado na Microrregião de Teresina, Piauí. E no Estado de Goiás, Rocha et al., pesquisando brucelose em bovinos, encontrou uma prevalência de 3,01% testando 10.738 bovinos (Rocha et al., 2009), sendo esta prevalência também semelhante na encontrada na Microrregião de Teresina no Estado do Piauí.

Foram analisadas 406 amostras de 14 municípios, nos quais os percentuais de . animais sororeagentes, nos diferentes municípios estudados, variaram conforme verificado em (Tab. 2), com valores oscilando de 0% até 23,33 % de animais reagentes ao teste do AAT. Nesta pesquisa, mostrou-se que nove propriedades apresentaram-se negativas ao AAT.

Tabela 2. Distribuição das taxas de prevalência de bovinos reagentes ao teste do AAT em rebanhos mestiços criados nos municípios da Microrregião de Teresina, Estado do Piauí. Teresina – 2016.

Rebanho	Municípios	Reagentes	(%)	Não Reagentes	(%)	Total
A	Teresina	00	0,0%	30	100%	30
B	Lagoa Alegre	04	13,79%	25	86,21%	29
C	José de Freitas	00	0,0%	30	100%	30
D	União	00	00%	30	100%	30
E	Nazária	07	23,33%	23	73,67%	30
F	Beneditinos	01	3,33%	29	96,67%	30
G	Demerval Lobão	00	0,0%	29	100%	29
H	Miguel Leão	00	0,0%	27	100%	27
I	Altos	02	6,90%	27	93,10%	29
J	Monsenhor Gil	01	3,33%	29	96,67%	30
K	Pau d'arco	00	0,0%	22	100%	22
L	Coivaras	00	0,0%	30	100%	30
M	Lagoa do Piauí	00	0,0%	30	100%	30
N	Curralinhos	00	0,0%	30	100%	30
Total	14	15	-	391	-	406

Conclusão

Conclui-se que: De acordo com os resultados obtidos a doença encontra-se disseminada nos rebanhos e



poderá desencadeando uma disseminação do agente na região.

Sendo portanto, necessária a instituição de medidas de profilaxia contra a brucelose bovina através de órgãos oficiais relacionados, na manutenção da sanidade dos rebanhos dessa região.

Referências

Aguiar RSCB. Caracterização epidemiológica da brucelose e tuberculose bovinas na região de Campinas, Piracicaba, Bragança Paulista, Limeira, Mogi Mirim e São João da Boa Vista, estado de São Paulo. 2012. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Alves AJS, Gonçalves VSP, Figueiredo VCF, Lôbo JR, Bahiense L, Amaku M, Ferreira F, Ferreira NetoJS, Dias RA. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, supl. 1, p.6-13, 2009.

BORBA MR. Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado do Maranhão. 2012. 82p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCBET. Brasília, DF: MAPA, Secretária de Defesa Animal, 188p. 2006.

Carvalho MP, Souza LSA, Carvalho JA, Araújo BM. Fatores de risco e soroprevalência da brucelose em assentamento rural no município de Aragominas - TO, Brasil. *Cadernos UniFOA*, n.22, p.81-93, 2013.

Cavalcante FA. Brucelose, diagnóstico e controle. *Embrapa Acre*, n.26, p.1-3, 2000.



Taxa de prenhez em vacas leiteiras submetidas a inseminação artificial em tempo fixo utilizando gonadotrofina coriônica equina

Pregnancy rate in dairy cows submitted to fixed time artificial insemination using equine chorionic gonadotropin

Wendell Fellipe de Souza Alves¹, Deygnon Cavalcanti Clementino², Daniela Kunkel³*, Kolowyskys Silva de Alencar Dantas⁴, Glauciany Soares Lopes⁵, Lourivaldo Rodrigues da Silva⁶, Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior⁷, Manoel Lopes da Silva Filho⁷

¹Graduando em Medicina Veterinária, UFPI-CPCE; ²Mestrando em Ciência Animal e Pastagens UFRPE-UAG, Recife, PE, Brasil; ³Doutoranda em Ciência Animal UFPI-CCA; ⁴Mestrando MPBIOTEC - Mestrado Profissional em Biotecnologia – UECE, Fortaleza, CE, Brasil; ⁵Mestre em Fitotecnia, UFPI-CPCE; ⁶Médico Veterinário- Fazenda Flor da Serra; ⁷Professor Adjunto UFPI-CPCE, Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: danikunkel@hotmail.com

Abstract

This study aimed to evaluate the pregnancy rate in cyclic lactating dairy cows inseminated at fixed time using eCG in the withdrawal of progesterone implant. The experimental design was a randomized blocks, two treatments with 32 repetitions for G1 and 31 repetitions for G2. The G1 control group: cows with hormonal protocol with the use of eCG; G2: cows with hormonal protocol without using eCG. The study presented to the Group eCG with pregnancy rate of 28.13%, while no eCG group had a 16.13% pregnancy rate. The statistical difference between the groups was not significant ($p = 0.2522$). In conclusion, the use of eCG had no influence on the pregnancy rate.

Keywords: *cattle, lactation, oestrus synchronization.*

Palavras-chave: *bovinos, lactação, sincronização do estro.*

Introdução

Nas últimas décadas, a pecuária vem passando por processo de incorporação de tecnologia visando principalmente melhoria dos índices de produtividade e aceleração do melhoramento genético. Neste sentido, considera-se a inseminação artificial (IA) como a biotécnica mais importante incorporada aos sistemas de produção da pecuária (Sugulle et al., 2006), pois implica em aproveitamento e globalização de touros zootecnicamente superiores, representando uma biotécnica fundamental para a obtenção de animais de maior mérito genético (Oliveira et al., 2012).

O aperfeiçoamento e aplicação da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) associado aos protocolos de sincronização do estro e ovulação aumentam a utilização da inseminação artificial e da transferência de embriões e, conseqüentemente, contribui para melhorar a eficiência reprodutiva e produtividade do rebanho nacional (Biernaski, 2011).

Com este avanço tecnológico se reduz a estação de monta em um menor número de dias, além de não se perder com falhas na detecção do cio, minimizando o trabalho que seria dedicado a um mesmo lote durante toda a estação de monta, assim como, a redução dos dias de manejo. O desenvolvimento e adoção de tecnologias devem ser utilizados nos sistemas de produção, com isso um aumento na eficiência reprodutiva, nos causará um impacto econômico positivo, e pode-se afirmar que é de fundamental importância para o bom desempenho dos rebanhos (Galvani, 2009).

Portanto, considerando o alto custo da inclusão de gonadotrofina coriônica equina (eCG) nos protocolos de IATF, julga-se razoável avaliar os benefícios da sua utilização em vacas leiteiras. Diante desse contexto, o estudo teve por objetivo avaliar a taxa de prenhez em vacas leiteiras lactantes cíclicas inseminadas em tempo fixo utilizando eCG na retirada do implante de progesterona.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido durante o período de março a maio de 2016, na Fazenda Flor da Serra, no município de Limoeiro do Norte, estado do Ceará, latitude -05° 13' 06", longitude -38° 01' 23" com temperatura média anual de 27,6°C, com clima tropical semiárido e pluviosidade média anual de 762mm. O experimento utilizou 63 vacas com aptidão leiteira, as quais apresentaram escore de condição corporal (ECC) médio entre 2,5 e 3,0, mantidas sob condições semelhante de manejo.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizado, sendo dois tratamentos com 32 repetições para o G1, e 31 repetições para o G2, ambos constituídos por vacas cíclicas que apresentaram no momento do exame ginecológico ovários com a presença de corpo lúteo, submetidas a dois protocolos hormonais: G1 grupo controle: vacas com protocolo hormonal, com a utilização de eCG; G2: vacas com protocolo hormonal sem a utilização de eCG.

Inicialmente, as fêmeas do G1 foram submetidas ao seguinte protocolo: receberam (D0) um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) e aplicação de benzoato de estradiol (BE) por via intramuscular (2mL/IM), no oitavo dia (D8), foram aplicadas o eCG (2mL/IM), cloprostenol sódico (PGF2 α) (2mL/IM) e cipionato de estradiol (0,5 mL/IM), além da retirada do CIDR, após quarenta e oito horas (D10) foi procedida a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para o grupo G2 foi realizado protocolo semelhante, diferindo apenas no D8, no



qual não foi realizada a aplicação de eCG.

Para IATF utilizou-se sêmen comercial obedecendo aos requisitos mínimos exigidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013); padrão mínimo após descongelamento de 30% de motilidade e vigor 3; e concentração de espermatozoides progressivos/dose de 10×10^6 . Todas as inseminações foram realizadas pela equipe responsável pelo setor visando diminuir a variabilidade.

O diagnóstico de gestação foi procedido a partir de 40 dias após a inseminação, com auxílio da ultrassonografia (Ultrassom Veterinário Mindray P/B - DP 2200 VET[®]).

Taxa de prenhez foi definida como a porcentagem de fêmeas prenhes, determinada após o exame ultrassonográfico, dividido pelo total de fêmeas inseminadas em tempo fixo.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS[®]. A variável binomial, percentual da taxa de prenhez, foi analisada pelo teste de Qui quadrado (χ^2).

Resultados e Discussão

Observando a Tabela 1 a taxa de prenhez correspondeu a 22,22% de um total de 63 animais, aos quais 14 foram positivos e 49 negativos.

Tabela 1. Taxa de prenhez de vacas cíclicas lactantes submetidas ou não à aplicação de eCG.

Protocolo	Diagnóstico		Total	Taxa de prenhez (%)
	Negativo	Positivo		
G1- COM eCG	23	9	32	28,13 a
G2- SEM eCG	26	5	31	16,13 a
TOTAL	49	14	63	22,22

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresenta diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

A taxa de prenhez do grupo G1 (Com eCG) obteve um total de 28,13% e do grupo G2 (Sem eCG) 16,13% de um total de 32 e 31 animais respectivamente. Apesar dos resultados serem distintos, com o G1 apresentando taxas de prenhez mais elevada, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,2522$).

Estudos executados com objetivo de se estimar uma taxa de prenhez em bovinos leiteiros afirmam que uma taxa de 35% enquadra-se em uma taxa de sucesso. Porém, quando realizados algumas modificações nos protocolos, pode-se obter uma melhoria nos resultados. (Lucy, 2011). Neste estudo, os resultados se caracterizaram abaixo da média. No entanto, as pesquisas relatam que durante o verão, o estresse térmico reduz as taxas de concepção e prenhez e este efeito se mantém nos meses de outono (Wolfenson et al., 2000). Utilizando-se dessa afirmação justifica-se que por conta das altas temperaturas registradas na região, fez com que os animais apresentassem baixos índices reprodutivos.

De acordo com Baruselli et al., (2008) o eCG, quando administrado em fêmeas, oferece condições para estimular o crescimento folicular e ovulação. Sua aplicação tem apresentado efeito positivo em rebanhos que se encontram em anestro, em animais recém-paridos, em animais com condição corporal comprometida ($\leq 2,5$ na escala de 1 a 5; Baruselli et al., 2004). Isso ocorre em função das características fisiológicas dessa gonadotrofina, como em razão do componente siálico no processo de glicosilação (Murphy; Martinuk, 1991) e sua capacidade em se ligar tanto aos receptores de FSH quanto de LH (Baruselli et al., 2004). Todavia, não é necessária para vacas cíclicas e com boa condição de escore corporal (Baruselli et al., 2004).

Conclusão

Conclui-se que as taxas de prenhez apesar de terem sido distintas, não tiveram diferenças significativas. Porém, maiores estudos são necessários para verificar a real necessidade e efeito da utilização do mesmo em rebanhos leiteiros.

Referências

- Baruselli PS, Jacomini JO, Sales JNS, Crepaldi GA.** Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3, 2008, Londrina, PR. *Anais...* Londrina: SIRAA, 2008. CD-ROM.
- Baruselli PS, Madureira EH, Marques MO, Rodrigues CA Nasser LFT, Silva RCP, Reis EL, Sá Filho MF.** Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelores com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise retrospectiva). *Acta SciVet*, v.32. p.228, 2004.
- Biernaski PAS.** Estágio Curricular Supervisionado em Reprodução Animal. 2011. 45p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Galvani F.** Manejo reprodutivo em gado de corte em regime de monta natural e inseminação artificial. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 2009. CD-ROM.
- Lucy MC.** Desafios na reprodução de vacas leiteiras de alta produção. In: Curso Novos Enfoques na Produção de Bovinos, 15, 2011, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia, 2011. CD-ROM.
- Murphy BD, Martinuk SD.** Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*, v.12, p.27-44, 1991.



- Oliveira LZ, Arruda RP, De Andrade AFC, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Martins JPN, Hossepian de Lima VFM.** Effect of sequence of insemination after simultaneous thawing of multiple semen straws on conception rate to timed AI in suckled multiparous Nelore cows. *Theriogenology*, v.78, p.1800-1813, 2012.
- Sugulle AH, Bhuiyan MMU, Shamsuddin M.** Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen sêmen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. *Livestock Res Rural Dev*, v.18, p.54, 2006.
- Wolfenson D, Roth Z, Meidan R.** Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.535-547, 2000.