



## **Adição do Ácido Fólico na criopreservação de sêmen ovino da raça Santa Inês** *Addition of Folic Acid in the cryopreservation of semen from Santa Ines sheep*

**Filipe Nunes Barros\*, Priscilla Niely Costa de Sá, Felipe Pereira da Silva Barçante, Marlon de Araújo Castelo Branco, Marco Antônio Celestino de Sousa Filho, Dayse Andrade Barros, Bruno de Oliveira Lopes Neto, José Adalmir Torres de Souza**

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

\*Email: filipenbarros@hotmail.com

### **Abstract**

*We evaluated the addition of folic acid to the extender TRIS-egg yolk used in cryopreservation, seeking improvements for the sperm kinetics and mitochondrial activity post-thawing. We evaluated seven ejaculates/animal from six Santa Inês by Artificial Vagina, with minimum values of motility by 70.0% and vigor 3. We evaluated the seminal pool for concentration and morphology. We diluted in Tris-egg yolk extender for cryopreservation, dividing it in control, Group 2 we added 10.000 uM and Group 3 we added 5000 uM of folic acid. We froze in straws(0.25 mL). Was evaluated for motility and vigor, post-thawing by slow term-resistance test, the times T0, T60, T120 and T180 minutes one week after. For the mitochondrial activity evaluation, was used cationic lipophilic fluorochrome JC-1. The folic acid effects were analyzed using ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. The groups with folic acid showed significant higher motility. Mitochondrial activity did not differ between groups.*

**Keywords:** semen, antioxidant, folic acid.

**Palavras-chave:** sêmen, antioxidante, ácido fólico.

### **Introdução**

A criopreservação de sêmen possibilita a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. Entretanto, a técnica promove alterações na qualidade seminal, como danos na cromatina, nas membranas e nas proteínas, afetando negativamente a funcionalidade e a sobrevivência dos espermatozoides (Ball, 2011).

Estudos mostraram que o uso de micronutrientes como antioxidantes adicionados ao diluidor, como por exemplo, vitamina E, vitamina C, melatonina, cobalamina e Ácido Fólico, melhoram a viabilidade espermática e previnem danos oxidativos (Ball, 2011). Descobriu-se que Ácido Fólico (vitamina B<sub>9</sub>) é necessário para replicação de genes celulares e é eficiente na inibição da peroxidação lipídica e na desoxidação dos radicais livres por proteger a membrana celular e DNA, podendo assim, ser o antioxidante de eleição (Joshi et al., 2001).

Considerando os danos causados pela criopreservação, os corantes fluorescentes (sondas epifluorescentes ou fluorocromos) são indicadores sensíveis e específicos da situação espermática, sendo utilizados na mensuração das alterações estruturais e metabólicas no interior das células (Pereira et al., 2012).

Objetivou-se avaliar o efeito da adição do Ácido Fólico (vitamina B<sub>9</sub>) ao diluidor TRIS-gema utilizado na criopreservação, buscando melhorias na criopreservação quanto à cinética espermática e atividade mitocondrial, apresentando maior viabilidade pós-descongelação.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, CCA - UFPI. Foram utilizados seis reprodutores da raça Santa Inês, com qualidade seminal comprovada de acordo com Manual para Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Foram realizadas sete coletas de cada animal pelo método de vagina artificial, com auxílio de uma fêmea em estro. Os tubos coletores foram mantidos a 37°C durante avaliação dos aspectos físicos e diluição do sêmen. A concentração foi avaliada por meio da técnica Câmara de Neubauer e expresso em número de espermatozoides/mm<sup>3</sup>.

Após cada colheita, e análise macro e microscópica, as amostras de sêmen dos seis ovinos foram misturadas e submetidas a formação do *pool*. Em seguida o *pool* foi diluído em meio de criopreservação Tris-Gema, e dividido em 3 grupos: o Grupo 1 controle; Grupo 2 adicionado 10000 uM de Ácido Fólico; Grupo 3 adicionado 5000 uM de Ácido Fólico de maneira que cada dose inseminante apresentasse 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/0,25mL. Posteriormente as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), congeladas e transferidas para o botijão criobiológico (-196°C em N<sub>2</sub>).

Avaliou-se motilidade e do vigor pós-descongelação através do teste de Termoresistência Lenta, nos tempos T0, T60, T120 e T180 minutos, uma semana depois.

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Aliquotas de 50 µL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38° C. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus, Japão), com aumento de 400 x

usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

Todos os dados foram apresentados como médias  $\pm$  desvio da média. Utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls utilizando o Statistical Analysis System (SAS). Os valores foram determinados a ser significativos quando  $P \leq 0,05$ .

### Resultados e Discussão

Após as análises, observou-se, quanto ao teste de Termoresistência Lenta, diferença significativa na motilidade dos grupos 2 e grupo 3, onde foi adicionado Ácido Fólico, em relação ao grupo controle, conforme apresentado na Tab. 1. Na mesma Tabela, foi observado que não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao vigor espermático.

Na Tab. 2, estão representados os valores da atividade mitocondrial dos espermatozóides após a avaliação da termoresistência espermática. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos estudados.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão da motilidade e vigor espermático pós-descongelamento durante o teste de Termoresistência Lento (TTR).

	Motilidade	Vigor
Grupo 1 – controle	33,3 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>	2,42 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Grupo 2 – 10000 uM de Ácido Fólico	41,1 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Grupo 3 – 5000 uM de Ácido Fólico	40,9 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão da avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozóides pós-descongelamento.

	Mitocôndria	
	Integra	Lesionada
Grupo 1 – controle	53,6 $\pm$ 11,6 <sup>a</sup>	46,3 $\pm$ 11,6 <sup>a</sup>
Grupo 2 – 10000 uM de Ácido Fólico	51,6 $\pm$ 12,5 <sup>a</sup>	48,3 $\pm$ 12,5 <sup>a</sup>
Grupo 3 – 5000 uM de Ácido Fólico	51,1 $\pm$ 11,2 <sup>a</sup>	48,9 $\pm$ 11,2 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

O Ácido Fólico foi utilizado por haver na literatura evidência científica da ação antioxidante desse medicamento, e/ou em associação com vitaminas no tratamento da subfertilidade com efeito benéfico ou neutro (Ramasamy et. al., 2012).

Os resultados obtidos na pesquisa mostraram que adição de 5000 uM e 10000 uM de Ácido Fólico diretamente no *pool* de sêmen foi benéfico para a motilidade espermática do sêmen ovino. Imhof et. al., (2011) observaram aumento significativo na concentração, motilidade (progressiva e total) e da porcentagem de morfologia normal em comparação ao grupo controle em homens inférteis tratados durante 3 meses com micronutrientes, dentre eles, Ácido Fólico. Entretanto, Maia (2009) mostrou que o uso oral diário de Ácido Fólico (5 mg) e outros micronutrientes como selênio e zinco, por um período de 90 dias não melhorou estatisticamente a concentração e motilidade, e sim a morfologia dos espermatozóides.

De acordo com Al-Maskari et al., (2012), o Ácido Fólico, o zinco e as cobalaminas se complementam e atuam sinergicamente nas vias metabólicas potencializando seus efeitos. Apesar do Ácido Fólico, da vitamina B<sub>12</sub> e do zinco serem essenciais para síntese de RNA e DNA, os mecanismos por trás do efeito desses micronutrientes na espermatogênese ainda não estão claros (Wong et al., 2002). Assim, supõe-se que a associação com a vitamina B<sub>12</sub> poderia ter gerado resultados melhores no presente estudo.

A utilização de micronutrientes com potencial antioxidante indica ter reduzido a ação dos radicais livres, que alteram a membrana plasmática e o DNA espermático. Isso causaria a diminuição do número de espermatozóides com formas anormais, e, conseqüentemente com uma melhor motilidade. Maia (2009) explicitou que a redução do número de espermatozóides anormais poderia diminuir também a quantidade de ROS no sêmen. Desta maneira, um sêmen com menor quantidade de ROS e maior quantidade de antioxidante reduziria os danos provocados pelos radicais livres nas biomoléculas.

A atividade mitocondrial dos espermatozóides pós-descongelados não apresentou diferença significativa, porém, em todos os grupos observou-se mais mitocôndrias integras. Silva (2011) indicou que quanto mais células com mitocôndria sem atividade maior o percentual de células com a membrana lesada. Hipoteticamente isso ocorre devido as espécies reativas de oxigênio causar danos de membrana e mitocôndria,



POTENCIALIZANDO o estresse oxidativo.

### Conclusão

Concluiu-se que a adição de 5000 uM e 10000 uM do Ácido Fólico ao diluidor seminal influenciaram na motilidade do sêmen ovino criopreservado, possibilitando o uso do Ácido Fólico como um melhorador da viabilidade espermática e da eficiência reprodutiva. Porém ainda são necessários mais estudos e uma padronização dos fármacos a serem associados, da dosagem e da duração da terapia.

### Referências

- Al-Maskari MY, Mostafa I, Waly MPH, Amanat ALI, Yusra S, Allal Ouhtit MPH.** Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. *Nutrition*, v. 28, p.23-26, 2012.
- Ball BA.** Oxidative stress in sperm. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Eds.). *Equine Reproduction*. 2a. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011, p.991-995.
- Colégio Brasileiro de Reprodução (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed. 104p. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Guthrie HD, Welch GR.** Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci*, v.84, p.2089-2100, 2006.
- Imhof M, Lackner J, Lipovac M, Chedraui P.** Micronutrient supplementation increases sperm quality in the subfertile male. *European Urology Review*, v.6, p.120-23, 2011.
- Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T.** Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Rad Biol Med*, v.30, p.1390-1399, 2001.
- MAIA FA.** Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral. 2009. 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- Pereira KF, Garcia AR, Nahúm BS, Kahwage PR.** Uso de sondas de epifluorescência para a avaliação de sêmen criopreservado bubalino. In: Seminário de Iniciação Científica da Embrapa, 2012, Belém. *Anais...* Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2012. p.1-4.
- Ramasamy R, Stahl P, Schlegel P.** Medical therapy for spermatogenic failure. *Asian J Androl*, v.14, p.57-60, 2012.
- Silva ROC.** Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino. 2011. 83p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- Wong WY, Merkus JMWM, Thomas CMG, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM.** Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*, v. 77, p. 491-498, 2002.



## **Adição do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa*) ao diluidor citrato-glicose-gema na motilidade do sêmen ovino resfriado por 24h: estudos preliminares**

*Addition of mangabeira latex (*Hancornia speciosa*) to citrate-glucose-egg yolk extender on motility of ram semen cooled for 24 hours: preliminary studies*

**José Maurício Maciel Cavalcante\*, Anderson Leandro Santos da Silva, Luiz Antônio Tomazzoni, Idenilson Freitas Cardoso**

Instituto Federal do Piauí, Campus Uruçuí, PI, Brasil.

\*E-mail para correspondência: mauricio.cavalcante@ifpi.edu.br

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate the effect of different concentrations of mangabeira latex (*Hancornia speciosa*) added to ram semen extender on motility of cooled semen stored for 24 hours. The latex was added to citrate-glucose-yolk extender in concentrations of 0% (control), 2%, 4% and 6% (v:v) and diluted with Santa Inês ram semen and cooled to 4°C for 24h. The semen was evaluated for sperm motility and vigor. No statistical differences were found for fresh semen and the treatments with the addition of latex. These results indicate that no improvement in ram semen quality cooled and stored for 24 by the addition of mangabeira latex.*

**Keywords:** latex, antioxidant, ram semen.

**Palavras-chave:** látex, antioxidante, sêmen ovino.

### **Introdução**

A inseminação artificial ovina permite uma rápida propagação da genética de animais selecionados, promovendo aumento da produtividade de rebanhos (Ashrafi *et al.*, 2011). Apesar do uso do sêmen resfriado (4-5°C) resultar em taxas satisfatórias de prenhez na inseminação cervical, estas declinam rapidamente se utilizado sêmen resfriado após 24h de armazenamento em virtude da rápida deterioração da célula espermática, possivelmente relacionado ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas durante o armazenamento do sêmen (Salamon e Maxwell, 2000).

Isto têm estimulado o desenvolvimento de novos diluidores que aumentem a durabilidade do sêmen ovino conservado. Uma alternativa é o uso de extratos de plantas aos diluidores de sêmen pela presença de substâncias bioativas com propriedades antioxidantes, tais como flavonoides, polifenóis e terpenos (Zhong e Zhou, 2013). Dentre as plantas típicas do Nordeste, a mangaba destaca-se por ser uma boa fonte de antioxidantes (Almeida *et al.* 2011). Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) ao diluidor na motilidade de espermatozoides ovinos resfriados por 24h.

### **Material e Métodos**

O látex da mangabeira foi obtido pela incisão do caule com lamina de aço inoxidável e mantido a 4°C até uso. O látex foi adicionado ao diluidor citrato-glicose-gema (Maxwell e Evans, 1990) nas concentrações de 0% (controle), 2%, 4% e 6% (v:v), formando os tratamentos experimentais. Devido à polimerização do látex, estes diluidores foram centrifugados (3000 rpm/10 min) para descarte do látex polimerizado.

Ejaculados de cinco carneiros Santa Inês de criatório particular do município de Uruçuí-PI foram obtidos de três coletas realizadas semanalmente com uso de vagina artificial. O sêmen foi diluído em cada tratamento na proporção 1:9 (sêmen:diluidor) e em seguida resfriado a 4°C em 90 min. e mantido nesta temperatura por 24h. Após este período, o sêmen foi incubado a 37°C por 5 min. e avaliado subjetivamente quanto ao percentual de espermatozoides móveis e vigor conforme Maxwell e Evans (1990).

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Os dados foram considerados não-paramétricos após avaliação para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado na comparação dos tratamentos entre si ( $P < 0,05$ ) com uso do programa estatístico SYSTAT 12 for Windows<sup>®</sup>.

### **Resultados e Discussão**

Os resultados estão apresentados na Tab. 1. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o sêmen fresco e os tratamentos com adição do látex da mangabeira na qualidade de espermatozoides ovinos resfriados por 24h ( $P=0,73$ ), indicando que o tempo de armazenamento não interferiu de forma significativa na motilidade espermática. Este resultado contradiz com os encontrados na literatura (Salamon e Maxwell, 2000) e pode se dever ao fato de não ter havido acúmulo de ROS no período o suficiente para afetar a qualidade seminal. Além disso, vale ressaltar que a presença de látex polimerizado residual, mesmo após a centrifugação, dificultou a visualização dos espermatozoides na adoção de outras técnicas de avaliação da qualidade seminal como o uso de corantes vitais e do teste hiposmótico.



Tabela 1. Média±desvio-padrão do percentual de espermatozoides móveis e vigor para o sêmen fresco (ejaculados) e resfriado (4°C/24h) nos tratamentos com adição de látex de mangabeira (*Hancornia speciosa*) ao diluidor citrato-glicose-gema.

Tratamentos	Percentual de móveis (%)*	Vigor (0-5)*
Semen fresco	70,0 ± 34,6	3,5 ± 0,9
0%	60,0 ± 34,6	3,5 ± 0,5
2%	60,0 ± 34,6	2,8 ± 0,6
4%	53,3 ± 25,2	2,7 ± 0,6
6%	63,3 ± 28,9	3,5 ± 0,5

\*Os tratamentos não diferiram entre si para os parâmetros avaliados.

### Conclusão

A adição de látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) ao diluidor seminal não resultou em melhoria na qualidade do sêmen ovino resfriado armazenado por 24h. Entretanto, novos estudos como a avaliação do potencial antioxidante presente no látex utilizado, maiores tempos de conservação do sêmen e de métodos que minimizem o processo de polimerização do látex se fazem necessários para uma avaliação em definitivo do potencial uso deste produto vegetal.

### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com recursos obtidos de projetos aprovados pelos editais IFPI ProAgrupar Infra (Edital no. 59/2015) e PIBIC/PIBIC-Jr (Edital no.57/2015).

### Referências

- Almeida MMB, Sousa PHM, Arriaga AMC, Prado GM, Magalhães CEC, Maia GA, Lemos TLG.** Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, v.44, p.2155-2159, 2011
- Ashrafi I, Kohram H, Naijian H, Bahreini M, Poorhamdollah M.** Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5°C. *African J Biotechnol*, v.10, p.6670-6674, 2011.
- Maxwell WMC, Evans G.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia, S.A.: Madrid, 1990
- Salamon S, Maxwell WM.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Zhong R-Z, Zhou D-W.** Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of Integrative Agriculture*, v.12, p.1826-1838, 2013



## **Angiotensina-(1-7): Efeito na maturação *in vitro* de oócitos ovinos**

*Angiotensin- (1-7): Effect on in vitro maturation of sheep oocytes*

**Andréia da Silva Costa\*, Muriel Alves Carvalho, Amilton Paulo Raposo Costa, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, Marina Carvalho Leite, Terysdalva Pereira da Costa, Yanne Aciole da Silva, Lauro César Soares Feitosa**

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: andreaia\_vet@hotmail.com

### **Abstract**

*Aimed to evaluate the effect of addition of angiotensin-(1-7) in the middle of in vitro maturation of sheep oocytes. Seventy-four oocytes of sheep ovaries slaughtered in fridge were matured in vitro: I - control (n=22), II - Ang-(1-7) at 1  $\mu$ M (n=24), III - Ang-(1-7) at 1  $\mu$ M+A-779 at 1 $\mu$ M (n=28) in microdroplets containing 100  $\mu$ L of maturation medium plus 10% fetal bovine serum under mineral oil in the incubator atmosphere 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C for a period of 18 hours. After this period, the oocytes were denuded and observed the extrusion of the first polar body. Statistical analysis was performed using the t test at 5% probability. The addition of angiotensin-(1-7) at 1  $\mu$ M, as well as the addition of angiotensin-(1-7) at 1  $\mu$ M together with its specific antagonist A-779 at the same concentration, decrease the in vitro maturation rate ovine oocytes.*

**Keywords:** *in vitro* production, reproductive bio techniques, small ruminants.

**Palavras-chave:** produção *in vitro*, biotécnicas reprodutivas, pequenos ruminantes.

### **Introdução**

A ovinocultura é uma das mais importantes atividades econômicas do semiárido nordestino. O aprimoramento de técnicas reprodutivas existentes, tais como a Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE), constituem uma importante ferramenta para o seu desenvolvimento. Mas para isso os conhecimentos detalhados das peculiaridades reprodutivas desta espécie são de extrema importância. Exemplo disso é a importância em se conhecer os efeitos da Angiotensina-(1-7) (um peptídeo do Sistema Renina-Angiotensina - SRA) no sistema reprodutivo feminino, uma vez que pesquisas relatam a presença deste peptídeo em ovários de várias espécies dentre elas as ovelhas (Pereira et al., 2015).

Um dos pontos cruciais na PIVE é o processo de maturação oocitária, pois é nessa etapa que o ovócito adquire competência, ou seja, ele se torna capaz de completar a maturação, ser fertilizado e suportar o desenvolvimento embrionário inicial (Hyttetz et al., 1997, citado por Máximo, 2009). Baseado nisso, este projeto tem o objetivo de avaliar o efeito da adição de Angiotensina-(1-7) ao meio de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

### **Material e Métodos**

O presente projeto foi aprovado pelo “Comitê de Ética no Uso de Animais” da Universidade Federal do Piauí (CEUA-UFPI) sob o número de registro 162/16 e foi desenvolvido no Laboratório de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Socopo, Teresina-PI. Os ovários foram obtidos de fêmeas ovinas, sem padrão racial definido (SPRD), abatidas no frigorífico Piauí, Teresina-PI e transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução de DMPBS a uma temperatura de 37°C. No laboratório, os ovários eram lavados com solução de DMPBS a 37°C e os complexos cumulus-oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos, utilizando agulha descartáveis 25 x 8 mm (21G), acoplado a uma seringa de 5 mL. O líquido folicular obtido era colocado em um tubo do tipo Falcon de 15 mL e armazenado em Banho-Maria a 37°C durante 20 minutos para sedimentação.

O conteúdo do aspirado folicular era depositado em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para pesquisa sob uma lupa estereomicroscópica. Os CCOs selecionados eram transferidos para uma placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus e, em seguida, eram avaliados e selecionados de acordo com a presença e disposição das células do cumulus e aparência do ooplasma, segundo a classificação de Baldassarre et al. (2003). Brevemente, os CCOs foram avaliados como Grau I (oócito com zona pelúcida intacta, ooplasma homogêneo e circundado completamente por uma ou mais camadas de células do cumulus), Grau II (oócito com zona pelúcida intacta, ooplasma homogêneo e circundado parcialmente por uma ou mais camadas de células do cumulus), Grau III (oócito com zona pelúcida intacta, ooplasma homogêneo e sem presença de células do cumulus) ou Grau IV (oócito apresentando zona pelúcida rompida ou ooplasma heterogêneo/retraído). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) eram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos. Para avaliar o efeito da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] na maturação oocitária, foram utilizados 74 oócitos, cultivados na ausência ou presença de Ang-(1-7), G-1 e G-2, respectivamente. Para confirmação do efeito da Ang-(1-7), o grupo 3 (G-3) recebeu Ang-(1-7) adicionado ao seu antagonista específico A-779 (D-ala-779) na mesma



concentração, ficando os tratamentos como descritos: Grupo I – Controle (n= 22 oócitos), Grupo II - Ang-(1-7) a 1  $\mu$ M (n= 24 oócitos), Grupo III - Ang-(1-7) a 1  $\mu$ M + A-779 a 1  $\mu$ M (n= 28 oócitos).

Os CCOs selecionados eram lavados em meio de maturação e maturados de acordo com os tratamentos em microgotas contendo 100  $\mu$ L de meio de maturação, acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,5°C por um período de 18 horas. Após este período, os oócitos foram desnudados (remoção das células dos cumulus) em tubo de 5ml, com 0,3 ml de DMPBS acrescida de 1% de SFB, e agitados no “vortex” por 10 minutos ficando o oócito desnudo e observando a extrusão do primeiro corpúsculo polar. A análise estatística foi realizada pelo teste t a 5% de probabilidade.

### Resultados e Discussão

Verificou-se que o uso de angiotensina-(1-7) na concentração de 1  $\mu$ M em meio de maturação *in vitro* diminuiu a taxa de maturação de oócitos ovinos. Entretanto, a sua adição a 1  $\mu$ M acrescida de seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, também diminuiu a taxa de maturação (Tab. 1).

Tabela 1. Avaliação quantitativa de oócitos ovinos submetidos à maturação *in vitro* sem ou com angiotensina (1-7) no meio de cultivo.

Grupos	Controle (n=22)	Ang-(1-7) a 1 $\mu$ M (n= 24)	Ang-(1-7) a 1 $\mu$ M + A-779 a 1 $\mu$ M (n=28)	Total (n= 74)
Taxa de maturação	45,50% <sup>a</sup> (10/22)	16,66% <sup>b</sup> (4/24)	14,30% <sup>b</sup> (4/28)	24,32% (18/74)

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que com o tratamento controle (ausência do uso de angiotensina-(1-7)) conseguiu-se maturar 45,50% dos oócitos destinados a este grupo, o melhor valor obtido no experimento.

Segundo Mingoti (1999) quanto maior a concentração de estradiol em oócitos maior a porcentagem de oócitos que atingem a fase M II. Desta forma a adição de Ang-(1-7) ao meio de maturação pode levar à produção de estradiol via ativação da proteína PI3K/Akt e sua produção pelo cumulus. Tais fatos justificaram a adição de angiotensina-(1-7) ao meio de maturação do grupo G-2. Entretanto observou-se uma diminuição e não um aumento desta maturação. Segundo Kruip et al. (1988) citado por Mingoti (1999), quando presente em altas concentrações em meio de cultivo MIV, o estradiol parece ter um efeito prejudicial provavelmente ao exercer um efeito adverso na formação do fuso e na extrusão do corpúsculo polar. Isto pode justificar a diminuição da maturação quando se acrescentou angiotensina-(1-7) na concentração de 1  $\mu$ M ao meio. Esta concentração pode ter aumentado a quantidade de estradiol de forma demasiada. Entretanto, a importância de angiotensina-(1-7) ao meio de maturação *in vitro* não foi descartada, uma vez que quando adicionado seu antagonista específico na mesma concentração, o bloqueio de angiotensina-(1-7) também levou a uma diminuição na taxa de maturação.

Desta forma, estudos com adição de angiotensina-(1-7) em concentrações abaixo de 1  $\mu$ M tornam-se necessários, uma vez que a angiotensina-(1-7) possa exercer influência benéfica na maturação *in vitro* através da produção de estradiol em níveis não demasiados e portanto não deletérios.

### Conclusão

Conclui-se que a adição de angiotensina-(1-7) a 1  $\mu$ M, bem como a adição de angiotensina-(1-7) a 1  $\mu$ M juntamente com o seu antagonista específico A-779 na mesma concentração, diminuem a taxa de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

### Referências

- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapoint J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN.** Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v. 59, p.831-839, 2003.
- Máximo DM.** Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro*. 2009. 51p. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Animais). Brasília, DF: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.
- Mingoti GZ.** Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do Soro Sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteroides. 1999. 53p. Tese (Doutorado) Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.
- Pereira AM, Souza Junior A, Machado FB, Gonçalves GK, Feitosa LCS, Reis AM, Santos Santos RAS, Honorato-Sampaio K, Costa AR.** The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition throughout a superovulation protocol in ewes. *Res Vet Sci*, v.103, p.205-210, 2015.



## **Atividade estral e ovulatória de cabras submetidas à sincronização do estro com esponjas intravaginais impregnadas com óleos essenciais de *Vitex agnus castus* L**

*Estrous and ovulatory activity of goats submitted to estrus synchronization with intravaginal sponges impregnated with essential oils of *Vitex agnus castus* L*

**Hélder Anderson Lima Silva<sup>1</sup>\*, George Antonio Maciel Mudo<sup>1</sup>, Laisa Gomes Medeiros Ribeiro<sup>1</sup>, Bruna Dias Manguiera Bastos<sup>1</sup>, Ana Arlete de Amorim Silva<sup>1</sup>, Gabriela Lemos de Azevedo Maia<sup>2</sup>, Mabel Freitas Cordeiro<sup>1</sup>, Edilson Soares Lopes Júnior<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Brasil; <sup>2</sup>Colegiado de Farmácia, UNIVASF, Petrolina, Brasil.

\*E-mail: helder.murcego@gmail.com

### **Abstract**

*In order to evaluate the estrous and ovulatory activities of goats submitted to estrus synchronization with essential oils of *Vitex agnus castus* L. (OEVAC), 48 Anglo Nubian goats were divided into four groups (n=12) for estrus synchronization: MAP-COM group, 75 µg of D-cloprostenol was intramuscularly (im) administered and one intravaginal sponge impregnated with 60 mg of MAP was deposited and removed five days later when it was injected im 300 IU eCG; MAP-ART group with similar treatment of MAP-COM, but intravaginal sponges were manually prepared and impregnated with 60 mg of MAP; in the OEVAC60 and OEVAC120 groups it was performed the same as in MAP-COM, but intravaginal sponges were impregnated with 60 mg and 120 mg of OEVAC, respectively. The use of intravaginal sponges impregnated with 60 mg of the OEVAC it is able to synchronize estrus but not the ovulation in goats.*

**Keywords:** device, goat, plant.

**Palavras-chave:** dispositivo, caprino, planta.

### **Introdução**

Os tratamentos progestágenos de sincronização do estro são, comumente, associados com a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e análogos da prostaglandina F2α (PGF<sub>2α</sub>). No entanto, a sincronização do estro e da ovulação tem seu uso limitado em função do elevado custo e de resultados instáveis. Alguns estudos sobre a planta *Vitex agnus castus* L. têm demonstrado que ela aumenta dos níveis de progesterona e reduz sintomas da síndrome pré-menstrual na mulher (Tesch, 2003). Todavia, não existem estudos no tocante ao efeito do uso do óleo essencial da *Vitex agnus castus* L. como substância alternativa na sincronização do estro de cabras utilizando o princípio do alongamento do ciclo estral. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de esponjas intravaginais impregnadas com óleos essenciais da planta *Vitex agnus castus* L. na sincronização do estro e da ovulação em cabras.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, em Petrolina, Pernambuco. Foram utilizadas 48 cabras Anglo-Nubiana, com idade de (média ± desvio padrão) 2,5 ± 1,0 anos, escore de condição corporal 3,2 ± 0,4 e com, no mínimo, duas parições. Todas as cabras foram distribuídas em quatro grupos (n = 12) para indução do estro: no grupo 1 (MAP-COM), foi administrado intramuscularmente (im) 75 µg de d-cloprostenol e depositado uma esponja intravaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), a qual foi retirada cinco dias depois. No dia da retirada das esponjas, as cabras receberam im 300 UI de eCG; no grupo 2 (MAP-ART), foi realizado o mesmo que no MAP-COM, sendo, porém, utilizadas esponjas intravaginais preparadas artesanalmente e injetadas com 60 mg de MAP; os grupos 3 (OEVAC60) e 4 (OEVAC120) foram semelhantes ao MAP-COM, mas a esponja intravaginal foi impregnada com 60 mg e 120 mg de óleo essencial de *Vitex agnus castus* L., respectivamente. Decorridas 12 horas da retirada das esponjas, iniciou-se a detecção do estro, sendo repetida a cada quatro horas. Foram efetuadas colheitas de sangue para avaliar do status ovariano, antes, durante e após os tratamentos hormonais de sincronização do estro. As colheitas foram realizadas nos seguintes momentos: sete dias antes à inserção do dispositivo intravaginal de sincronização do estro (D-7), na inserção do dispositivo (D0) e, diariamente, sempre às 06:00 h, entre os dias 1 e 5 (D1, D2, D3, D4, D5) e 14 dias após a retirada dos dispositivos. A concentração plasmática de progesterona foi determinada pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida (RIA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Friedman (P < 0,05). Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste Exato de Fisher.

### **Resultados e Discussão**

Não houve diferença significativa (P > 0,05) entre grupos para a porcentagem de animais em estro. Segundo Lucks (2003), os componentes do OEVAC podem atuar no eixo hipotalâmico hipofisário, diminuindo a



secreção de FSH e LH, bem como aumentando a liberação de progesterona. As cabras do grupo OEVAC60 iniciaram seus estros no mesmo intervalo após a retirada da esponja que os animais tratados com as esponjas comerciais e impregnadas com MAP (grupo MAP-COM). A partir do primeiro dia após o início dos tratamentos de sincronização do estro, houve uma queda nas concentrações de progesterona em todos os grupos para 0 ng/mL e esta concentração foi observada até o último dia do tratamento. Os progestágenos atuam no nível do eixo hipotalâmico hipofisário, influenciando, de forma negativa, a secreção tônica e o pulsátil de LH, diminuindo assim sua amplitude e frequência (Diskin; Austin; Roche, 2002). Além disso, no 14º dia após a retirada das esponjas, as concentrações plasmáticas de progesterona nas cabras dos grupos MAP-COM e MAP-ART foram superiores ( $P < 0,05$ ) àquelas dos animais pertencentes aos grupos OEVAC60 e OEVAC120. Possivelmente, os constituintes químicos da *Vitex agnus castus* agiram em sinergismo com uma função de progesterona o que pode ter acarretado um bloqueio na liberação de FSH, enquanto que a secreção do hormônio luteinizante foi estimulada. Embora ambas as gonadotrofinas sejam produzidas pelo mesmo tipo celular, são secretadas de forma diferenciada. Sugere-se, então, que houve uma prematura luteinização das células granulosa e células da teca.

### **Conclusão**

Portanto, o uso de esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de OEVAC é capaz de sincronizar o estro, mas não a ovulação de cabras.

### **Referências**

- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF.** Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol*, v.23, p.211-228, 2002.
- Lucks BC.** Vitex agnus castus essential oil and menopausal balance: a research update. *Complementary Therapies in Nursing and Midwifery*, v.8, p.148-154, 2003.
- Tesch BJ.** Herbs commonly used by women: an evidence-based review. *Am J Obstet Gynecol*, v.188, p.44-55, 2003.



## **Avaliação andrológica de ovinos do Núcleo de Ruminantes da UEMA – Campus Paulo VI** *Evaluation andrologic of Ruminant Center of cattle from UEMA - Campus Paulo VI*

**Joanna Jéssica Sousa Albuquerque<sup>1</sup>\*, Sérgio Henrique Costa Júnior<sup>1</sup>, Hallel Mithchel Pereira Trovão<sup>1</sup>, Talyta Luiza Miranda Lima<sup>1</sup>, Marcella Matos Pereira Coelho<sup>1</sup>, Diego Santos Almeida<sup>2</sup>, Felipe de Jesus Moraes Júnior<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos em Medicina Veterinária, CCA/UEMA; <sup>2</sup>Mestre em Ciência Animal, Mestrado em Ciência Animal, UEMA;

<sup>3</sup>Bolsista de Pós-doutorado, Mestrado em Ciência Animal/CAPES, UEMA, São Luís, MA, Brasil.

\*E-mail: albuquerque\_joanna@hotmail.com

### **Abstract**

*The aim of the study was to characterize andrologically sheeps belonging to Ruminants Center of Universidade Estadual do Maranhao. The semen collection was performed by electro ejaculation. The body condition score from seven animals showed averaging  $4.57 \pm 1.13$ . The scrotal circumference (SC) was  $30.58 \pm 4.91$  cm, a scrotal circumference of rams presented mean length and width of the right testicle of  $9.43 \pm 1.16$  cm and  $5.44 \pm 0.46$  cm and the left testicle of  $9.0 \pm 0.81$  cm and  $5.51 \pm 0.41$  cm, respectively. The average volume of semen obtained was  $0.89 \pm 0.32$  mL, appearance, color and odor sui generis were for the species. For physical semen parameters, the average turbulence was  $3.57 \pm 0.53$ ; force of  $3.14 \pm 0.38$ ; Sperm motility of  $81.43 \pm 6.90\%$ ; sperm concentration of  $0.8 \pm 0.18 \times 10^9$  spz / mL. The proportion of living and dead sperm stained with eosin-nigrosin averaged  $74.1 \pm 3.02\%$  and  $25 \pm 3.46\%$ , respectively. According to this study and the results obtained, sheep showed morphology and physical aspects consistent with the species and can be used as breeders.*

**Keywords:** *Ovis aries, reproduction, semen.*

### **Introdução**

A ovinocultura no Brasil cresceu significativamente nos últimos anos. Onde onordeste brasileiro, de acordo com o IBGE (2008), possui 54,6% do efetivo nacional, sendo o regime extensivo amplamente adotado, ocasionando baixa resposta produtiva e reprodutiva.

Como método de seleção, o exame andrológico consiste na obtenção de informações a partir de exames macroscópicos e microscópicos que permite estimar o potencial de desempenho dos machos como reprodutores, assim, aumentando os índices produtivos de um rebanho (Monteiro et al., 2014).

Hoje no Estado do Maranhão observa-se um crescimento no uso de biotecnologias da reprodução, para tanto são necessários novos estudos com finalidade de incentivar o incremento do rebanho estadual. Dessa forma o objetivo do trabalho foi caracterizar andrologicamente ovinos pertencentes do Núcleo de Ruminantes da Universidade Estadual do Maranhão.

### **Material e Métodos**

O estudo foi realizado na cidade de São Luís (02° 31' 47" S 44° 18' 10" W), Maranhão, especificamente no Núcleo de Ruminantes, localizado na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Para tanto, sete ovinos SRD com idade média de 5 anos, submetidos a regime semi-intensivo, alimentados com volumoso e sal mineral, foram submetidos ao exame andrológico de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 1998. O aparelho genital externo foi mensurado utilizando um paquímetro e fita métrica. A colheita do sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação. Após a ejaculação, uma alíquota foi analisada imediatamente quanto aos aspectos macroscópicos (volume, cor e odor) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade e vigor), sendo retirada uma alíquota e diluída em formol salina a 1% para posterior concentração espermiática. As amostras foram coradas com eosina-nigrosina, um corante vital, para avaliar a integridade da membrana plasmática sendo realizada a leitura em microscopia óptica (Microscópio Nikon Eclipse 50i).

### **Resultados e Discussão**

Os sete animais apresentavam um bom estado nutricional, com média de escore corporal de  $4,57 \pm 1,13$ , o que corrobora com os padrões estabelecidos segundo o CBRA (1998), onde os animais que apresentam escore superior a 3 são os que proporcionam uma melhor resposta reprodutiva. Quanto à análise do aparelho genital externo, o perímetro escrotal (PE) foi de  $30,58 \pm 4,91$  cm, estes resultados corroboram com a média encontrada por Leal *et al.* (2002) que obteve 29,82 2,51 de ovinos criados em regime semi-intensivo.

A biometria testicular dos carneiros apresentou médias de comprimento e largura do testículo direito de  $9,43 \pm 1,16$  cm e  $5,44 \pm 0,46$  cm e do testículo esquerdo de  $9,0 \pm 0,81$  cm e  $5,51 \pm 0,41$  cm, respectivamente, diferindo do comprimento e na largura testicular direito e,  $7,90 \pm 0,85$  e  $5,73 \pm 0,48$ , respectivamente, encontrado por Monteiro et al. (2014). A biometria testicular esquerda foi superior aos valores encontrados por Louvadini et al. (2008) que obteve média de  $7,8 \pm 0,94$  e  $4,9 \pm 0,94$  do comprimento e largura testicular



esquerda, respectivamente.

O volume médio obtido de sêmen foi  $0,89 \pm 0,32$  mL, estando de acordo como proposto por Aisen e Venturino (2008) que define um volume ejaculado normal entre 0,3 e 1,5 mL, porém, foi inferior a Bernal et al. (2007) que obteve uma média de  $1,08 \pm 0,20$  mL de ovinos após a estação de monta. Rodrigues et al. (2005) obteve a média superior ao encontrado no presente estudo de  $1,22 \pm 0,35$  de volume seminal em ovinos utilizando eletroejaculador no Estado do Ceará.

O aspecto, a cor e odor foram *sui generis* para a espécie. Para os aspectos físicos do sêmen, a média de turbilhonamento foi de  $3,57 \pm 0,53$ ; vigor de  $3,14 \pm 0,38$ ; motilidade espermática de  $81,43 \pm 6,90\%$ ; concentração espermática de  $0,8 \pm 0,18 \times 10^9$  spz/mL, sendo superior à média da motilidade,  $71,67 \pm 11,69\%$ , e inferior à média do vigor  $3,83 \pm 0,75$ , encontradas por Bernal et al. (2005) no município de Londrina. O estudo corrobora com os padrões estabelecidos pelo CBRA (1998) nos valores preconizados do turbilhonamento, motilidade e vigor, porém inferior ao valor médio da concentração espermática.

A proporção de espermatozoides vivos e mortos corados com eosina-nigrosina teve média de  $74,1 \pm 3,02\%$  e  $25 \pm 3,46\%$ , respectivamente. Estes dados corroboram aos valores médios encontrados por Rodrigues et al. (2005) que obteve  $76,65 \pm 7,83$  e  $23,33 \pm 7,77$  de espermatozoides vivos e mortos, respectivamente.

### Conclusões

De acordo com o presente estudo e com os resultados obtidos, os ovinos apresentaram morfologia e aspectos físicos condizentes com a espécie e podem ser utilizados como reprodutores.

### Referências

- Aisen EG, Venturino A. Coleta e avaliação do sêmen. In: Aisen EG (Ed.) Reprodução Ovina e Caprina. 1.ed. São Paulo: Med Vet, p.57-73. 2008.
- Bernal PN, Sudano MJ, Sousa-Junior EB, Fala AM, Machado R. Exame andrológico de ovinos após a estação de monta. II Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste. p.15, 2007.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2a ed. p.31-35, 1998.
- Leal TL, Reis J C, Girão RN. Perímetro Escrotal e Características do Sêmen de Carneiros Deslanados da Raça Santa Inês: Estudo de Correlações. Revista Científica de Produção Animal. v.04, p.46-55, 2002.
- Louvadinni H, Macmanus C, Martins RD, Lucci CM, Corrêa PS. Características biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação proteica e tratamentos anti-helmínticos. Ciência Animal Brasileira. v.9, n.3, p.638-647, 2008
- Monteiro AWU, Lima ICS, Andrade IRA, Martins GA. Biometria testículo-epidimária e a reserva espermática epididimária de ovinos sem padrão racial definido. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal. v.08, p.81-98, 2014.
- Rodrigues LFS, Pinheiro RR, Santos DO, Eloy AMX, Almeida HCG. Parâmetros físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de ovinos da raça santa Inês criados no Estado do Ceará. II Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal, p.1-2, 2005.

## Avaliação automática da morfometria de espermatozoides ovinos com uso do programa ImageJ

*Automatic morphometric evaluation of ram sperm using the ImageJ software*

José Maurício Maciel Cavalcante\*, Anderson Leandro Santos da Silva, Luiz Antônio Tomazzoni, Idenilson Freitas Cardoso

Instituto Federal do Piauí, Campus Uruçuí, PI, Brasil.

\*E-mail: mauricio.cavalcante@ifpi.edu.br

### Abstract

*The objective of this study was to evaluate the ImageJ software in automatic analysis of morphometric parameters of ram sperm head. Semen smears from three Santa Inês rams were stained with fast panoptic and digital images of sperms from these smears were analyzed in ImageJ software for morphometric parameters. The mean dimensions of sperm heads analyzed were  $8,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ;  $4,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ;  $21,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$  and  $29,0 \pm 3,9 \mu\text{m}^2$  for length, width, perimeter and area, respectively. Individual variations for these parameters were observed. The ImageJ software was suitable for automatic sperm morphometric analysis with results consistent with those found in the literature.*

**Keywords:** CASMA, morphology, morphometry.

**Palavras-chave:** CASMA, morfologia, morfometria.

### Introdução

A avaliação da morfologia espermática comumente tem sido realizada de forma subjetiva (Verstegen et al., 2002) mas por sofrer variação entre diferentes avaliadores, tem sua aplicabilidade na predição da qualidade do sêmen limitada (Yániz et al., 2012). Assim, a necessidade de uma avaliação mais acurada, que meça as dimensões e perfil da cabeça de espermatozoides, levou ao desenvolvimento de sistemas computadorizados de análise da morfologia espermática (CASMA) (Verstegen et al., 2002)

Porém, os sistemas CASMA comerciais são caros (Butts et al., 2011). Sistemas automatizados utilizando programas gratuitos tem sido desenvolvido (Yániz et al. 2012), mas estes fazem uso de sondas fluorescentes para melhor digitalização dos espermatozoides, o que encarece a metodologia e reduz sua praticidade. Um sistema automatizado de análise morfométrica de espermatozoides de peixes foi desenvolvido utilizando *plugins* para o programa de imagens de código aberto ImageJ (Butts et al., 2011). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi utilizar estes *plugins* para o ImageJ na análise das medidas morfométricas da cabeça de espermatozoides ovinos visando avaliar sua aplicabilidade na morfometria espermática nesta espécie.

### Material e Métodos

Ejaculados de três carneiros Santa Inês, de criatório particular do município de Uruçuí-PI, obtidos de três coletas semanais com uso de vagina artificial, foram diluídos em solução de citrato-glicose (Maxwell e Evans, 1990) na proporção 1:9 (sêmen:diluidor) para confecção de esfregaços. Estes foram fixados em solução formol salina a 3%, corados em panóptico rápido comercial (Laborclin<sup>®</sup> Ltda) e montados permanentemente com lamínulas. Fotografias digitais dos espermatozoides ao microscópio óptico (400x) foram analisadas no programa ImageJ (National Institutes of Health, USA), com prévia instalação de *plugins* de análise de morfometria espermática conforme Butts et al. (2011). Imagens digitais de câmara de Neubauer foram usadas para calibração das distancias. Cem espermatozoides foram avaliados em cada esfregaço (Fig. 1) para comprimento, largura, perímetro (em  $\mu\text{m}$ ) e área (em  $\mu\text{m}^2$ ). Os resultados, expressos em média  $\pm$  desvio-padrão, foram comparados entre os reprodutores com uso da ANOVA seguido de teste de Tukey ( $P < 0.05$ ) com uso do programa estatístico SYSTAT 12 for Windows<sup>®</sup>.



Figura 1. Imagens digitais de espermatozoides ovinos antes (A) e após (B) análise automatizada da morfometria espermática com uso do plugins no programa ImageJ.



Tabela 1. Média  $\pm$  desvio-padrão do comprimento, largura, perímetro e área da cabeça dos espermatozoides ovinos dos animais analisados no ImageJ.

Animal	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
1	$8,4 \pm 0,6^b$	$4,4 \pm 0,3^b$	$21,7 \pm 1,4^b$	$28,9 \pm 3,5^b$
2	$8,9 \pm 0,4^a$	$4,6 \pm 0,2^a$	$23,0 \pm 1,0^a$	$31,8 \pm 2,5^a$
3	$7,8 \pm 0,2^c$	$4,1 \pm 0,2^c$	$20,1 \pm 1,0^c$	$25,1 \pm 2,6^c$

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas.

### Resultados e Discussão

Os valores médios para comprimento, largura, perímetro e área dos espermatozoides dos carneiros avaliados foram de  $8,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ;  $4,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ;  $21,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$  e  $29,0 \pm 3,9 \mu\text{m}^2$ , respectivamente, compatíveis com os resultados encontrados na literatura (Maroto-Morales et al., 2010; Yániz et al., 2012). Diferença estatística ( $P=0,001$ ) foi observada entre os animais para todos os parâmetros morfométricos avaliados (Tab. 1). Diferenças individuais tem sido relatadas e pode se dever a diferenças genotípicas dos animais que influenciam a morfologia espermática durante a espermatogênese (Maroto-Morales et al., 2010). Apesar destes animais possuírem mais de 90% de espermatozoides morfologicamente normais, o uso da análise automática no ImageJ permitiu constatar diferenças morfométricas entre os reprodutores.

### Conclusão

O uso no programa ImageJ mostrou-se prático, rápido, de fácil uso, com resultados compatíveis com os encontrados na literatura.

### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com recursos de projetos aprovados pelos editais IFPI ProAgrupar Infra (Edital no. 59/2015) e PIBIC/PIBIC-Jr (Edital no.57/2015).

### Referências

- Butts IAE, Ward MAR, Litvakc MK, Pitchera TE, Alavid SMH, Trippele EA, Rideoutf RM. Automated sperm head morphology analyzer for open-source software. *Theriogenology*, v.76, p.1756-1761, 2011.
- Maroto-Morales A, Ramon M, Garcia-Alvarez O, Soler AJ, Esteso MC, Martinez-Pastor F, Perez-Guzman MD, Garde JJ. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology*, v.73, p.437-448, 2010.
- Maxwell WMC, Evans G. Inseminación artificial de ovejás y cabras. Ed. Acribia, S.A.: Madrid, 1990.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Yániz JL, Vicente-FIEL S, Capistrós S, Santolaria P. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology*, v.77, p.1343-1350, 2012.



## **Avaliação das técnicas, imunodifusão em gel de agar (IDGA), ensaio imunoenzimático (ELISAI) e reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico da brucelose ovina**

*Evaluation of technical, immunodiffusion agar gel (AGID), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAI) and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of ovine brucellosis*

**Letícia Soares de Araújo Teixeira, Gustavo Henrique Chaves Martins, Misael das Virgens Santana, Francisco Felipe Ferreira Soares, Daniel Enrico Muller Dornelles, Allana Karolyne Figueredo de Brito, Patrícia Maria Almeida Queiros, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro\***

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

\*E-mail: lysbarradas@yahoo.com.br.

### **Abstract**

*Brucellosis in sheep has received a major focus, since it is a disease that affects the reproductive system of animals, causing serious impairment in the productive sector. Thus, three methods for the diagnosis of ovine brucellosis were evaluated as goal, the indirect ELISA test, the AGID technique and the PCR. Therefore, we used 211 sheep blood samples arising from properties of nine municipalities of the homogeneous micro-region of Teresina, Piauí. The 211 blood samples were subjected to the serologic testing and PCR to detect anti-*B. ovis* antibodies, and *Brucella ovis* DNA, respectively. Positive results in serological tests were obtained, 36 (17.06%) positive in the AGID test and seven (3.31%) positive to the ELISA test, however, there were no positive results in the PCR technique. The use of the techniques for the diagnosis of *B. ovis* infection is satisfactory, but the choice of blood as the biological sample for performing the direct diagnosis of ovine brucellosis is not recommended.*

**Keywords:** sheep, pcr, serology.

**Palavras-chave:** ovino, pcr, sorologia.

### **Introdução**

Observa-se que no Brasil, o crescimento acelerado de rebanhos ovinos voltados para o corte e a crescente exigência do comércio internacional para o controle sanitário animal, criaram uma demanda significativa de métodos de diagnósticos eficazes para as doenças infecto-contagiosas dos animais de produção (Marques et al., 2006). Assim, a brucelose na espécie ovina passou a ter maior importância em cenário nacional para os criadores de ovinos, com a finalidade de promover um maior controle da mesma, assim como, reduzir as perdas econômicas frente aos problemas reprodutivos que causa e às exigências vigentes.

Dentre os métodos sorológicos seguros e mais utilizados atualmente para o diagnóstico da brucelose ovina, tem-se a técnica de imunodifusão em gel de Ágar (IDGA), ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a fixação do complemento (FC). Assim como as provas sorológicas são requeridas para o diagnóstico da brucelose ovina, as provas moleculares também têm sido amplamente usadas substituindo-se o isolamento microbiano, uma vez que a PCR é uma prova eficiente, menos demorada, específica e sensível.

Ressaltando a grande importância econômica da espécie ovina e os prejuízos desencadeados pela infecção por *Brucella ovis*, objetivou-se a avaliação de três técnicas, sendo duas sorológicas, ELISA indireto e IDGA, e uma molecular, PCR. As mesmas foram escolhidas e aplicadas visando a investigação da real situação quanto a infecção por *B. ovis* em ovinos naturalmente infectados oriundos de nove municípios da microrregião homogênea de Teresina/Piauí, assim como a aplicabilidade como método de diagnóstico.

### **Material e Métodos**

Realizou-se coleta de amostras de sangue de 211 ovinos de diferentes faixas etárias e sexos distribuídos em 9 municípios correspondentes a microrregião homogênea de Teresina Piauí. As amostras foram obtidas através da punção da veia jugular após antissepsia com álcool iodado a 2%, com a utilização de sistema a vácuo e tubos sem anticoagulante para as amostras destinadas a provas sorológicas, e tubos com anticoagulante - EDTA para as amostras destinadas a prova molecular (PCR). Os tubos foram identificados com dados relativos ao município e a numeração animal. Os tubos contendo as amostras foram mantidos em uma caixa isotérmica contendo gelo para o transporte. As amostras foram submetidas a centrifugação 2.500g por 10 minutos para obtenção dos soros, posteriormente as técnicas foram realizadas. As amostras destinadas a PCR foram acondicionadas a -20°C até o momento da extração de DNA e realização da técnica molecular.

As amostras foram submetidas às técnicas de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) seguindo protocolo do kit fornecido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), o ensaio imunoenzimático indireto (ELISAI) que foi realizado de acordo com o descrito por Greves et al. (2010), e a reação em cadeia da polimerase visando a busca de DNA de *B. ovis*. A pcr foi realizada utilizando-se o par de primers: AO503 5'-GCCTACGCTGAACTTGCTTTTG-3'; 5'ATCCCCCATCACCATAACCGAAG-3' seguindo protocolo descrito por Xavier et al. (2010). A técnica de IDGA foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução na Universidade Federal do Piauí - UFPI, e as técnicas ELISA indireto e PCR foram realizadas no laboratório colaborador da pesquisa, no Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas



Gerais (UFMG).

Foi calculado a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos dos testes ELISA indireto e PCR, utilizando o programa BIOESTAT 5.3. A técnica IDGA foi considerada como teste padrão de triagem. A análise de concordância entre os testes foi obtida pela estatística *kappa*, cujo índice foi calculado utilizando o programa Stata/SE 10.0 e comparados aos índices descritos por Landis e Koch, et al. (1977).

### Resultados e Discussão

Das 211 amostras analisada através do teste de IDGA, 36(17,06%) foram reagentes ao teste e 175(82,94%) foram sabidamente negativas. Já ao teste de ELISA indireto, 7 (3,31%) foram positivas tanto neste teste como na IDGA, e 204(96,68%) foram negativas. Quanto aos resultados obtidos na prova molecular, PCR, não houve neste estudo nenhuma amostra reagente ao teste, ou seja, as 211 amostras foram negativas na técnica de PCR. Este resultado pode ser justificado pelo tipo de amostra biológica escolhida para sua realização, uma vez que foi observado no trabalho de Xavier et al. (2010) que amostras de sangue não são recomendadas para realização de diagnósticos diretos para infecção provocada por *B. ovis* em ovinos, pois verificaram que as amostras de sangue submetidas a PCR não foram reagentes ao teste, ou seja, não detectaram DNA de *B. ovis* através da PCR ao logo da infecção de ovinos experimentalmente infectados.

Neste estudo houve concordância de acordo com o coeficiente Kappa descrito por Landis e Koch (1977), entre as técnicas de IDGA x ELISA, porém, houve uma fraca concordância entre as técnicas IDGA x PCR e ELISA x PCR.

No trabalho de Nozaki et al. (2008), nas amostras de sêmen foi possível observar que a sensibilidade da técnica de PCR foi de 21,6%, diferindo significativamente do resultado obtido no presente trabalho, onde obteve-se sensibilidade igual a 0,00% em amostras de sangue. As amostras de urina testadas no trabalho de Nozaki et al. (2008) apresentaram sensibilidade ao teste de PCR igual a 12,7%, assim, identicamente oposta a sensibilidade obtida no trabalho.

Neste estudo 36 amostras de ovinos foram reagentes ao teste de IDGA, no entanto, esses dados contrariam os obtidos por Marinho e Mathias et al. (1996), pois ao avaliarem 850 amostras de soro de ovinos oriundos do estado de São Paulo, não obtiveram nenhum animal soropositivo a técnica de IDGA. Esse resultado negativo e diferente do resultado obtido no presente trabalho, pode estar relacionado com o tipo de antígeno usado pelos autores, uma vez que usaram como antígeno uma amostra 62/ 290 de *Brucella ovis*.

Greve et al. (2010) padronizou o teste de ELISA indireto e submeteu 448 amostras ao teste, obtiveram como resultado 11 amostras reagentes ao ELISA i, mas que não foram positivas ao teste de IDGA. Diferindo deste estudo, pois foi observado das 211 amostras submetidas ao teste ELISA, sete apresentaram-se positivas ao ELISA indireto e igualmente positivas a IDGA, ou seja, foi observado que as mesmas amostra positiva ao teste ELISA indireto foram igualmente positivas ao teste de IDGA.

### Conclusão

As três técnicas escolhidas na pesquisa são válidas e podem ser consideradas como uma boa ferramenta para o diagnóstico da infecção por *B. ovis*, contudo, não recomenda-se a utilização de sangue como amostra biológica de escolha para a realização de provas diagnósticas diretas para brucelose ovina, uma vez que foi comprovado neste trabalho sua ineficácia como amostra para o diagnóstico da infecção por *B. ovis* através da PCR.

### Referências

- Greve IC.** Brucelose ovina: estudo soroepidemiológico no semi-árido baiano e utilização de antígeno para teste de diagnóstico. Salvador, Bahia, 2010. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos); Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2010.
- Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v.33, p.159-174, 1977.
- Marques APR.** Caracterização soroepidemiológica da infecção por vírus Maedi-Visna e *Brucella ovis* em ovinos no estado de Minas Gerais. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Marinho M, Mathias LA.** Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do estado de São Paulo. *Pesq Vet Bras*, v.16, p.45-48. 1996.
- Nozaki CN.** Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas diferentes fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.
- Xavier MN, Silva TM, Costa EA, Paixão TA, Moustacas VS, Carvalho CA Jr, Sant'Anna FM, Robles CA, Gouveia AM, Lage AP, Tsolis RM, Santos RL.** Development and evaluation of a specie-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol*, v.145, p.158-164, 2010.



## **Avaliação do chá do extrato de copaíba (*Copaifera luetzelburgii*) adicionado ao diluidor Tris-gema na funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos criopreservados**

*Evaluation the copaíba tea extract (*Copaifera luetzelburgii*) added to Tris-yolk extender in the functionality of the plasma membrane of cryopreserved goats sperm*

**Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>\*, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1</sup>, Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho<sup>1</sup>, Luanna Soares de Melo Evangelista<sup>2</sup>, Antônio de Sousa Junior<sup>3</sup>, Dayana Maria do Nascimento<sup>1</sup>, Viviany de Sousa Rodrigues<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – LBRA, CCA, UFPI, Teresina, PI; <sup>2</sup>Departamento de Parasitologia e Microbiologia, CCS, UFPI, Teresina, PI; <sup>3</sup>Colégio Técnico de Teresina – CTT, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: felipebarcantevet@gmail.com

### **Abstract**

*This study aims to evaluate the effects of tea of copaíba extract (*Copaifera luetzelburgii*), in different concentrations, added to the Tris-egg yolk extender, the functionality of the plasma membrane sperm of cryopreserved goats. Were used four goats breeds, adults, male, six of each breed, aged between 1 and 6 years, a pool of ejaculates were formed to analyze. The animals were randomly divided into four experimental treatments: TI without adding of tea of copaíba extract (control); TII, added 0,1 mg of tea of copaíba extract; TIII, 0,2 mg; and TIV, 0,5 mg. The samples were frozen and stored, after 30 days were thawed for analysis by hisposmotic test (HOST). Adding tea of copaíba extract showed no significant difference between treatments for HOST, so the use of tea of copaíba extract the seminal dilution was not effective in preserving the functionality plasma membrane sperm of goats post-thawing.*

**Keywords:** goats, copaíba, hiposmotic.

**Palavras-chave:** caprinos, copaíba, hiposmótico.

### **Introdução**

A criopreservação do sêmen aparece como uma das principais biotecnologias aplicadas à reprodução animal, permitindo que o sêmen seja transportado, armazenado e utilizado sempre que necessário. No entanto, sabe-se que o armazenamento do sêmen determina ao longo de todas as etapas de criopreservação, mudanças nas características espermáticas pela geração de danos letais ou subletais em níveis ultraestrutural, bioquímico e funcional (Holt, 2000). Tais alterações culminam na redução da motilidade, viabilidade espermática, capacidade de transporte ao longo do sistema genital feminino e fertilidade (Hafez, 2004).

As deteriorações dos espermatozoides no processo de criopreservação podem contribuir para a acumulação de produtos tóxicos do metabolismo, principalmente de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), formadas através da peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (Cordova et al., 2010). Estas ROS são formas reduzidas de oxigênio e de seus produtos que são utilizados nos processos de modulação espermática para capacitação e fertilização, porém quando presentes sob a forma de radicais livres podem provocar danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos, proteínas, assim como a outros componentes celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A adição de antioxidantes aos diluidores têm apresentado diferentes resultados na preservação dos espermatozoides, devendo ser utilizados de forma criteriosa, testados em várias concentrações, para o tratamento não se tornar ineficaz.

O extrato de copaíba pode ser considerado um produto de ação benéfica ao sêmen, uma vez que já foram atribuídas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes (Basile et al., 1988), antitumoral (Lima et al., 2003), anti-edematogênica (Moura, 2010) e antioxidante (Desmarchelier et al., 2001) a este extrato vegetal.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do chá do extrato de copaíba (*Copaifera luetzelburgii*), sob diferentes concentrações, adicionado ao diluidor, na funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides de caprinos pós-criopreservação.

### **Material e Métodos**

A colheita de sêmen, as avaliações das características físicas dos ejaculados e a criopreservação foram realizadas, semanalmente, na propriedade Fazenda Faveira, localizada no município de Elesbão Veloso-PI, no período de abril a maio de 2016. O local caracteriza-se pela criação de caprinos e ovinos de raças exóticas e de raças localmente adaptadas.

Foram utilizados quatro (4) raças de caprinos (Azul, Canindé, Moxotó e Repartido) adultos, machos, sendo seis (6) exemplares de cada raça, com idade entre 1 a 6 anos. Um *pool* dos ejaculados foi formado para análise, onde uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação dos parâmetros seminais de volume, turbilhonamento, motilidade total, vigor espermático e concentração espermática.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro tratamentos experimentais: no tratamento I (TI) foi formado um *pool* dos ejaculados dos 6 animais de cada raça, sem adição do chá do extrato de copaíba ao diluidor Tris-gema, sendo considerado o grupo controle; no tratamento II (TII) foi adicionado o chá com 0,1 mg do extrato de copaíba juntamente ao diluidor Tris-gema; no tratamento III (TIII) foi adicionado o chá com 0,2 mg do extrato de copaíba; e no tratamento IV (TIV) foi adicionado o chá com 0,5 mg do extrato de copaíba.

Após cerca de um mês do processo de congelamento, descongelou-se o sêmen e realizou-se o teste hiposmótico (HOST). Este teste foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí (LBRA/UFPI). A descongelamento ocorreu por imersão das palhetas em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Para a realização do HOST, foram adicionados 10 µL de sêmen descongelado de cada tratamento aos microtubos contendo 1mL de solução hiposmótica (citrato de sódio -50% e frutose -50%) a 150 mOsmol/L, em seguida, incubados por 40 minutos em banho-maria a 37°C. Outros 10 µL de sêmen descongelado de cada tratamento foram adicionados em microtubos contendo 1mL de formol salino. Após a contagem de 100 células espermáticas de todas as amostras, para avaliação da cauda dobrada e cauda não dobrada, foram comparados os resultados pré e pós-HOST para membranas funcionais.

Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias, desvio-padrão e utilizada a Análise de variância por meio do programa Statistical Analysis System for Windows (SAS). No caso de diferenças significativas entre os tratamentos experimentais, foi utilizado o teste de Duncan e SNK (Student Newman Keuls) para comparações de médias. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

Os resultados presentes na Tab. 1 mostraram que o uso do chá do extrato de copaíba junto ao diluidor utilizado não interferiu na funcionalidade da membrana plasmática espermática dos animais avaliados, não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais. Os valores das médias de membranas funcionais foram menores que os valores encontrados por Oliveira et al. (2013), que observaram 33,5% de membranas funcionais, utilizando o mesmo teste, na mesma osmolaridade (150 mOsmol/L) em sêmen de caprino.

Tabela 1. Média de espermatozoides caprinos com membrana funcional, diluídos em Tris-gema sob tratamento controle e três concentrações (0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL) do chá do extrato de copaíba, pós-criopreservação, avaliados pelo HOST.

Raças	Níveis de Extrato de Copaíba (mg/mL)				Médias (Raças)
	TI (0)	TII (0,1)	TIII (0,2)	TIV (0,5)	
Azul	27,20	22,60	25,80	28,80	26,10 <sup>a</sup>
Canindé	34,16	38,00	30,66	37,50	35,08 <sup>a</sup>
Moxotó	25,66	21,16	26,50	31,66	26,25 <sup>a</sup>
Repartido	31,80	33,60	30,20	27,20	30,70 <sup>a</sup>
Médias (Copaíba)	29,70 <sup>a</sup>	28,84 <sup>a</sup>	28,29 <sup>a</sup>	31,29 <sup>a</sup>	-

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

De modo geral, verificou-se uma baixa resposta do sêmen caprino ao teste hiposmótico, haja vista que mesmo os maiores valores médios de membranas plasmáticas espermáticas funcionais encontradas ficaram em torno de 31,29% (TIV). Esses resultados também foram inferiores aos encontrados por Salgueiro et al. (2003), que obtiveram médias superiores a 50% de espermatozoides reativos, na mesma espécie, porém sem uso de antioxidantes ao diluidor.

A literatura é escassa no que se concerne à utilização de antioxidantes em meios diluidores na biotecnologia da reprodução de caprinos, sendo estas substâncias mais usuais em bovinos, mostrando resultados variados quanto a sua utilização.

A literatura também é escassa quanto ao efeito do extrato de copaíba na criopreservação do sêmen caprino e o presente estudo é pioneiro na avaliação do chá do extrato de copaíba, adicionado ao diluidor Tris-gema, na funcionalidade da membrana plasmática de sêmen de caprinos pós-criopreservação.

## Conclusão

Conclui-se que as concentrações utilizadas do chá do extrato de copaíba não apresentaram eficiência na preservação da funcionalidade da membrana plasmática espermática de caprinos pós-criopreservação pelo HOST. Entretanto, outras pesquisas devem ser realizadas visando analisar o efeito deste extrato, em outras concentrações e por outros testes, na qualidade e capacidade fertilizante do sêmen de caprinos.



### Agradecimentos

Agradecemos à administração da Fazenda Faveira por ter nos cedido suas instalações e os animais para a realização deste experimento.

### Referências

- Basile AC, Sertié JAA, Freitas PCD, Zanini AC.** Anti-inflammatory activity of oleoresin from brazilian copaifera. *J Ethnopharmacol*, v.22, p.101-109, 1988.
- Cordova C, Dominguez JC, Cordova A, Cordova MS, Gonzalez R, Garcia JC, Bernal S, Cardenas S, Martin D, Fernandez R, Alegre B.** Effect of addition of Trolox in lipid peroxidation of commercial sperm doses maintained during 7 days. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.99, 2010.
- Desmarchelier CJ, Bustamante JM, Gil RR, Coussio JD, Ciccía GN, Silva GL.** Proflisetinidin type tannins responsible for antioxidant activity in *Copaifera reticulata*. *Pharmazie*, v.56, p.573-577, 2001.
- Hafez ESE.** Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: Hafez B, Hafez ESE. *Reprodução Animal*, 7a. ed. Barueri: Manole, 2004. p.435-446.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine*. 3a. ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- Lima SRM, Veiga Júnior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD.** In vivo and in vitro studies on anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytother Res*, v.17, p.1048-1053, 2003.
- Moura WRA.** Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, HARM e *Sida santaremmensis*, MONTEIRO. 2010. 69f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 2010.
- Oliveira IRS, Alves HM, Castelo TS, Bezerra FSB, Bezerra ACDS, Silva AR.** Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, p.216-221, 2013.
- Salgueiro CCM, Nunes JF, Mateos-Rex E, Cordeiro MA, Magalhães DM, Cavalcante JMM, Palácio ARS.** Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.377-378, 2003.



## **Avaliação do chá do extrato de copaíba (*Copaifera luetzelburgii*) pós-criopreservação de sêmen de caprinos pelo teste de termoresistência**

*Evaluation of the tea of copaíba extract (*Copaifera luetzelburgii*) in goat semen post-thawing by term-resistance test*

**Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho<sup>1</sup> \*, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1</sup>, Luanna Soares de Melo Evangelista<sup>2</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>3</sup>, Bruno de Oliveira Lopes Neto<sup>1</sup>, Filipe Nunes Barros<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – LBRA, CCA, UFPI, Teresina, PI; <sup>2</sup>Departamento de Parasitologia e Microbiologia, CCS, UFPI, Teresina, PI; <sup>3</sup>Colégio Técnico de Teresina – CTT, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: marcoscelestino90@gmail.com

### **Abstract**

*The semen cryopreservation process causes damages in spermatozoa characteristics. This study aimed to evaluate the effects of tea of Copaíba extract (*Copaifera luetzelburgii*), in different concentrations, added to the Tris-egg yolk extender, in the quality of post-cryopreserved spermatozoa from locally adapted breeds of goats. Were used four (4) goats Breeds (Azul, Canindé, Moxotó e Repartido) adults, male, six of each breed, aged between 1 and 6 years, a pool of ejaculates were formed to analyze. The animals were randomly divided into four experimental treatments: TI (Control), TII (0,1mg), TIII (0,2mg) and TIV (0,5mg). The samples were frozen and stored, after 30 days they were thawed for analysis by term-resistance test (TTR). The addition of tea of copaíba extract showed no significant difference between treatments by TTR, therefore the use of tea copaíba extract in seminal diluting not increment the sperm longevity post-thawing.*

**Keywords:** goats, copaíba, cryopreservation.

**Palavras-chave:** caprinos; copaíba, criopreservação.

### **Introdução**

A caprinocultura cresce por todo o Brasil, com maior destaque para a região Nordeste que possui o maior rebanho efetivo (IBGE, 2013). Essa atividade desempenha importante função socioeconômica, como geradora de renda (comercialização de animais, carne e peles) e como fonte de proteína de alto valor biológico para as populações de baixa renda (consumo de animais nas propriedades). As raças nativas e seus cruzamentos destacam-se entre os criadores, devido a sua rusticidade e adaptabilidade (Menezes et al., 2006).

Para um maior desenvolvimento da caprinocultura é necessária uma maior utilização das técnicas aplicadas à reprodução animal, dentre elas a criopreservação do sêmen. No entanto, sabe-se que o armazenamento do sêmen determina ao longo de todas as etapas de criopreservação, mudanças nas características espermáticas pela geração de danos letais ou subletais em níveis ultraestrutural, bioquímico e funcional (Holt, 2000), estas alterações decorrentes da queda da temperatura são denominadas de crioinjúrias. Diante disso, podemos adicionar crioprotetores aos diluidores, substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante a refrigeração, congelamento e descongelamento (Furst, 2006).

O extrato de copaíba pode ser considerado um produto de ação benéfica ao sêmen, uma vez que já foram atribuídas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes (Basile et al., 1988), antitumoral (Lima et al., 2003), anti-edematogênica (Moura, 2010) e antioxidante (Desmarchelier et al., 2001) a este extrato vegetal.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do chá do extrato de copaíba (*Copaifera luetzelburgii*), sob diferentes concentrações, adicionadas ao diluidor, na longevidade do sêmen pós-criopreservado de caprinos pelo teste de termoresistência.

### **Metodologia**

A colheita de sêmen, as avaliações das características físicas dos ejaculados e a criopreservação foram realizadas, semanalmente, na propriedade Fazenda Faveira, localizada no município de Elesbão Veloso-PI, no período de abril a maio de 2016. O local caracteriza-se pela criação de caprinos e ovinos de raças exóticas e de raças localmente adaptadas.

Foram utilizados quatro (4) raças de caprinos (Azul, Canindé, Moxotó e Repartido) adultos, machos, sendo seis (6) exemplares de cada raça, com idade entre 1 a 6 anos. Um *pool* dos ejaculados foi formado para análise, onde uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação dos parâmetros seminais de volume, turbilhonamento, motilidade total, vigor espermático e concentração espermática.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro tratamentos experimentais: no tratamento I (TI) foi formado um *pool* dos ejaculados dos 6 animais de cada raça, sem adição do chá do extrato de copaíba ao diluidor Tris-gema, sendo considerado o grupo controle; no tratamento II (TII) foi adicionado o chá com 0,1 mg do extrato de copaíba juntamente ao diluidor Tris-gema; no tratamento III (TIII) foi adicionado o chá com 0,2 mg do extrato de copaíba; e no tratamento IV (TIV) foi adicionado o chá com 0,5 mg do extrato de copaíba.

Após cerca de um mês do processo de congelação, descongelou-se o sêmen e realizou-se o teste de termoresistência (TTR) para avaliação da longevidade espermática, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos. Este teste foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí (LBRA/UFPI). A descongelação ocorreu por imersão das palhetas em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias, desvio-padrão e utilizados a Análise de variância por meio do programa Statistical Analysis System for Windows (SAS). No caso de diferenças significativas entre os tratamentos experimentais, foi utilizado o teste de Duncan e SNK (Student Newman Keuls) para comparações de médias. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 1, as médias de motilidade dos espermatozoides criopreservados em diluidor contendo diferentes concentrações de extrato de copaíba não apresentaram diferença significativa entre os Tratamentos TI, TII, TIII pelo TTR e, ainda, o tratamento TIV apresentou este parâmetro com valor inferior quando comparado aos demais tratamentos, mostrando que o extrato da copaíba diluído a 0,5 mg/ml pode alterar o perfil de motilidade dos espermatozoides. Também foi possível observar uma redução significativa da motilidade e vigor espermáticos a cada período de tempo analisado por este teste.

Tabela 1. Motilidade total (%) e Vigor espermático (1-5) de sêmen de caprinos, diluído em Tris-gema sob tratamento controle e três concentrações (0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL) do chá do extrato de copaíba, pós-criopreservação, avaliados pelo TTR.

Tempo (TTR)	Níveis de Extrato de Copaíba (mg/mL)								Médias (Tempo)	
	TI		TII		TIII		TIV		Mot	Vig
	(0)	(0,1)	(0,2)	(0,5)						
Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	
0	33,47	3,08	35,43	3,08	33,56	3,04	25,17	2,91	31,91 <sup>a</sup>	3,03 <sup>a</sup>
60	27,61	2,82	28,26	2,69	26,43	2,78	21,74	2,74	26,01 <sup>b</sup>	2,76 <sup>b</sup>
120	18,82	2,04	16,87	2,00	15,34	1,82	11,17	2,00	15,55 <sup>c</sup>	1,96 <sup>c</sup>
180	9,87	1,56	8,78	1,56	8,65	1,34	5,65	1,21	8,24 <sup>d</sup>	1,42 <sup>d</sup>
Médias (Copaíba)	22,44 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	22,33 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>	21,00 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	15,93 <sup>b</sup>	2,21 <sup>a</sup>		

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

A literatura é escassa quanto ao efeito do extrato de copaíba na criopreservação do sêmen caprino. Vanzela et al. (2013) avaliando o extrato ao diluidor de sêmen ovino observaram que concentrações menores de copaíba apresentaram resultados de motilidade melhores quando avaliados em até 48h pós-refrigeração, porém também não houve diferença estatística com o grupo controle e concentrações superiores do extrato diminuíram essa característica seminal.

As médias de vigor espermático criopreservado em diluidor contendo diferentes concentrações de extrato de copaíba não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos TI, TII, TIII e TIV pelo TTR. Mesmo sem diferença entre os grupos, todos os tratamentos avaliados em todas as raças apresentaram o parâmetro seminal de vigor espermático dentro da normalidade para a espécie caprina, com valores mínimos de vigor pós-descongelação (vigor 2) preconizados pelo CBRA (2013), podendo, dessa forma, ser empregado em programas de inseminação artificial.

### Conclusão

Conclui-se que as concentrações utilizadas do chá do extrato de copaíba não apresentaram incremento na longevidade do sêmen criopreservado de caprinos. Entretanto, outras pesquisas devem ser realizadas visando analisar o efeito deste extrato em outras concentrações e por outros testes na qualidade do sêmen caprino pós-descongelado.

### Agradecimentos

Agradecemos à administração da Fazenda Faveira por ter nos cedido suas instalações e os animais para a realização deste experimento.



#### Referências

- Basile AC, Sertié JAA, Freitas PCD, Zanini AC.** Anti-inflammatory activity of oleoresin from brazilian copaifera. *Journal of Ethnopharmacology*, v.22, p.101-109, 1988.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Desmarchelier CJ, Bustamante JM, Gil RR, Coussio JD, Ciccio GN, Silva GL.** Profisetinidin type tannins responsible for antioxidant activity in *Copaifera reticulata*. *Pharmazie*, v.56, p.573-577, 2001.
- Furst R.** Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. 2006. 114f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** Censo agropecuário, Rio de Janeiro, 2013.
- Lima SRM, Veiga Júnior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD.** In vivo and in vitro studies on anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*, v.17, p.1048-1053, 2003.
- Menezes MPC, Martínez AM, Ribeiro MN, Pimenta Filho EC, Bermejo JVD.** Genetic characterization of Brazilian native breeds of goats using 27 markers microsatellites. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, p.1336-1341, 2006.
- Moura WRA.** Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, HARM e *Sida santaremnensis*, MONTEIRO. 2010. 69f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 2010.
- Vanzela T, Gheller S, Tavares G, Costa V, Duval L, Andriola YCorcini CD.** Efeitos de diferentes concentrações de extrato de copaíba ao sêmen ovino adicionados a 5°C. In: 12ª Mostra de Produção Universitária, 2013, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: UFRS, 2013. Disponível em: [www.prosp.furg.br/anaismpu/cd2013/cic/2578.doc](http://www.prosp.furg.br/anaismpu/cd2013/cic/2578.doc). Acesso em 20 de out. 2016.



## **Avaliação do estresse hipertérmico de ovelhas gestantes das raças Dorper, Santa Inês e suas mestiças em clima tropical com base nos níveis sorológicos de Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4 Total)**

*Evaluation of the stress head stress sheep pregnant of the breeds Dorper, Santa Inês and their mixed in a tropical climate based on the serological levels of Triiodotironina (T3) and Thyroxine (T4 Total)*

**Brenda Lurian do Nascimento Medeiros<sup>1</sup>\*, Dalvan Fortaleza Alencar<sup>1</sup>, Daniel Serafim de Andrade Rodrigues<sup>1</sup>, Francisco Felipe Ferreira Soares<sup>1</sup>, Marina Rebeca Soares Carneiro de Sousa<sup>2</sup>, Joilson Ferreira Batista<sup>2</sup>, Marinna Nérica do Nascimento e Silva<sup>3</sup>, Amilton Paulo Raposo Costa<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil; <sup>2</sup>Doutorando em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil. <sup>3</sup>Médica veterinária, doutora, residente em diagnóstico por imagem do HVU da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil; <sup>4</sup>Médico veterinário, doutor, docente da Universidade do Piauí, Teresina, Brasil.

\*E-mail: [brenda24medeiros@hotmail.com](mailto:brenda24medeiros@hotmail.com)

### **Abstract**

*The study objectify to evaluate the adaptability of pregnant sheep of the Dorper, Santa Ines and mixed (Dorper ½ ½ Santa Ines) to the tropical climate through serologic possible modifications of triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4). The experiment was conducted at Malhada Vermelha farm in Lagoa Alegre - PI, 21 sheep were used in gestational middle third, 7 of Dorper, 7 Santa Ines and 7 mixed (Dorper x Santa Ines), all in satisfactory clinical conditions and under the same management conditions. These were evaluated respiratory rate, rectal temperature and collected blood samples for hormone dosage four times in each climatic period March, July and October. Later they were measured Thyroxine (Total T4) and triiodothyronine (T3) by ELISA. T3 dosages remained within the normal range for the species, while T4 was below. It was concluded that the most adapted breed is Santa Ines.*

**Keywords:** thyroxine, triiodothyronine, Santa Ines.

**Palavras-chave:** tiroxina, triiodotironina, Santa Inês.

### **Introdução**

A glândula tireoide é uma das mais envolvidas nos processos metabólicos globais e secreta duas iodotironinas, a Tiroxina (T4) e a Triiodotironina (T3), peculiarmente caracterizadas por sua atividade calorígenica, que afeta o metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas, de maneira a controlar a termogênese obrigatória. Dentre as respostas hormonais ao estresse térmico, uma das mais importantes é a alteração do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, cuja reação no calor é reduzir sua atividade e, consequentemente, a taxa metabólica (Swenson e Reece, 1998).

As mudanças endócrinas importantes por ocasião do estresse hipertérmico, pode-se destacar a diminuição na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, com redução das concentrações de hormônios tireoidianos (Bianco e Kimura, 1999).

As regiões tropicais, de modo geral, caracterizam-se por elevados níveis de radiação solar e de temperatura ambiente, fatores esses que podem afetar de maneira adversa a produção animal, quando comparada à de animais mantidos em zonas temperadas, se esses não forem bem adaptados a esse tipo de clima (Souza Junior et al., 2008).

Existem dois caminhos para o incremento da produção na região tropical: o primeiro consiste em utilizar genótipos mais produtivos e fornecer-lhes um ambiente compatível com os seus requerimentos. O segundo se refere à utilização de animais adaptados, dos quais se devem selecionar os mais produtivos. Nesse caso, a utilização de raças nativas assume um importante papel, devido ao seu grande potencial adaptativo ao ambiente (Façanhas et al., 2013).

Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a adaptabilidade de ovelhas prenhes das raças Dorper, Santa Inês e mestiças (½ Dorper ½ Santa Inês) ao clima tropical, por meio de possíveis modificações sorológicas de Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4).

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado na fazenda Malhada Vermelha localizada no município de Lagoa Alegre – PI, em três períodos bioclimáticos distintos ao longo do ano, março (ameno e úmido), julho (ameno e seco) e outubro (quente e seco).

Foram utilizadas 21 ovelhas prenhes, aproximadamente no terço médio gestacional, sendo sete da raça Dorper, sete da raça Santa Inês e sete mestiças (½ Dorper ½ Santa Inês), todas em condições clínicas satisfatórias, submetidas às mesmas condições de manejo e com médias de escores 5 (Dorper), 4 (Mestiças) e 3 (Santa Inês).



Foi realizada a caracterização do ambiente pela determinação da temperatura ambiente (TA), umidade relativa (UR) e velocidade do vento (VV), que foram medidas por meio de Mini Estação Meteorológica Sonambra WM-300, a temperatura de globo negro (TGN).

Foi calculado o índice desenvolvido especificamente para ovinos, o Índice de Conforto Térmico (ICT) estimado por Barbosa et al. (1995). O ICT é calculado pela fórmula:

$$3- ICT = (0,6678Ta) + (0,4969Pp\{ta\}) + (0,5444Tgn) + (0,1038vv)$$

Durante o experimento, foram mensurados os parâmetros fisiológicos, frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR), em dois horários do dia (7-8 e 13-14) quatro vezes em cada período climático considerado neste experimento.

Foram realizadas coletas de sangue para dosagem hormonal nos animais, quatro vezes em cada período climático (outubro de 2015 e março de 2016 e julho de 2016).

O sangue foi obtido por meio de venopunção da jugular, coletando-se 5 ml de sangue em tubos de ensaio sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas, na própria fazenda a 756G e o soro armazenado em microtubos do tipo "ependorf" e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Foram dosados Tiroxina (T4 total) e triiodotironina (T3) pelo método ELISA, no Laboratório de Ciências Fisiológicas da UFPI assim, os dados obtidos foram analisados através do Programa de Estatístico Sigma Stat.

### Resultados e Discussão

A raça Dorper diferiu significativamente das demais raças com média geral de T3 igual a 1,53 ng/ml, enquanto as raças Santa Inês e mestiças apresentaram 1,87 e 1,76 ng/ml respectivamente, para os três períodos do ano. Para as dosagens de T4 não houve interação entre raça e período, entretanto, o período com maior produção foi o mês de março igual a 88,8 nmol/L, enquanto a raça Santa Inês obteve maior média igual a 88,67 nmol/L, diferindo das demais raças, sendo Dorper com 79,9 nmol/L e mestiças com 74,35 nmol/L.

Os valores médios de T3 encontrados nesse experimento foram semelhantes aos encontrados por Starling et al. (2005) que foram de 0,97 a 2,25 ng/mL e Costa et al. (2015) com médias variando de 0,70 a 2,50 ng/mL.

Os menores níveis de T4 foram observados em outubro, corroboram com os descritos na literatura, já que nesse período foi observada maior temperatura ambiente embora, os valores encontrados no experimento, que variou de 70,2 a 88,8 nmol/L, sejam inferiores ao encontrado por Costa et al. (2015) cuja média variou entre 173.817 a 184.853 nmol/L o que demonstra que o metabolismo dos animais esteve reduzido em todo o período experimental.

Os hormônios tireoideanos possuem uma correlação negativa com a temperatura ambiente, ou seja, quanto menor a temperatura maior os níveis de T3 e T4 (Costa, 2015). Essa relação foi observada nessa pesquisa, demonstrando que os resultados são compatíveis com o descrito na literatura.

### Conclusão

Através desses resultados, conclui-se que a raça Santa Inês foi a mais adaptada ao clima tropical por sofrer menos estresse.

### Referências

- Barbosa OR, Silva RG, Sclar J, Guedes JMF.** Utilização de um índice de conforto térmico em zoneamento bioclimático da ovinocultura. *Boletim da Indústria Animal*, v.52, p.37-47, 1995.
- Bianco AC, Kimura ET.** Fisiologia da glândula tireóide. In: Aires MM (Ed.) *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.812-828.
- Costa WP, Façanha DAE, Leite JHGM, Silva RCB, Souza CH, Chaves DF, Vasconcelos AM, Soto-Blanco B, Vale AM, Pimenta Filho EC.** Respostas termorregulatórias e parâmetros sanguíneos de ovelhas nativas brasileiras criadas na região semiárida brasileira. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, p.4589-4600, 2015.
- Façanha DAE, Chaves DF, Morais JH Gurgel, Vasconcelos ÂM, Costa WP, Guilhermino MM.** Tendências metodológicas para avaliação da adaptabilidade ao ambiente tropical. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.14, p.91-103, 2013
- Starling JMC, Silva, RG, Negrão, JA, Maia, ASC, Bueno, AR.** Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. *Rev Bras Zootec*, v.34, p.2064-2073, 2005.
- Souza Junior SV, Morais DAE F, Vasconcelos AM, Nery KM, Morais JHG, Guilhermino MM.** Características termorreguladoras de caprinos, ovinos e bovinos em diferentes épocas do ano em região semiárida. *Rev Cient Prod Anim*, v.10, p.127-137, 2008.
- Swenson MJ, Reece OW.** *Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998. 856p.



## **Avaliação do sêmen fresco e criopreservado de caprinos autóctones no Estado do Piauí: Resultados preliminares**

*Evaluation of cryopreserved sperm of autochthonous goats in the State of Piauí: Preliminary results*

**Talita Soares Câmara<sup>1</sup>\*, Alex Altair Costa Machado<sup>1</sup>, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro<sup>2</sup>, Jefferson Hallison Lustosa da Silva<sup>3</sup>, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>3</sup>, Antônio Sousa Júnior<sup>4</sup>, David Baruc Cruvinel Lima<sup>1</sup>, José Ferreira Nunes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia do Sêmen, Núcleo Integrado de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (LTSCO/NIB/PPGCV/UECE); <sup>2</sup>ACP Biotecnologia/UECE; <sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí-UFPI; <sup>4</sup>Colégio Técnico de Teresina-CTT, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: talitavet2003@gmail.com

### **Abstract**

*This work aimed to evaluate the quantitative parameters of fresh and thawed sperm of Canindé goats in the State of Piauí. Ten sperm samples were collected, using artificial vagina, from four goats at reproductive age. Each ejaculate was evaluated for volume, sperm concentration, mass motility, total and progressive motility, percentage of motile spermatozoa and vigor, for further dilution in ACP-101. Then, the sperm was filled in 0.25 mL straws, cryopreserved using the TK3000 machine and stored in nitrogen cylinders at -196 °C, for further analysis at SCA. The sperm parameters were submitted to the T test for comparison between the fresh and thawed groups. The values for fresh sperm relative to total and progressive motility, vigor and sperm viability were higher ( $P < 0.05$ ) when compared to thawed, although both fresh and thawed sperm of these animals could be used in programs of artificial insemination (IA).*

**Key words:** goat, sperm parameters, local breed.

**Palavras-chave:** bode, parâmetros seminais, raça autóctone.

### **Introdução**

Dentre os caprinos localmente adaptados no Nordeste Brasileiro, a raça Canindé destaca-se por sua rusticidade e alta produção de leite, encontrando-se acima da média nacional, quando comparada a caprinos localmente adaptados (Ribeiro, 2006). Em virtude disso, a preservação de raças caprinas localmente adaptadas tem sido defendida, não só devido à importante variabilidade genética destes animais como também devido a sua contribuição para produção de carne, pele e leite (Ozgecan e Okan, 2012). Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros quantitativos do sêmen fresco e descongelado de caprinos autóctones do Estado do Piauí.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi submetido e aceito pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEP/UECE) com o número: 6305558/2014. O sêmen foi coletado de quatro reprodutores, andrologicamente testados, duas vezes por semana, durante o período de dois meses (julho e agosto/2015), com auxílio de vagina artificial e fêmea em estro induzido. Após a coleta, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (ml), concentração espermática (sptz/ml), motilidade massal (1-5), motilidade total e progressiva (0-100%), percentual de espermatozoides móveis (0-100%) e vigor (1-5) (Chemineau et al., 1991). Posteriormente, procedeu-se a diluição seminal, utilizando ACP-101 (40 mg de gentamicina, 2,5% de gema de ovo e 7% de glicerol), até uma concentração final de  $400 \times 10^9$  sptz/ml. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 ml e levado a máquina TK3000, em curva específica para sêmen caprino (-0,25 °C/min.), para iniciar o processo de criopreservação. Após o período de um mês em botijões criogênicos (-196 °C), essas palhetas foram descongeladas em banho Maria a 37 °C, e analisadas pelo sistema de

análise computadorizada (SCA) e subjetivamente. No SCA foram analisados parâmetros como: percentual de espermatozoides móveis (MOV), percentual de espermatozoides com movimento progressivo (PROG), velocidade curvilínea (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do percurso (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ). Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados através do programa estatístico Graphpad Prism<sup>®</sup> versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), depois foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, com posterior transformação angular em Arcoseno das porcentagens. As proporções encontradas para os parâmetros espermáticos foram submetidas ao teste *T* para comparação entre os grupos a fresco e descongelado. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### **Resultados e Discussão**

Na tabela 1 é possível verificar os parâmetros de motilidade total, progressiva e vigor do sêmen fresco e descongelado, onde os valores de sêmen fresco apresentaram-se significativamente maiores que o do descongelado ( $P < 0,05$ ). No sêmen fresco, a motilidade massal ( $3,8 \pm 0,62$ ) apresentou-se abaixo dos valores preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) para espécie caprina. Já os valores relacionados ao vigor ( $3,32 \pm 0,44$ ), a motilidade ( $84,5 \pm 5,16\%$ ) e a concentração espermática no ejaculado ( $3,9 \pm 1,2610^9$  sptz/ml) estavam de acordo com o recomendado. No tocante ao sêmen descongelado, os valores da motilidade total ( $29,7 \pm 18,0\%$ ) e vigor ( $2,1 \pm 1,5$ ), estão de acordo com o CBRA (2013). Na tabela 2 estão expostos os dados do sêmen descongelado avaliados pelo sistema de análise computadorizada (CASA), onde os valores médios de motilidade total ( $29,7\%$ ) e motilidade



progressiva (21,3%) apresentaram-se abaixo dos valores obtidos na análise seminal objetiva pós-descongelamento (61,36% e 33,62%, respectivamente). Entretanto, tanto os valores obtidos na análise objetiva quanto subjetiva estavam dentro do recomendado pelo CBRA 2013. Os parâmetros de velocidade (VCL e VAP) são comumente utilizados para descrição geral do movimento do espermatozoide e o parâmetro STR trata das relações entre estas velocidades (Motimer, 1997). No presente estudo, foram encontrados valores de VAP menores (42,23%) do que observado por Oliveira et al. (2011). Da mesma forma Cavalcante (2008) ao utilizar ACP para análise seminal de ovinos, obteve valores maiores do que encontrados no presente estudo para VCL (116,1%), VAP (101,7%), STR (78,6%) e ALH (2,6%).

Tabela 1. Média e erro padrão da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), vigor e espermatozoides viáveis no sêmen de caprinos da raça Canindé, avaliados subjetivamente.

Animal	Fresco				Descongelado			
	MT %	MP %	Vigor (1-5)	Sptz Viáveis	MT (%)	MP (%)	Vigor (1-5)	Sptz Viáveis
1	84,5 ±6,8 <sup>a</sup>	76,0±6,1 <sup>a</sup>	3,1±0,3 <sup>a</sup>	164,6±11,6 <sup>a</sup>	23,1±18,6 <sup>b</sup>	19,0±16,1 <sup>b</sup>	2,1±1,8 <sup>b</sup>	36,5±32,2 <sup>b</sup>
2	86±5,1 <sup>a</sup>	77,1±4,8 <sup>a</sup>	3,3±0,4 <sup>a</sup>	164,8±11,6 <sup>a</sup>	36,0±8,4 <sup>b</sup>	26,0±9,9 <sup>b</sup>	2,8±1,0 <sup>b</sup>	92,4±38,2 <sup>b</sup>
3	82,5±4,2 <sup>a</sup>	72,0±4,2 <sup>a</sup>	3,5±0,5 <sup>a</sup>	164,3±11,6 <sup>a</sup>	32,5±21,8 <sup>b</sup>	23,1±18,3 <sup>b</sup>	2,1±1,8 <sup>b</sup>	65,2±48,6 <sup>b</sup>
4	85,0±0,5 <sup>a</sup>	74,5±4,3 <sup>a</sup>	3,3±0,4 <sup>a</sup>	164,3±11,5 <sup>a</sup>	25,5±21,2 <sup>b</sup>	16,6±15,0 <sup>b</sup>	1,6±1,5 <sup>b</sup>	50,0±40,0 <sup>b</sup>
Total	84,5±5,1	75±5,1	3,3±0,4	164,3±11,8	29,7±18,0	21,3±14,6	2,1±1,5	62,5±43,9

Letras distintas, entre colunas, indicam diferença pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), dentro de um mesmo parâmetro, entre o sêmen fresco e descongelado. Sptz-Espermatozoides.

Tabela 2. Média e erro padrão do percentual de espermatozoides móveis (MOV), percentual de espermatozoides com movimento progressivo (PROG), velocidade curvilinear (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do percurso (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ) do sêmen de caprinos da raça Canindé.

Animal	MOV	PROG	VCL	VAP	STR	ALH
1	47,22±25,94	21,22±13,38	38,66±21,01	30,44±16,84	62,44±33,37	1,55±0,83
2	62,29±36,05	31,47±21,23	54,0±30,94	44,0±25,85	76,29±41,24	1,94±1,0
3	68,92±36,57	37,0±25,04	60,0±31,72	49,24±27,02	76,56±36,31	2,04±1,0
4	67,09±24,46	38,81±21,48	55,84±21,73	45,27±19,71	74,63±19,81	1,96±0,58
Total	61,36±30,75	33,62±20,28	52,12±26,35	42,23±22,35	72,48±32,68	1,87±0,85

## Conclusão

Os padrões de motilidade e vigor se mantiveram satisfatórios para conservação tanto do sêmen fresco como do descongelado, mostrando assim, um bom potencial para seu uso em programas de inseminação artificial.

## Agradecimentos

À Universidade Federal do Piauí -UFPI e Colégio Técnico de Teresina - CTT, pelo apoio técnico e laboratorial. Aos proprietários de caprinos de Elesbão Veloso-PI e Quixadá-CE, por disponibilizarem os animais utilizados nesse experimento.

## Referências

- Azevedo DMMR, Tonioli R, Nunes JF, Villarreal ABS. Características Seminais de Caprinos Marota no Nordeste do Brasil. *Rev Cient Anim*, v.6, p.33-39, 2004.
- Cavalcante JMM. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c) e TRIS. 89p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.
- Chagas da Silva M, Brito IF, Barbosa Filho JAD, Andrioli A, Brasil DF, Sales FAL. Influência das variáveis ambientais sobre as características quantitativas do sêmen de caprinos das raças Canindé e Moxotó. In: *Anais...* VI Congresso Nordestino de Produção Animal. Mossoró, RN. 2010.
- Chemineau P, Cagnié Y, Guérin Y. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: FAO, 1991. 222p.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104p.
- Ribeiro VL, Batista ÁMV, Carvalho FFR, Azevedo M, Mattos CW, Alves KS. Comportamento ingestivo de caprinos Moxotó e Canindé submetidos à alimentação à vontade e restrita. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v.28, p.331-7, 2006.
- Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*, v.3, p.403-439, 1997.
- Oliveira RV, Nunes JF, Salgueiro CCM, Cavalcante JMM, Brasil OO, Moura AAAN. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de ACP ou Tris. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.6, p1295-1302, 2011.
- Ozgecan KA, Okan E. Assessment of genetic diversity, genetic relationship and bottleneck using microsatellites in some native Turkish goat breeds. *Small Ruminant Research*, v. 105, p. 53-60, 2012.



## **Avaliação dos fatores de risco e prevalência da leptospirose em caprinos em municípios do Alto Médio Gurguéia do Estado do Piauí**

*Evaluation of risk factors and prevalence of leptospirosis in goats in municipalities of Microrregion of the Upper-middle Gurguéia the State of Piauí*

**Janaina de Fátima Saraiva Cardoso\*, Regina Célia de Jesus Fialho, Kenney de Paiva Porfírio, Raimundo Rosal Vaz, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, Bruno Leandro Maranhão Diniz, Luana Andrade da Costa, Ney Rômulo de Oliveira Paula**

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: janainadefatima@hotmail.com

### **Abstract**

*The objective of this study was to evaluate the risk factors and to calculate the prevalence of Leptospirosis in goats in municipalities of the Upper Gurguéia micro region of the State of Piauí. A total of 143 goat samples were collected from four (4) municipalities of the micro-region. Applied an epidemiological questionnaire with possible risk factors. The diagnosis was made by the microscopic sero-agglutination (SAM) technique against 22 pathogenic serovars. The reagents were determined serovar appears when 50% or more agglutination reaction on the cutting point titer of 1: 100. The overall prevalence was 9.09%. Serum Icterohaemorrhagiae were found in 5.59%, Grippotyphosa in 1.4%, Icterohaemorrhagiae + Pomona (0.7%), Icterohaemorrhagiae + Canicola (0.7%) and Icterohaemorrhagiae + Autumnalis (0.7%). It is concluded that in the studied region it has a high prevalence for leptospirosis and that there are no measures of controls to contain the risk factors.*

**Keywords:** leptospira, serovar, reproductive disease.

**Palavras-chave:** leptospira, sorovar, doença reprodutiva.

### **Introdução**

A leptospirose é uma doença infecciosa febril aguda, de etiologia bacteriana, causada por espiroquetídeos do gênero *Leptospira*. Do ponto de vista epidemiológico, consideram-se como principais reservatórios de leptospirosas na natureza os roedores sinantrópicos, isto é, aqueles que se adaptaram a viver junto ao homem, a despeito da vontade deste. A infecção humana por leptospirosas depende do contato direto da pele ou mucosas com coleções de água nas quais se encontra urina de animais infectados (Segurado et al., 2016). Nas áreas rurais, a transmissão ocorre mais frequentemente por causa da deficiência de boas práticas sanitárias na manipulação animal (Silva et al., 2015).

Nos animais domésticos a leptospirose causa doenças reprodutivas reduzindo a eficiência. Em caprinos a leptospirose é responsável por causar perda de peso, anorexia, letargia, icterícia, hipertermia, abortos, mortalidade superior a 40% em casos agudos (Oliveira et al., 2013). A *Leptospira spp* está presente em sêmen e fluidos vaginais de cabras, potencializando a transmissão entre caprinos (Lilenbaum et al., 2008). Entretanto em caprinos normalmente a leptospirose apresenta-se de forma assintomática. Sendo o ponto de vista epidemiológico, a forma mais importante e responsável pela permanência de animais eliminadores da bactéria no meio ambiente, expondo outros animais e seres humanos ao risco de infecção (Araújo Neto, 2010).

No Brasil, até o presente momento, há um número restrito de investigações que tiveram êxito no isolamento de leptospirosas em pequenos ruminantes (Higino e Azevedo, 2014). Devido a importância da criação de caprinos para a região e a falta de informações epidemiológicas sobre a leptospirose caprina no Piauí, na microrregião do Alto Médio Gurguéia e sobre os fatores que predispõe a doença, este trabalho teve por objetivo verificar a presença da leptospira na microrregião e avaliar os fatores de risco para a doença.

### **Material e Métodos**

A pesquisa foi realizada em 04 (quatro) municípios da Microrregião do Alto-médio Gurguéia no Estado do Piauí (Barreiras do Piauí, Gilbués, Monte Alegre e Santa Luz), onde foram coletadas 143 amostras de caprinos, sendo aplicados questionários em cada propriedade. O diagnóstico foi realizado no Instituto Biológico em São Paulo-SP, sendo utilizada a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) contra 23 sorovares patogênicos. As leituras feitas em microscópio de campo escuro, objetiva de 10x. O critério adotado para o soro ser considerado como reagente foi de 50% de leptospirosas aglutinadas por campo microscópico em aumento de 100 vezes.

### **Resultados e Discussão**

Das 143 amostras de soro provenientes de caprinos localizados na Microrregião Alto Médio Gurgueia avaliados pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) 9,09% apresentaram reação positiva Tabela 1. O



sorovar de maior frequência foi o Icterohaemorrhagiae (5,59%), seguido por Grippytyphosa(1,4%), e Icterohaemorrhagiae + Pomona(0,7%), Icterohaemorrhagiae + Canicola(0,7%) e Icterohaemorrhagiae + Autumnalis(0,7%). O Icterohaemorrhagiae aparece em 7,69% das amostras. Dos fatores de risco encontrados através da aplicação de questionário: 85,71% compram animais para reprodução; nenhuma das propriedades realiza quarentena e não adotam critérios para cobertura das fêmeas; 100% relataram abortos na propriedade; 28,57% relataram repetição do cio; 100% não possuem assistência veterinária; 57,14% relataram não fazer vacinação alguma enquanto as 42,86% restantes realizam vacinação apenas contra raiva; 85,71% possuem outras espécies em co-pastejo; 28,57% relataram a presença de ratos e 100% abatem caprinos para consumo na propriedade.

Rizzo et al. (2014) registraram o sorovar icterohaemorrhagiae como o segundo em ordem de maior frequência ficando atrás do sorovar Autumnalis. Porém nossos resultados demonstram que o sorovar de maior frequência foi o Icterohaemorrhagiae. Esse sorovar já foi isolado no Brasil e tem os roedores sinantrópicos como principal hospedeiro de manutenção (Correia et al., 2004), sendo assim a provável fonte de infecção nos rebanhos acometidos (Rizzo et al., 2014). Schmidt et al. (2002) realizando um levantamento sorológico em caprinos leiteiros relataram a prevalência dos sorovares icterohaemorrhagiae, hardjo e pamona. Escócio et al. (2010) relatam que a resposta a múltiplos sorovares na SAM indicam exposição a várias origens, até mesmo animais silvestres, contudo não descartam a possibilidade de contágio através de animais infectados.

Em seu estudo Lilenbaum e Santos (1995) o principal fator de risco associado à soropositividade foi co-pastejo com outras espécies, principalmente porcos. Ausência de assistência veterinária ou a frequência baixa de visitas também tem sido sugerida para ser associada ao soroprevalência geral para leptospirose. Lilenbaum (2008) conclui que um fator de risco significativamente associados à soroprevalência de leptospirose foi a frequência de supervisão veterinária profissional. Higino et al. (2012) verificou que criatórios onde a presença de roedores não foi relatada apresentaram 35,9% de positividade para leptospirose, enquanto nos rebanhos com roedores a taxa observada foi de 54,3%, indicando que este fator pode ser importante na epidemiologia da leptospirose caprina na região. Também foi verificada associação entre histórico de infertilidade e prevalência de leptospirose em rebanhos nos quais houve relato de infertilidade, apresentando prevalência de 77,8%; rebanhos sem histórico de infertilidade apresentaram prevalência de 40,6%.

Nos resultados encontrados todas as propriedades relataram abortos, não possuem assistência veterinária e não executam vacinação contra leptospirose, caracterizando como fatores relevantes para a presença da leptospirose nas propriedades; mais da metade realizam co-pastejo com outras espécies podendo indicar várias origens da leptospirose.

Tabela 1. Frequência de sorovares reagentes ao teste de soroaglutinação microscópica para leptospira em 143 soros de caprinos em 04 municípios localizados na microrregião alto médio Gurguéia.

Sorovares	%	% Das propriedades Reagentes
Icterohaemorrhagiae	5,59%	61,53%
Grippytyphosa	1,4%	15,38%
Icterohaemorrhagiae+Pomona	0,7%	7,69%
Icterohaemorrhagiae+Canicola	0,7%	7,69%
Icterohaemorrhagiae+Autuminalis	0,7%	7,69%
Total	9,09	100%

## Conclusão

A leptospirose está presente em caprinos na Região do Alto Médio Gurguéia. Que a falta de medidas de controle está diretamente ligada a prevalência da leptospirose. Os fatores de riscos detectados contribuem para o aparecimento da doença e aumento da prevalência.

## Referências

- Araújo Neto JO, Alves CJ, Azevedo SS, Silva MLCR, Batista CSA.** Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.47, p.150-155, 2010.
- Correa SHR, Vasconcelos SA, Morais Z, Texeira AA, Dias RA, Guimarães Ferreira F, Ferreira Neto JS.** Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.41,p.189-193, 2004.
- Escocio C, Genovez ME, Castro V, Piatti RM, Gabriel FHL, Chiebão DP, Azevedo SS, Viera SR, Chgiba M.** Influencia das condições ambientais na transmissão da leptospirose em criações de ovinos e bovinos da região de sorocaba, São Paulo. *Arq Inst Biol*, v.77, p.371-379, 2010.
- Higino SSS, Santos FA, Costa DF, Santos CSAB, Silva MLCR, Alves CJ, Azevedo SS.** Flock-level risk factors associated with leptospirosis in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Prev Vet Med*,



v.109, p.158-161, 2012.

**Higino SSS, Azevedo SS.** Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. *Revista Arq Inst Biol*, v.81, p.86-94, 2014

**Lilenbaum W, Santos MRC.** Effect of Management Systems on the prevalence of Bovine Leptospirosis. *Vet Rec*, v.138, p.570-571, 1995.

**Lilenbaum W, Vargas R, Medeiros L, Cordeiro AG, Cavalcanti A, Souza GN, Richtzenhain L, Vasconcelos SA.** Os fatores de risco associados com a leptospirose em caprinos leiteiros em condições tropicais. *Investigação em Ciências Veterinárias*, v.84, p.14-17, 2008.

**Oliveira SV, Arsky MLNS, Caldas EP.** Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. *Revista Saúde (Santa Maria)*, v.39, p.9-20, 2013.

**Rizo H, Grregory L, Beraldi F, Castro V, Moraes ZM, Vasconcelos SA.** Soropositividade para leptospirose e desempenho reprodutivo de ovinos de criatórios localizados no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Med Vet*, v.36, p.244-250, 2014.

**Schmidt V, Arosi A, Santos AR.** Levantamento sorológico da leptospirose em caprinos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência rural*, v.32, p.609-612, 2002.

**Segurado AC, Cassenote AJ, Luna EA.** Saúde nas metrópoles – Doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, vol. 30, n° 86, 2016.

**Silva FJ, Silva GCP, Loffler SG, Brihuega B, Samartino LE, Alarcon MFF, Santos CEP, Mathias LA.** Isolamento de *Leptospira* spp. De um homem que vive em uma área rural do município de Cruz Alta, RS, Brasil. *Ciência Rural*, vol. 45, Santa Maria, 2015.



## **Avaliação morfológica, funcional e tempo de termorresistência de espermatozoides caprinos localmente adaptados**

*Morphological, functional and thermoresistance time evaluation of locally adapted goat's sperm*

**Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1,\*</sup>, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>2</sup>, Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho<sup>1</sup>, Dayana Maria do Nascimento<sup>1</sup>, Bruno da Silva Prado<sup>1</sup>, Filipe Nunes Barros<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), UFPI, Teresina, PI; <sup>2</sup>Colégio Técnico de Teresina (CTT), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: jeffersonsilva11@hotmail.com

### **Abstract**

*This study evaluated the quality of ejaculated from adapted breeds of goats as the morphologic aspects, functional and thermoresistance. An aliquot of the pool of each breed was used for morphological evaluation by wet preparation, quantifying sperm defects and dividing them into classes. The samples were cryopreserved using TK3000 machine and evaluated by thermoresistance test by checking motility and sperm vigor every hour. For plasma membrane functionality analysis, was used hiposmotic test. There was no difference ( $P > 0.05$ ) between the breeds in all sperm defects before and after cryopreservation, as well as for the thermoresistance times for motility and sperm vigor ( $P > 0.05$ ). There was a significant reduction in motility and sperm vigor 120 minutes after thawing of the samples. There was no difference ( $P > 0.05$ ) between the percentage of sperm with functional membrane between the evaluated breeds. Therefore, the evaluated breeds have morphology, functionality and similar sperm thermoresistance.*

**Keywords:** goats, thermoresistance, HOST.

**Palavras-chave:** caprino, termorresistência, HOST.

### **Introdução**

As raças caprinas naturalizadas no nordeste brasileiro, desenvolveram características adaptativas importantes. Ao longo dos anos adaptaram-se ao clima, com altas temperaturas, pouca oferta de alimentos e água, adquirindo resistência às condições desfavoráveis da região e mantendo-se férteis e prolificos mesmo em condições adversas (Rêgo et al., 2006). Este valioso material genético poderá vir a ser utilizado para restabelecer uma raça em processo de extinção, desenvolver um novo grupamento genético, dar suporte a programas de conservação *in vivo* e fornecer material para estudos moleculares visando à identificação de genes de importância econômica (Ramos et al., 2009). Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade do ejaculado de caprinos, localmente adaptados, quanto aos aspectos morfológico, funcional e de termorresistência, visando a conservação racional desse material genético.

### **Material e Métodos**

As atividades de coleta a campo foram realizadas semanalmente na Fazenda Faveira, localizada no município de Elesbão Veloso – PI, durante os meses de abril a maio de 2016. Foram utilizados 16 reprodutores caprinos das raças Azul, Canindé, Moxotó e Repartido, sendo quatro animais de cada raça. Todas as coletas de sêmen foram feitas no mesmo horário (turno da manhã), pelo método da vagina artificial, com auxílio de fêmea estrogenizada. Um *pool* dos ejaculados foram formados para análise, onde uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação dos parâmetros seminais físicos imediatos. Outra alíquota (10 µL) foi colocada em 4 mL de formol salino a 4% (diluição 1:400) (CBRA, 2013), para mensuração da morfologia espermática pela técnica da câmara úmida, utilizando microscópio de contraste de fase com aumento de 100x, contando 200 células espermáticas por lâmina e classificando quanto a defeitos maiores, defeitos de cabeça, peça intermediária, defeitos de cauda e defeitos totais.

Após a realização do cálculo de concentração espermática, com o auxílio da câmara de Neubauer, o sêmen foi diluído em meio TRIS-Gema e acondicionado em palhetas de 0,25 mL, de forma a obter  $2 \times 10^8$  espermatozoides/palheta. O processo de congelação procedeu-se em máquina automatizada, modelo TK-3000 e o armazenamento a  $-196^\circ\text{C}$  em botijão criogênico contendo Nitrogênio líquido. A descongelação ocorreu por imersão das palhetas em água a  $37^\circ\text{C}$  por 30 segundos. Imediatamente após a descongelação foram avaliados os parâmetros de motilidade/vigor espermático durante o teste de termorresistência (TTR) lento. Para o teste de funcionalidade da membrana, uma proporção de 10 µL de sêmen foi adicionado a 1mL da solução hiposmótica constituída por citrato tri-sódico e frutose, obedecendo uma concentração de 150 mOsm/L e incubados em Banho-Maria a  $37^\circ\text{C}$ , durante 60 minutos. Posteriormente, 10µL desta suspensão foi inserido sobre lâmina, coberta com laminula, e observada em microscópio de contraste de fase com aumento de 100x. O resultado é expresso em percentual pela diferença de caudas dobradas antes e após o teste, em 100 espermatozoides contados.

Para análise estatística dos dados, foi procedida a análise de variância dos parâmetros avaliados, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan, de acordo com o coeficiente de variação obtido. Foi utilizado o Software SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.0.

### Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 1, durante o teste de Termorresistência (TTR) lento, não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para os parâmetros de motilidade e vigor espermático, em nenhuma das raças avaliadas. No entanto, ao comparar os mesmos parâmetros nos diferentes tempos de incubação, houve decréscimo significativo aos 120 minutos, nas duas características. Não houve diferença significativa no vigor espermático nos tempos 120 min e 180 min pós-descongelamento ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1. Motilidade total e vigor de espermatozoides caprinos Azul, Canindé, Moxotó e Repartido, em diferentes tempos pós-descongelamento (0, 60, 120 e 180 minutos), pelo teste de termorresistência (TTR).

Parâmetros	Tempo (min.)	Raças - Reprodutores				Média
		Azul	Canindé	Moxotó	Repartido	
Mot. (%)	0	35,83 ± 11,58	41,66 ± 16,32	35,83 ± 17,72	32,5 ± 11,72	36,45 <sup>A</sup>
Vig. (1-5)	0	3,16 ± 0,40	3,33 ± 0,51	3,16 ± 0,40	2,83 ± 0,40	3,12 <sup>a</sup>
Mot. (%)	60	28,33 ± 14,02	37,5 ± 18,64	28,33 ± 14,71	28,33 ± 9,30	30,62 <sup>A</sup>
Vig. (1-5)	60	2,66 ± 0,51	2,83 ± 0,40	3,00 ± 0,63	2,83 ± 0,40	2,83 <sup>a</sup>
Mot. (%)	120	21,66 ± 14,02	28,00 ± 15,36	20,00 ± 14,14	16,66 ± 12,9	21,58 <sup>B</sup>
Vig. (1-5)	120	1,83 ± 0,75	2,33 ± 0,81	1,83 ± 0,98	2,00 ± 0,63	2,00 <sup>b</sup>
Mot. (%)	180	8,33 ± 8,01	15,83 ± 13,99	10,33 ± 8,16	12,5 ± 10,36	11,75 <sup>C</sup>
Vig. (1-5)	180	1,33 ± 0,81	2,16 ± 0,75	1,50 ± 0,83	1,66 ± 0,51	1,66 <sup>b</sup>
Mot. (%)	Média	23,54 <sup>A</sup>	30,75 <sup>A</sup>	23,62 <sup>A</sup>	22,50 <sup>A</sup>	—
Vig. (1-5)	Média	2,25 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,37 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>	—

Médias de motilidade com mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ). Médias de vigor com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).

As raças avaliadas não diferiram em relação a nenhuma das frações de defeitos espermáticos ( $P > 0,05$ ), demonstrando a apresentação de características morfológicas semelhantes. Porém, as raças Canindé e Moxotó apresentaram percentagem de defeitos maiores acima da recomendada pelo CBRA (2013), que pode levar à redução da capacidade fecundante dos espermatozoides. Todas as raças apresentaram percentagem de defeitos totais dentro do limite preconizado pelo CBRA (2013) (Tab. 2). Não houve diferença significativa entre as raças em relação à funcionalidade da membrana plasmática espermática ( $P > 0,05$ ) (Tab. 3). Vidigal (2008), estudando a morfologia espermática em caprinos SPRD observou maiores percentagens de defeitos de cabeça e de peça intermediária (1,27% e 0,91%) e menor percentagem de defeitos de cauda (3,69%) em relação ao presente estudo.

Todos os grupos apresentaram média de funcionalidade de membrana espermática pós-descongelamento superior ao observado por Bittencourt et al. (2005), ao utilizar o Glicerol como crioprotetor no diluidor seminal (16,9%), o mesmo utilizado nesse estudo. Oliveira et al. (2013) avaliando a eficácia do teste no sêmen caprino, sob diferentes osmolaridades, encontrou taxas de espermatozoides reativos ao teste, semelhantes ao observado nesse estudo, utilizando a mesma solução hiposmótica (33,25%).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos parâmetros morfológicos (defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda, defeitos maiores e defeitos totais) de espermatozoides caprinos Azul, Canindé, Moxotó e Repartido.

Parâmetros	Raças - Reprodutores			
	Azul	Canindé	Moxotó	Repartido
Defeitos de cabeça (%)	0,30 ± 0,44 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,10 ± 1,38 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>a</sup>
Defeitos de peça intermediária (%)	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,65 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Defeitos de cauda (%)	13,70 ± 7,47 <sup>a</sup>	17,50 ± 8,38 <sup>a</sup>	15,00 ± 12,85 <sup>a</sup>	8,60 ± 3,64 <sup>a</sup>
Defeitos maiores (%)	6,20 ± 2,30 <sup>a</sup>	11,60 ± 7,24 <sup>a</sup>	12,80 ± 12,95 <sup>a</sup>	6,90 ± 4,03 <sup>a</sup>
Defeitos totais (%)	12,00 ± 9,74 <sup>a</sup>	17,70 ± 8,25 <sup>a</sup>	16,50 ± 12,71 <sup>a</sup>	8,70 ± 3,54 <sup>a</sup>

Médias com mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).



Tabela 3. Valores médios (%) e desvio padrão de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST), nas raças Azul, Canindé, Moxotó e Repartido.

Parâmetros	Raças – Reprodutores			
	Azul	Canindé	Moxotó	Repartido
HOST (%)	26,66 ± 11,62 <sup>a</sup>	34,16 ± 13,74 <sup>a</sup>	25,66 ± 12,84 <sup>a</sup>	31,80 ± 15,20 <sup>a</sup>

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).

### Conclusão

As raças avaliadas apresentam morfologia, funcionalidade e termorresistência espermática semelhantes, entretanto as raças Canindé e Moxotó ultrapassaram numericamente a percentagem de defeitos maiores preconizados pelo CBRA, durante o período estudado.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à propriedade Fazenda Faveira pela cessão dos animais.

### Referências

- Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Santos ADF, Chalhoub M, Alves SGG, Vasconcelos MF, Leandro EES, Guimarães JD.** Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, v.6, p.213-218, 2005.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Oliveira IRS, Alves HM, Castelo TS, Bezerra FSB, Bezerra ACDS, Silva AR.** Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, p.216-221, 2013.
- Ramos AF, Nascimento NV, Silva AVR, Paiva Neto MA, Egito AA, Paiva SR, Castro SR, Albuquerque MSM, Mariante AS.** Qualidade do sêmen bovino estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: Simposio Iberoamericano Sobre Conservación e Utilización de Recursos Zoogenéticos, 10, 2009, Palmira, Colombia. Memórias... Palmira, Colômbia: Universidad Nacional de Colombia, 2009. p.499-502
- Rêgo JPA, Facó O, Villela LCVV, Silva FLR, Pinheiro AAP, Santos D.** O BGCON – Banco de Germoplasma de Caprinos e Ovinos naturalizados: Uma alternativa para inventariar a infra-estrutura dos recursos genéticos existentes. In: Semana da Caprinocultura e Ovinocultura Brasileiras, 5., 2006. Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: Embrapa Caprinos e Embrapa Gado de Corte, 2006. CD-ROM.
- Vidigal KF.** Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.



## **Biometria escroto-testicular de carneiros da raça Santa Inês e mestiços (Dorper + Santa Inês) criados sob sistema intensivo**

*Biometry scrotal-testicular of rams race Santa Inês and mestizos (Dorper + Santa Inês) crated under intensive system*

**Paulo Gonçalves Mariano Filho<sup>1,\*</sup>, Pedro Henrique Fonseca Silva<sup>2</sup>, Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior<sup>3</sup>, Antônio Francisco da Silva Lisboa Neto<sup>4</sup>, Morgana Santos Araújo<sup>1</sup>, Isac Gabriel Cunha dos Santos<sup>1</sup>, Azimiro Quirino de Oliveira Neto<sup>1</sup>, Jean Rodrigues de Carvalho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>2</sup>Graduado em Medicina Veterinária CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>3</sup>Professor adjunto, Curso de Medicina Veterinária CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>4</sup>Mestre em Zootecnia CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI, Brasil.

\*E-mail: paulomarianof@hotmail.com

### **Abstract**

*The objective of this study was to evaluate comparatively the scrotum, scrotal circumference of the breed rams Santa Inês and mestizos (Dorper + Santa Inês) created under intensive system. Used four rams each race healthy, aged between 18 and 24 months and scores ranging from 3 to 3.5. There were two collections of scrotum-testis to determine the characteristics for each group, seven days apart. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) for a randomized block design. The variables analyzed were submitted to Tukey test at 5% probability, to compare the scrotum-testicular parameters between the races. Based on the results obtained, it is concluded that the scrotum-testicular parameters animal Santa Inês and mestizos (Dorper + Santa Inês) created under confinement do not differ significantly ( $P < 0.05$ ).*

**Keywords:** *biometry, confinement, testicles.*

**Palavras-chave:** *biometria, confinamento, testículos.*

### **Introdução**

A busca por indicadores da fertilidade na seleção de reprodutores tem sido alvo de estudos nos últimos anos. Parâmetros testiculares, seminais, comportamentais, hormonais, e suas associações, têm sido avaliados quanto à capacidade reprodutiva, com destaque para o perímetro escrotal (Souza et al., 2007). Existe uma alta correlação entre o perímetro escrotal e/ou volume escrotal com a concentração e a normalidade espermática. Nesse contexto a morfometria testicular está sendo bastante utilizada como forma de avaliação da capacidade reprodutiva (Gonçalves et al., 2008).

A fertilidade dos ruminantes pode ser influenciada pela alimentação ou pelo manejo em que estes animais são criados. Animais que participam de leilões, por exemplo, passam por um prévio condicionamento. Levando-se em consideração o preço de um animal com boa condição corporal comparado a um animal magro é bem superior. Animais alimentados com alto teor de energia apresentam testículos maiores do que aqueles alimentados com baixo teor energético. No entanto, animais subnutridos apresentam testículo com menor volume (Fourie et al., 2004).

Estudos sobre as características biométricas de carneiros criados sob sistema intensivo no Sul do Piauí, sendo de raças puras ou não, são escassos. Dessa forma objetivou-se com este trabalho avaliar de forma comparativa a biometria escroto-testicular de carneiros da raça Santa Inês e mestiços (Dorper + Santa Inês) criados sob sistema intensivo.

### **Material e Métodos**

Foram utilizados quatro carneiros da raça Santa Inês e quatro mestiços (Dorper + Santa Inês) hípidos com idade entre 18 e 24 meses e escore de condição corporal variando de 3 a 3,5. O experimento foi conduzido no aprisco experimental do CPCE/UFPI. Os animais receberam alimentação à base de capim-elefante e suplementação com ração comercial para ovinos (500g/animal/dia), além de sal mineral e água *ad libitum*.

Após um período de adaptação dos animais às condições de criação, foram feitas duas coletas da biometria escroto-testicular para se determinar as características de cada grupo, com intervalo de sete dias, onde foram avaliados perímetro escrotal, com auxílio de uma fita métrica, do comprimento testicular e largura testicular, com auxílio de paquímetro, e do volume, sendo obtido através da fórmula  $2 [(r^2) \times \pi \times h]$ , onde  $r = \text{larg}/2$ ,  $\pi = 3,14$  e  $h =$  comprimento dos testículos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para um delineamento em blocos casualizados. As variáveis analisadas foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparar os parâmetros escroto-testiculares entre as raças.



## Resultados e Discussão

As características da biometria escroto-testicular dos animais estudados estão expressas na Tabela 1. Os ovinos mestiços tiveram em média  $31 \pm 0,9$  cm de PE. Esse valor foi inferior aos relatados por Souza e Leite (2000) para a raça Dorper (36,5 cm) e por Maia et al. (2011) em ovinos mestiços  $\frac{3}{4}$  Dorper +  $\frac{1}{4}$  Santa Inês, em regime de confinamento a céu aberto ( $34,4 \pm 4,1$  cm). Os carneiros da raça Santa Inês obtiveram em média  $29,75 \pm 4,4$  cm de PE. Nesse grupo também foi observado valores menores que os relatados por Souza et al. (2007) que descreveram um valor de 31,91 cm. Em ambos os casos, atribui-se como possível causa de variação dentre os valores escroto-testiculares, a idade dos animais, pois na literatura consultada a idade era diferente daquela dos animais desse experimento.

Tabela 1. Biometria escroto-testicular ( $x \pm dp$ ) de carneiros da raça Santa Inês e mestiços (Dorper + Santa Inês) criados sob manejo intensivo na região Sul do Piauí.

	Raças	
	Santa Inês	Mestiços
PE	$29,4 \pm 4,4$	$31,3 \pm 0,9$
CT	$7,9 \pm 1,1$	$8,1 \pm 0,4$
LT	$5,9 \pm 1,2$	$6,0 \pm 0,6$
VT	$487 \pm 231,2$	$459,5 \pm 92,1$

\*diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ); média e desvio padrão ( $x \pm dp$ ); perímetro escrotal (PE); comprimento testicular (CT); largura testicular (LT); volume testicular (VT).

Segundo Fourie et al., (2004) animais da raça Dorper manejados de forma extensiva possuem parâmetros escroto-testiculares diferentes daqueles criados em sistema intensivo. O presente estudo comparou grupos de animais criados sob o mesmo sistema. No entanto não teve diferença significativa em relação aos parâmetros escroto-testiculares avaliados ( $P < 0,05$ ), Tabela 1. A semelhança genética, o escore de condição corporal e a idade dos animais estudados podem ter sido os fatores que influenciaram na similaridade dos parâmetros avaliados entre as raças.

## Conclusão

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os parâmetros escroto-testiculares dos animais da raça Santa Inês e mestiços (Dorper + Santa Inês) criados sob confinamento não diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

## Referências

- Fourie PJ, Schwabach LM, Nesor FWC, Van Derwesthuizen C.** Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. *Small Ruminant Research*, v.54, p.53-59, 2004.
- Reichenbach H, Moraes JCF, Neves JP.** Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. In: Gonçalves P BD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2008. p.61.
- Maia MS, Medeiros IM, Lima CAC.** Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.175-179, 2011.
- Souza JAT, Campelo JEG, Macedo NA, Leal TM, Sousa Júnior A, Ronaldo M, Chaves RM.** Biometria testicular, características seminais, libido e concentração de testosterona em ovinos Da raça Santa Inês, criados a campo, na microrregião de Campo Maior, Piauí. *Ciênc Vet Tróp*, v.10, p.21-28, 2007.
- Souza WH, Leite PRM.** Ovinos de corte: A raça Dorper. João Pessoa: EMEPA-PB, 2000. 76p.



## **Caracterização das Práticas de Manejo Reprodutivo da Ovinocultura no Perímetro Irrigado das Várzeas de Sousa - Paraíba**

*Characterisation of the Reproductive Handling Practices of Sheep-raising in the Perímetro Irrigado das Várzeas de Sousa – Paraíba State*

**José Gabriel Gonçalves Lins<sup>1</sup>, Talles Luann Abrantes Ferreira<sup>1\*</sup>, Desiree Coelho de Mello Seal<sup>1</sup>, Itallo Costa Sales<sup>1</sup>, Bianca Alves Valêncio<sup>1</sup>, Serginara David Rodrigues<sup>1</sup>, Ana Valéria Mello de Souza Marques<sup>2</sup>, Amélia Lizziane Leite Duarte<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Estudante de Medicina Veterinária – IFPB Campus Sousa; <sup>2</sup>Professora Dra. do curso de Medicina Veterinária IFPB Campus Sousa, João Pessoa, PB, Brasil.

\*E-mail: talles\_abrantesjc@hotmail.com

### **Abstract**

*Sheep-raising is a promising activity in the semi-arid of the Brazilian Northeast. However, some barriers prevent the development of this type of livestock farming, such as the lack of assistance to producers and climatic factors that straight affect herd production. Therefore, it was aimed to contribute to the development of this activity, suggesting the implementation of reproductive-handling practices in PIVAS. The work in 2013 was developed in 15 among 22 productive areas intended for production in PIVAS. In 2014 it was supported 08 productive areas and in 2015, it was accompanied 066 productive areas. There was a significant change in the frequency of the implementation of some practices suggested by the extension group, for example, in 2014 and 2015, it was reached 100% of acceptance for neonate care and discarding annual rate. Finally, many of the suggested systems have not been complied because of barriers already mentioned.*

**Keywords:** extension, livestock, production.

**Palavras-chave:** extensão, pecuária, produção.

### **Introdução**

O manejo reprodutivo é constituído por medidas que buscam um aprimoramento do rebanho, trazendo assim boas respostas econômicas. Entretanto, no semiárido nordestino, encontram-se alguns entraves que impossibilitam o nosso criador de ampliar o perfil econômico na ovinocultura no que diz respeito a criação assistida e orientada. É fundamental esclarecer ao produtor que a adoção de medidas práticas de manejo reprodutivo, como a importância da nutrição e manejo sanitário são ações importantes para o desenvolvimento da produtividade (Corandin, 2011). Ademais, é necessário saber que existem outros fatores que influenciam a eficiência reprodutiva, como, por exemplo, o ambiente, e critérios de seleção do animal, incluindo genética, peso, idade, entre outros pontos determinantes. Seguindo esta premissa, no presente trabalho tivemos como principal objetivo contribuir para o desenvolvimento e consolidação da ovinocultura no Perímetro Irrigado das Várzeas de Sousa (PIVAS) através de adoção de medidas de manejo reprodutivo adequado.

### **Material e Métodos**

No ano de 2013, o presente trabalho foi realizado em 15 áreas produtivas das 22 destinadas a produção no PIVAS, em 2014 foram acompanhadas 08 áreas produtivas e em 2015 foram assistidas 06 áreas de produção. A seleção dos produtores foi realizada através da indicação de profissionais da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER), com a condição de todos serem membros da ACROPIVAS. A partir desta seleção, medidas como a caracterização socioeconômica dos produtores e avaliação dos rebanhos foram realizadas de forma que pudessemos identificar os principais entraves de cada produtor acompanhado. Foi realizado um levantamento de dados relacionados ao manejo sanitário, nutricional e reprodutivo adotados, como também avaliação das instalações de cada propriedade. A partir do resultado obtido no levantamento, foi aplicado um questionário em cada propriedade entre os períodos de julho de 2012 a janeiro de 2016. Com as informações obtidas foi montada uma matriz, com as variáveis que melhor contribuam para os objetivos do trabalho. Foi feita uma descrição qualitativa e os dados obtidos foram organizados e transformados em dados percentuais.

### **Resultados e Discussão**

Ao longo do acompanhamento, foi recomendada a realização da monta controlada e efeito macho, com o intuito de estimular as fêmeas a entrarem no cio simultaneamente facilitando assim os cuidados com as matrizes no pré-parto e pós-parto. É possível afirmar que, com a presença do macho ocorre uma aceleração quanto a retomada ao estro em fêmeas após o parto (Pacheco e Quirino, 2010). Além disso, de acordo com Guimarães (2009) a adoção desse sistema facilita a identificação de animais improdutivos ou pouco produtivos, além de permitir a programação da produção para épocas favoráveis. Entretanto, os produtores alegaram não ser possível a realização da monta controlada por não ter área suficiente a fim de separar as fêmeas do macho. Outra técnica aconselhada pelos extensionistas foi o uso de rufiões para identificação das fêmeas no cio, tal técnica não



foi implementada pelos criadores devido à falta de um animal com idade reprodutiva adequada para esse manejo. Para este propósito, devem-se utilizar animais saudáveis e jovens pela função que irão exercer. Na tabela 01, é possível observar os rebanhos que foram acompanhados em 2012/13, tendo uma evasão desta quantidade em 2014 a 2015, onde de início tinham 15 propriedades restando apenas 6 delas. As dificuldades na criação por problemas econômicos, acabaram desencadeando outros fatores, tornando-se a justificativa principal para essa desistência. Os cuidados com neonatos foi outra importante medida orientada pelos extensionistas, aos criadores os quais tiveram 100% de aceitação nos dois últimos anos avaliados. Os produtores foram orientados que logo após o nascimento, os animais deveriam receber devidos cuidados, evitando doenças de grande ocorrência em neonatos, duas dessas medidas, é o corte e cauterização do umbigo e a ingestão do colostro. Um manejo adotado pelos produtores e bastante aceito foi a substituição das matrizes velhas por fêmeas mais novas, com descarte anual de 100% nos anos acompanhados. Através desta técnica, foi possível a realização do descarte de matrizes que não estavam mais em idade reprodutiva. Todos os produtores acompanhados implementaram o descarte em seus rebanhos devido aos benefícios trazidos por esse manejo, que segundo Granados et al. (2006), este sistema é importante para a realização da limpeza no rebanho, onde somente os animais produtivos e sadios devem permanecer no rebanho, evitando o gasto com manutenção de animais com baixo nível produtivo ou ainda improdutivo. O melhoramento genético foi outra técnica aceita por todos os criadores na busca de características desejadas como: maior ganho de peso, alta prolificidade, rusticidade e maior conversão alimentar. Foi introduzido nos rebanhos do PIVAS um reprodutor Dorper PO oriundo de uma parceria com o IFPB Campus Sousa, o animal permaneceu nas várzeas de Sousa por 2 anos atendendo aos produtores na forma de rodízio entre as propriedades.

Tabela 1. Práticas de manejo reprodutivo adotados em unidades familiares produtoras de ovinos no Perímetro Irrigado das Várzeas de Sousa no alto Sertão Paraibano, entre os anos de 2012/13 e 2015.

Variáveis	2012/2013		2014		2015	
	n/N	Frequência (%)	n/N	Frequência (%)	n/N	Frequência (%)
<b>Tamanho do rebanho</b>						
Número de Animais	418		280		210	
<b>Sistema de criação</b>						
Extensivo	4/15	26,7 %	5/8	62,5 %	5/6	83,3 %
Intensivo	2/15	13,3 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Semi-intensivo	9/15	60,0 %	3/8	37,5 %	1/6	16,7 %
<b>Escrituração Zootécnica</b>						
Controle de nascimento	2/15	13,3 %	2/8	25,0 %	3/6	50,0 %
Cuidados com os neonatos	7/15	46,7 %	8/8	100 %	6/6	100 %
Controle de cobertura	1/15	6,7 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Controle de parto	2/15	13,3 %	2/8	25,0 %	3/6	50,0 %
Controle de ganho de peso	3/15	20,0 %	0/8	0 %	0/6	0 %
<b>Separa os animais por categoria</b>						
Sim	0/15	0 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Não	15/15	100 %	8/8	100 %	6/6	100 %
<b>Tipo de Monta</b>						
Monta Natural	14/15	93,3 %	8/8	100 %	6/6	100 %
Monta Controlada	1/15	6,7 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Inseminação Artificial	0/15	0 %	0/8	0 %	0/6	0 %
<b>Sincronização de Cio</b>						
Sim	1/15	6,7 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Não	14/15	93,7 %	8/8	100 %	6/6	100 %
Efeito macho	0/15	0 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Protocolos hormonais	0/15	0 %	0/8	0 %	0/6	0 %
<b>Faz uso de Rufião</b>						
Sim	0/15	0 %	0/8	0 %	0/6	0 %
Não	15/15	100 %	8/8	100 %	6/6	100 %
<b>Faz descarte anual</b>						
Sim	6/15	40,0 %	8/8	100 %	6/6	100 %
Não	9/15	60,0 %	0/8	0 %	0/6	0 %



### **Consideração Final**

A ovinocultura é promissora no PIVAS, no entanto necessita de maior assistencialismo por parte do governo, para que seja possível uma inserção de tecnologias produtivas e administrativas adequadas. As práticas de manejo reprodutivo, mesmo tendo sido observado algumas melhoras ao longo dos anos, ainda são pouco utilizadas. A falta dessas tecnologias mostra-se como um grande entrave ao desenvolvimento da cadeia de produção, além das questões climáticas que são enfrentadas pelo criador na região nordestina.

### **Agradecimentos**

Ao Instituto Federal da Paraíba Campus Sousa, ao CNPq – Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Empresa de Assistência técnica e Extensão Rural do Estado da Paraíba - EMATER-PB.

### **Referências**

- Corandin EM.** Estratégias de manejo reprodutivo em ovinos criados nos trópicos. 2011. 30p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e eficiência reprodutiva animal) Programa de pós-graduação em ciência animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2011.
- Granados LBC, Dias AJB, Sales MP.** Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. In: Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos. 1a.ed. Campos dos Goyatacazes: 2006. 54p.
- Guimarães FC.** Manejo básico de ovinos e caprinos: guia do educador/ Clóvis Guimarães Filho; Josvaldo. Rodrigues Ataíde Junior -Brasília: SEBRAE, 2009.
- Lobato EP, Ferro RAC, Santos KJG, Costa MA, Ferro DAC, Santos APP.** Manejo reprodutivo de ovinos. PUBVET, Londrina, v.7, Ed. 238, Art. 1572, agosto, 2013.
- Pacheco A, Quirino CR.** Comportamento sexual em ovinos. Rev Bras Reprod Anim, v.34, p.87-97, 2010.



## **Caracterização física e estrutural de espermatozoides no ejaculado de Caprinos Azul, Canindé, Moxotó e Repartido**

*Physical and structural characterization of sperm in the ejaculate from Azul, Caninde, Moxotó and Repartido goat races*

**Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1</sup>\*, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>2</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>, Micherlene da Silva Carneiro Lustosa<sup>1</sup>, Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho<sup>1</sup>, Dayse Andrade Barros<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – LBRA, UFPI, Teresina, PI; <sup>2</sup>Colégio Técnico de Teresina – CTT, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: jeffersonsilva11@hotmail.com

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate physically and structurally ejaculates from locally adapted goats in the rainy season. Semen pool formed by the four goats of each breed was evaluated for physical, diluted in Tris-egg yolk and frozen. After thawing, it was diluted in Tris and incubated with carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the integrity of the plasma membrane and JC1 to assess mitochondrial activity. The percentage of cells with damaged membrane and mitochondrial activity in spermatozoa between breed were compared, every hour for three hours. There was no significant difference ( $P > 0,05$ ) in relation to the percentage of cells with damaged plasma membrane, as well as between the incubation times. The Azul breed had lower mitochondrial activity ( $P < 0,05$ ). The evaluated semen of all breeds showed no significant damage to the plasma membrane in the rainy season, but the Azul breed had lower mitochondrial activity in sperm cells.*

**Keywords:** goats, semen, fluorescent probes.

**Palavras-chave:** caprinos, sêmen, sondas fluorescentes.

### **Introdução**

As raças localmente adaptadas se desenvolveram ao longo dos últimos séculos e apresentam hoje características de adaptação de extrema importância para trabalhos de melhoramento animal. Substituídas gradualmente por raças comerciais, essas raças encontram-se, em sua maioria, ameaçadas de extinção. O armazenamento de material genético das raças naturalizadas, com suas características singulares, em um banco de germoplasma é de fundamental importância (Mariante et al., 2011).

Motilidade, concentração e morfologia espermáticas são os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen. Entretanto, estudos remetem que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executada por investigadores experientes, assim como são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores (Arruda et al., 2007). Todos os testes de análise de sêmen buscam a predição da sua capacidade fertilizante. A técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (Celeghini, 2005). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar física e estruturalmente, através de sondas fluorescentes, o ejaculado de caprinos localmente adaptados.

### **Material e Métodos**

As atividades de coleta foram realizadas semanalmente na Fazenda Faveira, localizada no município de Elesbão Veloso – PI, durante os meses de abril a maio de 2016. Foram utilizados 16 reprodutores caprinos das raças Azul, Canindé, Moxotó e Repartido, sendo quatro animais de cada raça. As coletas de sêmen foram realizadas no mesmo horário (turno da manhã), pelo método da vagina artificial, com auxílio de uma fêmea estroginizada. Um *pool* dos ejaculados de cada raça foram formados para análise, onde uma alíquota de cada amostra foi retirada para avaliação dos parâmetros seminais físicos imediatos.

Após o cálculo da concentração com o auxílio da câmara de Neubauer, o sêmen foi diluído em meio TRIS-Gema e posteriormente acondicionado em palhetas de 0,25 mL. O processo de congelamento procedeu-se em máquina automatizada, modelo TK-3000, e o armazenamento a  $-196^{\circ}\text{C}$  em botijão criogênico contendo Nitrogênio líquido. A descongelamento ocorreu por imersão das palhetas em água a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. A integridade da membrana espermática foi mensurada conforme descrito por Harrison e Vickers (1990), onde alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de sêmen foram diluídas em 150  $\mu\text{L}$  de TRIS contendo 5  $\mu\text{L}$  de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20  $\mu\text{L}$  de IP (0,5 mg/mL em PBS), homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A análise se deu pela contagem de 100 espermatozoides em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000x. As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto aquelas apresentando fluorescência vermelha foram consideradas danificadas.

Para verificação da atividade mitocondrial, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de sêmen foram diluídas em 150  $\mu\text{L}$  de Tris contendo 5  $\mu\text{L}$  de JC-1 (0,15 mM em DMSO) e incubados por 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Um total de 100 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000x sob óleo de

imersão, usando filtro de emissão. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana. Para análise estatística dos dados, foi procedida a análise de variância dos parâmetros avaliados, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan, de acordo com o coeficiente de variação obtido. Foi utilizado o Software SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.0.

### Resultados e Discussão

Os resultados observados referentes aos aspectos físicos do sêmen estão dispostos na Tabela 1. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as raças avaliadas em relação a todos os parâmetros físicos (volume, turbilhamento, motilidade total, vigor e concentração espermática). Apenas a raça Canindé apresentou volume do ejaculado inferior (0,42mL) ao estabelecido pelo CBRA (2013) (0,5 – 1,5 mL). Vidigal (2008), avaliando as características físicas do sêmen de caprinos SPRD, observou média de volume do ejaculado também inferior a 0,5 mL no grupo de reprodutores com escroto bipartido. Todas as raças apresentaram média de turbilhamento abaixo do estabelecido pelo CBRA (2013) ( $\geq 4$ ) e apenas a raça Canindé apresentou vigor dentro dos padrões estabelecidos para sêmen fresco ( $\geq 3$ ). Todas as raças apresentaram motilidade e concentração espermática dentro do intervalo preconizado pelo CBRA (2013).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos parâmetros físicos (volume, turbilhamento, motilidade, vigor) e concentração espermática do sêmen de caprinos Azul, Canindé, Moxotó e Repartido, Elesbão Veloso-PI, 2016.

Parâmetros	Raças – Reprodutores			
	Azul	Canindé	Moxotó	Repartido
Volume (mL)	0,52 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,43 <sup>a</sup>
Turbilhão (0-5)	2,00 ± 1,26 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,80 <sup>a</sup>	2,43 ± 1,35 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,80 <sup>a</sup>
Motilidade (%)	75,83 ± 10,20 <sup>a</sup>	79,16 ± 3,76 <sup>a</sup>	70,83 ± 11,14 <sup>a</sup>	76,66 ± 7,52 <sup>a</sup>
Vigor (0-5)	2,50 ± 0,54 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,40 <sup>a</sup>
Concentração ( $\times 10^9$ spz/mL)	3,77 ± 1,79 <sup>a</sup>	3,98 ± 1,37 <sup>a</sup>	4,42 ± 1,50 <sup>a</sup>	3,88 ± 0,71 <sup>a</sup>

Médias com mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).

Na Tabela 2 estão presentes os resultados referentes à análise estrutural de espermatozoides caprinos criopreservados. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as raças avaliadas em relação à percentagem de células espermáticas com integridade da membrana plasmática. Resultados semelhantes, porém inferiores, foram observados por Vidigal (2008) (44,69 - 49,55%) ao comparar a taxa de integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos SPRD com e sem escroto bipartido. As raças Canindé e Repartido apresentaram maior atividade mitocondrial em relação às demais (49,70 e 44,66%, respectivamente) ( $P < 0,05$ ), sendo a raça Azul com menor percentagem de células espermáticas com atividade mitocondrial (20,08%). As técnicas de avaliação da atividade mitocondrial têm sido utilizadas em associação a técnicas reprodutivas como a criopreservação de sêmen, a qual determina considerável redução da atividade mitocondrial e, conseqüentemente, da capacidade fertilizante dos espermatozoides (Marco-Jiménez et al., 2006). Não houve diferença entre os grupos raciais ( $P > 0,05$ ) nos tempos de incubação para as duas variáveis avaliadas (integridade de membrana plasmática e atividade mitocondrial). Dessa forma, é possível observar a manutenção das características estruturais da célula espermática, mesmo após 180 minutos de descongelamento.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão das características estruturais da célula espermática do sêmen congelado de caprinos Azul, Canindé, Moxotó e Repartido, em diferentes tempos pós-descongelamento, Elesbão Veloso, 2016

Parâmetros	Tempo (min.)	Raças - Reprodutores				Média
		Azul	Canindé	Moxotó	Repartido	
Integridade de Membrana plasmática (%)	0	54,16±24,50	54,83±22,00	57,00±24,71	51,00±16,26	54,25 <sup>A</sup>
	60	56,83±18,84	59,16±21,32	60,66±25,95	53,50±13,72	57,54 <sup>A</sup>
	120	58,33±26,92	61,50±28,44	59,83±22,43	49,50±13,03	57,29 <sup>A</sup>
	180	54,16±23,25	59,00±28,00	53,16±26,34	48,33±18,31	53,66 <sup>A</sup>
	Média	55,87 <sup>a</sup>	58,62 <sup>a</sup>	57,66 <sup>a</sup>	50,58 <sup>a</sup>	
Atividade Mitocondrial (%)	0	15,66±14,03	41,00±25,74	31,33±13,88	43,83±15,43	32,95 <sup>A</sup>
	60	23,00±20,37	55,66±17,58	45,50±11,34	45,50±12,89	42,41 <sup>A</sup>
	120	19,83±16,75	50,66±22,34	42,66±6,40	45,16±11,05	39,58 <sup>A</sup>
	180	21,83±17,84	51,50±20,80	34,50±11,76	44,16±18,57	38,00 <sup>A</sup>
	Média	20,08 <sup>c</sup>	49,70 <sup>a</sup>	38,50 <sup>b</sup>	44,66 <sup>ab</sup>	

Médias com mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).

Médias com mesma letra maiúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).



### **Conclusão**

O sêmen dos caprinos das raças avaliadas não apresentou elevados danos à membrana plasmática, mesmo após 180 minutos pós-descongelamento, contudo a raça Azul apresentou menor atividade mitocondrial nas células espermáticas, que pode gerar prejuízos à sua capacidade fertilizante.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à propriedade Fazenda Faveira pela cessão dos animais.

### **Referências**

- Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC.** Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.8-16, 2007.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Celeghini ECC.** Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, p.343-352, 1990.
- Mariante AS, Albuquerque MSM, Ramos AF.** Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.64-68, 2011.
- Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS.** Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, San Diego, v.52, p.295-304, 2006.
- Vidigal KF.** Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.



## **Contagem celular e rendimento da espermatogênese em ovinos Santa Inês e mestiços Santa Inês e Dorper**

*Cell count and efficiency of spermatogenesis in ovine Santa Ines and mongrel Santa Inês and Dorper*

**Jean Rodrigues Carvalho\*, Isac Gabriel Cunha dos Santos, Pedro Henrique Fonseca Silva, Antônio Francisco Lisboa da Silva Neto, Morgana Santos Araújo, Manoel Lopes da Silva Filho, Felicianna Clara Fonseca Machado, Antônio Augusto Machado Nascimento Junior**

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: jeanrodriguesc@gmail.com

### **Abstract**

*With the objective to evaluate the efficiency spermatogenesis between sheep breeds, sixteen testicles, eight sheep, four belonging to the race Santa Ines and four of mongrel of Santa Inês and Dorper. After the castration of animals, we obtained the gonadosomatic index. Generally the average diameter, relative frequency of the stages in the life cycle of the seminiferous epithelium, yield of spermatogenesis, yield, meiotic spermatogenic yield and efficiency of Sertoli cells. There were no significant differences between the races on the phases of the cycle of the seminiferous epithelium, number of spermatids rounded, Sertoli cells, mitotic rate and effectiveness of Sertoli cells. However, the animals mongrel were higher as the population of spermatogonia, primary spermatocytes in paquíteno and in pre-leptóteno/leptóteno, yield and meiotic spermatogenic yield line. The study showed that animals mongrel of sheep breeds Santa Inês and Dorper presented higher reproductive potential when compared with pure lambs of Santa Ines.*

**Keywords:** sheep, reproduction, yield spermatogenic.

**Palavras-chave:** ovinos, reprodução, rendimento espermatogênico.

### **Introdução**

Os espermatozoides são formados a partir de divisões e diferenciações celulares, nas quais células diplóides dão origem a células haplóides maduras (França et al., 2005). O rendimento da espermatogênese permite avaliar a capacidade reprodutiva dos animais e selecionar machos destinados à reprodução (Assis Neto et al., 2003). A eficiência da espermatogênese é realizada através da quantificação de células espermatogênicas (espermatogônias do tipo A e B, espermátocitos primários e secundários e espermátides). Os resultados são obtidos a partir da comparação entre a razão obtida por meio das contagens diretas dos núcleos, com a razão teórica esperada das divisões celulares advindas da espermatogênese (Castro, 1995). Assim, o conhecimento da espermatogênese faz-se de extrema importância para avaliar animais com características reprodutivas desejáveis. Objetivou-se neste trabalho, avaliar a eficiência espermatogênica entre raças ovinas Santa Inês e mestiços de Santa Inês e Dorper.

### **Material e Métodos**

Utilizou-se dezesseis testículos, de oito ovinos, quatro desses pertencentes à raça Santa Inês e quatro de mestiços de Santa Inês e Dorper, sob confinamento no aprisco experimental da Universidade Federal do Piauí, do Campus Professora Cinobelina Elvas. Esses foram pesados, castrados e após o procedimento cirúrgico, aferiu-se o peso dos testículos para obtenção do Índice Gonadossomático, que corresponde ao peso do testículo dividido pelo peso corporal. A população de células espermatogênicas e de Sertoli foi determinada pela quantificação dos tipos celulares avaliando 20 secções transversais de túbulos seminíferos arredondados, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES) e em aumento de 400x. As correções da contagem de células espermatogênicas foram realizadas pelo diâmetro nuclear/nucleolar e espessura do corte histológico. Avaliou-se também, através da média de 10 núcleos de células germinativas por animal, a determinação do diâmetro médio nuclear (DM), mensurado com uma ocular micrométrica em aumento de 1000x. Observou-se ainda, a frequência relativa das fases do ciclo do epitélio seminífero (CES), visualizadas em 500 secções transversais de túbulos seminíferos em cada animal, em aumento de 400x. O rendimento espermatogênico foi obtido pelo coeficiente de eficiência de mitoses, calculado pelas razões entre espermátocitos primários em paquíteno e espermatogônia no estágio 1; Rendimento meiótico: calculado pela razão entre espermátide arredondada e espermátocito primário em paquíteno no estágio 1; Rendimento geral da espermatogênese: calculado pela razão entre espermátides arredondadas e espermatogônia no estágio 1 e a Eficiência das células de Sertoli, calculada pela razão entre o número total de espermátides arredondadas no estágio 1 e o número total de células de Sertoli. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos (as duas raças) e quatro repetições. As médias foram comparadas através do teste exato de Fisher a um nível de significância de 5%.

### **Resultados e Discussão**

Quanto às fases do ciclo do epitélio seminífero, não houve diferença significativa entre as duas raças

para esse parâmetro. Contudo, os animais mestiços se sobressaíram, pois apresentaram uma fase pré-meiótica (estádios 1, 2 e 3) de 50,7%, enquanto os ovinos Santa Inês exibiram um índice de 47,65%. Logo, constatou-se que os animais mestiços demonstraram tempo reduzido no processamento da fase pré-meiótica da espermatogênese, o que pode refletir em uma maior liberação de espermatozoides e, portanto, melhor qualidade seminal. A respeito das células germinativas, o número de espermátides arredondadas e células de Sertoli não diferiram de maneira significativa entre as raças. Todavia, os carneiros Santa Inês apresentaram valores superiores em comparação aos mestiços de Santa Inês e Dorper para a população de espermatogônias, espermátocitos primários em paquíteno e espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, como descrito na Tabela 1. O número de espermatogônias dos animais foram superiores aos encontrados por Santos et al. (2015), o que demonstra vantagens reprodutivas referentes a este parâmetro. Os valores de células de Sertoli encontradas para as duas raças mostraram-se menores que os relatados em ovinos Santa Inês (14,9) (Souza, 2003). No mesmo sentido, McManus et al. (2010), ao estudarem a histologia testicular de ovinos Santa Inês, observaram que os valores de células espermatogênicas são proporcionais ao número de células de Sertoli. Os carneiros Santa Inês, proporcionaram maiores números de espermátocitos em pré-leptóteno e paquíteno que os mestiços, conforme evidenciado na Tabela 1. Esses valores são inferiores aos apresentados por outros autores (Rodrigues et al., 2012). No entanto, na fase de paquíteno, os valores para ovinos foram semelhantes aos obtidos por (Carrizo Júnior et al., 2008; Santos et al., 2015). O rendimento espermatogênico verificado através da razão dos tipos celulares obtidos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES), evidenciou diferenças entre as raças estudadas a respeito do rendimento meiótico e para o rendimento espermatogênico geral, de acordo com a Tabela 2. Não houve diferença significativa entre o coeficiente mitótico e a eficácia das células de Sertoli. Ao avaliar o coeficiente de mitoses, observou-se a existência de perdas celulares nessa fase, embora tenham sido razoavelmente baixas quando comparadas a outros estudos em ovinos (Souza et al., 2003). Observou-se ainda, que essas perdas celulares se apresentaram em quantidades consideráveis nessa fase, o que acarreta na diminuição do número de espermatogônias. Os carneiros mestiços obtiveram valores superiores quanto ao número de espermátides arredondadas por paquíteno e número de espermátides arredondadas por espermatogônias do que os ovinos Santa Inês. Isso corresponde respectivamente, ao índice meiótico e rendimento geral da espermatogênese. Os animais mestiços também se sobressaíram quanto ao rendimento geral da espermatogênese. Supõe-se, que o cruzamento entre raças de ovinos Santa Inês e Dorper tenha acarretado a junção de caracteres reprodutivos desejáveis de ambas as raças, favorecendo maior eficiência espermatogênica. Lisboa Neto (2015), em sua pesquisa, demonstrou que animais mestiços de Santa Inês e Dorper possuem qualidade seminal superior aos carneiros Santa Inês. Valores para o rendimento meiótico inferiores aos encontrados neste estudo são descritos em catetos, caprinos, cobiões e bovinos (Rodrigues et al., 2012; Andreussi et al., 2013). Em contrapartida, valores maiores aos deste estudo foram relatados por Machado Júnior et al. (2012) em caprinos.

Tabela 1. Média  $\pm$  desvio padrão do número corrigido das células germinativas e células de Sertoli no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de carneiros da raça Santa Inês e mestiços de Santa Inês e Dorper (SI/DO).

Período	A	PL-L	PQ	AR	CS
SI-DO	24,25 $\pm$ 8,51 <sup>b</sup>	13,18 $\pm$ 5,19 <sup>b</sup>	22,92 $\pm$ 7,95 <sup>b</sup>	84,73 $\pm$ 24,02 <sup>a</sup>	8,03 $\pm$ 3,61 <sup>a</sup>
SI	26,88 $\pm$ 6,35 <sup>b</sup>	15,36 $\pm$ 4,49 <sup>a</sup>	26,49 $\pm$ 7,21 <sup>a</sup>	84,82 $\pm$ 22,34 <sup>a</sup>	7,50 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup>

\*<sup>a</sup>, <sup>b</sup>Letras diferentes P < 0,05 entre os ovinos da raça Santa Inês e os mestiços SI/DO pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK). A – espermatogônia; PL/L – espermátocito primário em pré-leptóteno/leptóteno; PQ – espermátocito primário em paquíteno; AR – espermátide arredondada; CS – células de Sertoli.

Tabela 2. Média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros relacionados ao rendimento espermatogênico de carneiros da raça Santa Inês e mestiços de Santa Inês e Dorper (SI/DO).

	Mestiços SI-DO	Santa Inês
Coeficiente de mitoses	0,58 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,61 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
Rendimento meiótico	3,98 $\pm$ 1,28 <sup>a</sup>	3,31 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>
Rendimento geral	3,71 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	3,31 $\pm$ 1,20 <sup>b</sup>
Eficiência das Células de Sertoli	13,99 $\pm$ 11,45 <sup>a</sup>	14,99 $\pm$ 13,99 <sup>a</sup>

\*<sup>a</sup>, <sup>b</sup>Letras diferentes P < 0,05 entre os ovinos da raça Santa Inês e os mestiços SI/DO pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK).

## Conclusão

Desse modo, o presente estudo constatou diferenças estruturais entre os testículos dos animais estudados e revelou, através das análises do rendimento geral da espermatogênese, que animais mestiços das raças ovinas Santa Inês e Dorper apresentam um maior potencial reprodutivo quando comparados com carneiros puros da raça Santa Inês.



### Referências

- Assis Neto AC, Melo MIV, Carvalho MAM, Miglino MA, Oliveira MF, Ambrósio CE, Silva SMMS, Blasquez FXH, Papa PC, Júnior JRK.** Histologic quantification of the seminiferous tubules cells and spermatogenesis yield in Agoutis (*Dasyprocta aguti*) raised in captivity. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.40(supl), p.175-179, 2003.
- Castro ACS.** A proposed acrosomal system for identifying stages of the cycle of the seminiferous epithelium and a model for the kinetics of spermatogenesis in the rabbit. Durham. 148p. Tese (PhD in Animal and Nutritional Sciences) - University of New Hampshire, 1995.
- Carrijo Junior OA, Lucci CM, Mcmanus C, Louvandini H, Martins RD, Amorim CA.** Morphological evaluation of the testicles of young Santa Inês rams submitted to different regimes of protein supplementation and drenching. *Ciênc Anim Bras*, v.9, p.433-441, 2008.
- França LR, Avelar GF, Almeida FF.** Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals, with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63, p.300-318, 2005.
- Lisboa Neto AFS.** Efeito do cruzamento racial sobre as características seminais e biometria escroto-testicular em ovinos submetidos à insulação escrotal. 2015. 58f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí.
- Júnior AA, Oliveira LS, Assis Neto AC, Alves FR, Miglino MA, Carvalho MA.** Spermatogenesis in goats with and without scrotum bipartition. *Anim Reprod Sci*, v.130, p.42-50, 2012.
- Mcmanus C, Bastos Sasak LC, Louvandini H, Dias LT, Teixeira RA, Alves JM, Lucci CM, Marsiaj PHP, Luci Sayori Murata LS.** Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, p. 396-402, fev, 2010.
- Rodrigues MH, Costa DS, Fonseca FA.** Proliferation of seminiferous epithelium cells during the postnatal development in goats. *Anim Reprod Sci*, v.135, p.25- 30, 2012.
- Santos JDF, Eufrazio RO, Pinheiro GFM, Alves FR, Carvalho MAM, Machado Júnior AAN.** Influence of the year's season on the testicular structure in sheep bred in southern Piauí, Brazil. *Pesq Vet Bras*, v.35, p.933-939, 2015.
- Souza CEA.** Avaliação da função reprodutiva de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida: estudo do desenvolvimento testicular, produção espermática e caracterização das proteínas do plasma seminal. 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Programa de Pós graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.



## **Correlação entre o perímetro torácico, peso corporal e a circunferência escrotal de caprinos da raça anglo-nubiano observados na 59ª EXPOEMA**

*Correlation between scrotal circumference and thorax circumference and between scrotal circumference and body weight of Anglo-Nubian bucks from a livestock exhibition in Maranhão, Brazil*

**Willy Kelvin dos Anjos Candeira<sup>1,\*</sup>, Hallef Mithchel Pereira Trovão<sup>1</sup>, Juliana da Silva Alves<sup>1</sup>, Sérgio Henrique Costa Júnior<sup>1</sup>, Diego Santos Almeida<sup>2</sup>, Luciana Cordeiro Rosa<sup>2</sup>, Felipe de Jesus Moraes Júnior<sup>3</sup>, Ferdinan Almeida Melo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão; <sup>2</sup>Mestres em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão; <sup>3</sup>Departamento do Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão;

<sup>4</sup>Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA.

\*E-mail: wkelvin.candeira@gmail.com

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate the correlation between the scrotal circumference and thorax circumference and between the scrotal circumference and body weight of Anglo-Nubian bucks from a livestock exhibition in Maranhão, Brazil. 15 bucks were equally divided into three groups according their ages: G1 – with 9 to 12 months old animals –, G2 – with 14 to 19 months old animals –, and G3 – with 22 to 29 months old animals. The measurements were taken while the event was happening. The data was subjected to the correlation coefficient of Pearson. The measures of the scrotal circumference had a positive correlation with the thorax circumference in the groups G1 and G2. G1 group also presented a positive correlation for the body weight. However, in this study, it was observed a negative correlation between the scrotal circumference and thorax circumference measures for the animals from the G2 and G3 groups.*

**Keywords:** goat industry, reproduction, scrotal circumference.

**Palavras-chave:** caprinocultura, reprodução, circunferência escrotal.

### **Introdução**

O grupo racial de caprinos Anglo-Nubiano apresenta animais extremamente rústicos e perfeitamente adaptáveis às diversas regiões do Brasil. Considerados de grande porte, as fêmeas apresentam estatura de 60 a 70 e os machos de estatura média entre 70 e 90 cm (Manual de Criação de Caprinos e Ovinos, CODEVASF, 2011). Possuem dupla aptidão produtiva, são animais com ótima relação osso:carne, onde as fêmeas exibem satisfatória produção leiteira. Indicadores de fertilidade, como o perímetro escrotal, na seleção de reprodutores é uma ferramenta essencial na busca de progresso genético e maximização das características zootécnicas mais desejadas na caprinocultura. Lopes *et al.* (2009) afirmam que os parâmetros corporais, testiculares, seminais, comportamentais, hormonais, e suas associações, têm sido avaliados quanto à capacidade reprodutiva, com destaque para o perímetro escrotal. Em ovinos de diferentes idades, foi reportado correlação positiva e significativa entre peso corporal e circunferência escrotal (Jobim *et al.*, 1989). Almeida (2003) relatou significativa correlação existente entre as medidas corporais e a circunferência escrotal de ovinos Santa Inês provenientes de Exposições Agropecuárias, apontando uma superioridade produtiva de animais com maior circunferência escrotal. Este estudo objetivou avaliar a correlação entre medidas corporais (peso corporal e perímetro torácico) e circunferência escrotal de caprinos da raça Anglo-Nubiano, apresentados na 59ª Exposição Agropecuária do Maranhão (EXPOEMA).

### **Material e Métodos**

Todos os animais do estudo (n=15) receberam acompanhamento veterinário diário, sendo alimentados com ração peletizada e capim elefante, com oferta de água *ad libitum*. Por categoria, foram divididos nos grupos: G1, com animais de 9 a 12 meses; G2, com animais de 14 a 19 meses; e G3, com animais de 22 a 29 meses. A obtenção dos dados foi realizada, ao preparo para o julgamento, a partir da pesagem e mensuração do perímetro torácico (PT) – com base no cilhadouro, circundando a cavidade torácica – e da circunferência escrotal (CE) – tomando base a altura da região de maior diâmetro dos testículos. Utilizou-se a análise de correlação de Pearson (r) entre as variáveis a fim de se verificar a relação entre elas.

### **Resultados e Discussão**

Os valores médios encontrados para as medidas corporais e circunferência escrotal (Tabela 1) apontam a excelência zootécnica dos animais estudados, assemelhando-se à média observada para a raça quanto ao perímetro torácico de  $86,2 \pm 5,1$  de machos de 12 a 18 meses de idade, descrita por Mello & Schmidt (2011). A respeito do peso corporal médio, os animais, por serem de genética nobre e concorrem em campeonato de julgamento, apresentaram-se satisfatoriamente dentro dos padrões para a raça – levando em consideração a categoria animal –, com média de 75 kg para machos adultos (Manual de Criação de Caprinos e Ovinos, CODEVASF, 2011). Os valores médios observados para a circunferência escrotal posicionam-se suficientemente ótimos para indicação desses animais como bons reprodutores, já que a circunferência escrotal em animais jovens é indicador útil do tamanho testicular, da capacidade de produção espermática, das características físicas do



sêmen e também da fertilidade dos machos (Peña *et al.*, 2001). Em concordância, Eloy *et al.* (1986) relatam valor médio da circunferência escrotal de 27 cm para caprinos adultos da raça Anglo-Nubiano. A associação linear entre as variáveis CE e PT (Tabela 2) apresentou correlação positiva para todos os grupos. Resultados semelhantes foram obtidos por Aguiar *et al.* (2008) em estudo realizado em ovinos jovens, relatando valor de  $r = 0,46$  para esta correlação. Lopes *et al.* (2009) obtiveram o valor de  $r = 0,17$  ao trabalhar com ovinos Santa Inês entre seis e sete meses de idade. Já a associação entre as variáveis CE e PC (Tabela 2) revelou – baixa – correlação positiva para o grupo G1, enquanto os demais grupos apresentaram correlações negativas para as mesmas variáveis. Estes dados contrastam com os resultados obtidos por Aguiar *et al.* (2008) e Lopes *et al.* (2009), que relataram valores de  $r = 0,59$  e  $r = 0,30$  em trabalhos realizados com ovinos entre quatro e cinco e entre seis e sete meses de idade, respectivamente. Outrora, ao trabalhar com caprinos mestiços de Anglo-Nubiano entre dois e quatro anos, Azevedo Neto *et al.* (2003) encontram valor de  $r = 0,73$  para a mesma associação.

Tabela 1. Valores médios e seus respectivos desvios padrão para peso corporal, perímetro torácico e circunferência escrotal de caprinos da raça Anglo-Nubiano observados na 59ª EXPOEMA.

Grupos	Média $\pm$ Desvio Padrão		
	PC (kg)	PT (cm)	CE (cm)
G1	44,8 $\pm$ 3,35	81,8 $\pm$ 3,03	26,8 $\pm$ 1,79
G2	67,6 $\pm$ 7,73	93,6 $\pm$ 5,22	28 $\pm$ 1,87
G3	88 $\pm$ 15,92	103 $\pm$ 5,92	28,6 $\pm$ 1,52

PC = Peso corporal; PT = Perímetro torácico; CE = Circunferência escrotal.

Tabela 2. Correlações entre circunferência escrotal e medidas corporais de caprinos da raça Anglo-Nubiano observados na 59ª EXPOEMA.

Grupos	r	
	CE/PT	CE/PC
G1	0,35	0,03
G2	0,12	-0,12
G3	0,16	-0,19

r = Coeficiente de correlação (Pearson); PC = Peso corporal; PT = Perímetro torácico; CE = Circunferência escrotal.

### Conclusão

O crescimento dos testículos dos caprinos é, geralmente, estacionado aos seis meses de idade, dependendo da raça. Neste estudo, constatou-se que existe correlação positiva CE/PT nos grupos G1 e G2, assim como CE/PC no grupo G1. Por outro lado, houve correlação negativa entre CE/PT para os animais dos grupos G2 e G3.

### Referências

- Aguiar CS, Santana AF, Souza ÉCA, Lima MC, Felizola CA, Cruz GAM, Farias Junior NA. Correlação entre circunferência escrotal e medidas corporais de ovinos da raça Santa Inês de 4 a 5 meses de idade. PUBVET, v.2, n.8, 2008.
- Almeida AK, Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Alves SGG, Portela APM, Guerra RD, Quintela AT, Gusmão AL, Oliveira JVL, Vale Filho VR. Circunferência escrotal e medidas corporais em carneiros Santa Inês de varias idades. Rev Bras Reprod Anim, v.27, n.2, 2003.
- Azevedo Neto J, Oliveira MAL, Azevedo SA, Souza PM, Alfaro CEP, Silva Gde A, Silva AKB, Acosta AAA. Correlações entre peso corporal, circunferência escrotal e parâmetros seminais em caprinos na região semiárida. Simpósio internacional sobre agronegócio da caprinocultura leiteira, 1. 2003, João Pessoa. [Resumos]. João Pessoa: EMEPA-PB, 2003. p. 656.
- Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF). Manual de criação de caprinos e ovinos. Brasília, 2011. 141 p.
- Eloy AMX, Lima CTF, Oliveira MAL. Aspectos andrológicos em caprinos da raça Anglonubiana. Caderno Ômega, v.2, p.17-32, 1986.
- Jobim MIM, Oberst ER, Waid VB, Moraes JCF, Ricardo JSMB. Biometria testicular em ovinos de raças de corte. I. Reprodutores racionados. Rev Bras Reprod Anim, v.13, n.4, p.247-254, 1989.
- Lopes KBP, Furtado DA, Nascimento JWBN, Guerra MG, Lopes MA, Tota LCA. Correlações entre circunferência escrotal e medidas corporais de machos da raça Santa Inês com idade entre seis e sete meses (macho 3ª categoria) observados em grandes exposições agropecuárias do Rio Grande do Norte. V Simpósio de Ciências da UNESP – Dracena. 2009.
- Mello FA, Schmidt V. Caracterização biométrica de caprinos Anglonubianos nascidos no Brasil, no período de 1993 a 2001. Arq Zootec, v.57, n.220, p.525-535, 2008.
- Peña CDO, Queiroz SA, Fries LA. Comparação entre critérios de seleção de precocidade sexual e a associação destes com características de crescimento em bovinos Nelore. Rev Bras Zootec, v.1, p.93-100, 2001.



## **Criopreservação do sêmen caprino: efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen após a descongelação**

*Cryopreservation of goat semen: Balancing time effect on semen quality after thawing*

**Layanne de Macedo Praca<sup>1</sup>\*, Tuanny Creusa Medeiros Damasceno<sup>2</sup>, Janaína de Fátima Saraiva Cardoso<sup>3</sup>, Ney Romulo de Oliveira Paula<sup>3</sup>, Danilo de Sousa Lima<sup>4</sup>, Alberto Pereira de Araujo Neto<sup>5</sup>, Kenney de Paiva Porfírio<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Mestre em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí; <sup>2</sup>Mestranda do programa de pós-graduação em Ciência animal, Universidade Federal do Piauí; <sup>3</sup>Professor do departamento Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI; <sup>4</sup>Mestre em Zootecnia e Médico Veterinário da Ouro Fino, Picos/PI; <sup>5</sup>Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Piauí; <sup>6</sup>Mestrando do programa de pós-graduação em Ciência animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: layannepraca@yahoo.com.br

### **Abstract**

*Which was used sixteen samples of adult goats semen collected using an artificial vagina were subjected to cryopreservation in order to verify the influence of equilibration time at a temperature of 5 °C on the freezability of goat semen. Were distributed in the different protocols equilibrium time: 1h equilibration time (G1); 2 h equilibration time (G2); 3h equilibration time (G3). After this process the samples were placed in liquid nitrogen vapor, and maintained for 20 min. The end was made the freezing process in cryogenics tank. Thawing was performed in a water bath at 37°C for 30 seconds. The averages for motility were 19.375 %, 16.875 % and 16.250 % respectively for G1, G2 and G3. This study demonstrated effect of equilibration period, on the viability of goat semen after the process of freeze-thaw, where the group of smaller G1 exposure time was less deleterious effects.*

**Keywords:** *balance, goat, efficiency reproductive.*

**Palavras-chave:** equilíbrio, caprino, eficiência reprodutiva.

### **Introdução**

A caprinocultura é uma das práticas pecuárias mais antigas do Brasil, cuja origem remonta aos tempos da ocupação portuguesa. Ocorre em todas as cinco grandes regiões do país, mas é mais presente no Nordeste. Essa é uma característica da criação do gado caprino brasileiro que não se dá por pura preferência, no entanto, uma vez conhecidas as configurações geosociais nordestinas, encontra-se parte dos motivos pelos quais nove entre dez cabeças do gado caprino brasileiro estão nessa região (IBGE, 2013). O rebanho brasileiro de caprinos cresceu consideravelmente nos dois últimos anos. Em 2014 o rebanho mundial de caprinos era da ordem de 1.006.785.725 milhões (FAO, 2015).

Segundo Costa (2013), para aumentar os índices de produtividade da espécie caprina torna-se necessário maximizar o seu potencial biológico, mediante programas de reprodução programada, que podem promover o melhoramento genético e como consequência dele, o aumento da eficiência produtiva dos caprinos, sendo assim, a inseminação artificial associada a congelamento de sêmen, tem como a principal justificativa, o melhoramento genético dos rebanhos, pela habilidade em produzir uma grande progênie por macho, e em diversos lugares diferentes ao mesmo tempo. Apesar do grande número de protocolos que vem sendo testados para a congelamento de sêmen caprino, os métodos de congelamento são provenientes de trabalhos realizados com bovinos e que tiveram bons resultados nessa espécie (Leboeuf et al., 2000). Devido à carência de protocolos de congelamento (curva de resfriamento e tempo de equilíbrio), específicos para essa espécie, esse trabalho teve o objetivo de testar diferentes aspectos do processo de criopreservação celular, entre eles: tempos de equilíbrio, afim de minimizar os efeitos deletérios ocorridos durante o processo da criopreservação seminal.

### **Material e Métodos**

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada em todas as amostras de sêmen descongelados pelo teste de termorresistência (TTR), que consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0, 2mL em um *eppendorf* de 1,5mL, e incubado a 37°C, por um período de 120 minutos. A motilidade e o vigor espermático foram avaliados pelo TTR nos diferentes tempos: 0, 60, 120, 180 minutos.

Para a avaliação da integridade das membranas foram utilizadas nesse estudo dois fluorocromos, o acetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo, segundo a técnica descrita por Harrison e Vecks (1990). Foram avaliados 100 espermatozoides em microscópio de fluorescência, os quais foram classificados como íntegros, quando a cabeça do espermatozoide se encontrava com a coloração verde, e lesados, quando observava uma coloração vermelha. No tocante a análise estatística, os índices obtidos na realização deste trabalho foram avaliados pelo PROC GLM (Software Statistical Analysis System for Windows SAS<sup>®</sup>) (SAS, 2001) e procedeu-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.



## Resultados e Discussão

Após o teste de termorresistência (TTR), foi verificada diferença significativa tanto entre os tratamentos como também entre os grupos avaliados. ( $P < 0,05$ ) onde, o tratamento T0 foi o que obteve melhores índices de motilidade e vigor espermático tabela 1. Já entre os grupo avaliados (G1, G2, G3), O grupo 1 foi o que apresentou maior viabilidade. Tanto o vigor quanto a motilidade espermática apresentaram comportamentos semelhante ao TTR, em função do tempo de avaliação, permanecendo alto no T0 do teste, caindo nas horas seguintes, e posteriormente, na hora final do teste a viabilidade espermática observada foi nula. Esses dados corroboram com Kumar (2000) que observou o mesmo comportamento para avaliação seminal durante a realização do TTR. Ramos (2012), utilizando o tempo de resfriamento de 3H obteve resultado similar (58,3) ao observado no presente estudo, que foi (59) de espermatozoides íntegros utilizando o mesmo tempo de refrigeração.

Tabela 1. Médias e desvios padrão de motilidade e vigor para os espermatozoides dos diferentes grupos (1h, 2h, 3h) utilizando quatros tratamentos (T 0, T 60, T120, T 180), logo após o teste de Termoresistência (TTR).

		Motilidade (%)	Vigor (0-5)
Grupo 1	T 0	18% $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	1,75 $\pm$ 0,47 <sup>Aa</sup>
	T 60	9% $\pm$ 0,04 <sup>Ba</sup>	1,00 $\pm$ 0,44 <sup>Ba</sup>
	T 120	3% $\pm$ 0,03 <sup>Ca</sup>	0,50 $\pm$ 0,49 <sup>Ca</sup>
	T 180	0 <sup>Ca</sup>	0 <sup>Ca</sup>
Grupo 2	T 0	19% $\pm$ 0,11 <sup>Aa</sup>	1,68 $\pm$ 0,47 <sup>Aa</sup>
	T 60	7% $\pm$ 0,04 <sup>Bab</sup>	1,25 $\pm$ 0,50 <sup>Ba</sup>
	T 120	1% $\pm$ 2,00 <sup>Ca</sup>	0,28 $\pm$ 0,44 <sup>Ca</sup>
	T 180	0 <sup>Ca</sup>	0 <sup>Ca</sup>
Grupo 3	T 0	14% $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	1,43 $\pm$ 0,62 <sup>Aa</sup>
	T 60	5% $\pm$ 0,03 <sup>Bd</sup>	1,00 $\pm$ 0,44 <sup>Ba</sup>
	T 120	1% $\pm$ 0,02 <sup>Ca</sup>	0,10 $\pm$ 0,34 <sup>Ca</sup>
	T 180	0 <sup>Ca</sup>	0 <sup>Ca</sup>

Medias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si ( $P > 0,05$ ) pelo teste de tukey 5% de probabilidade.

Pugliesiet et al. (2012) utilizando protocolo similar de tempo de resfriamento (1, 2 3H) verificou valor médio de 27,3% de espermatozoides íntegros em todos os tratamentos, não havendo diferença entre os mesmos.

Estes resultados não corroboram com os relatos de Manjunath et al. (2002), Manjunath e Thérien, (2002), Bergeron (2006) e Santos et al. (2013), onde ao realizarem trabalhos semelhantes apontam haver diferença estatística nos grupos testados, descrevem ainda que as lipoproteínas de baixa densidade presentes na gema de ovo competem com os peptídeos catiônicos presentes no plasma seminal, os quais são prejudiciais à membrana espermática, além de formar um complexo contra as proteínas do plasma seminal.

## Conclusão

O presente estudo permite concluir que períodos mais breves de resfriamento usados durante o pré-congelamento diminuem as lesões causadas pelo processo de criopreservação do sêmen caprino.

## Referências

- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal, 3ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013, 104p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** Índice de Produção Pecuária: produção da pecuária municipal. Dados de 2002 a 2011. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal). Acesso em: 30 Set. 2015.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141, 2000.
- Manjunath P.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF.** The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooled machines. *Cryobiology*, v.46, p.246-253, 2003.
- Pugliesi G, Fürst R, Carvalho GR.** Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões. *Rev Bras Ciênc Vet*, v.19, p.172-177.



## **Desempenho reprodutivo de cabras nativas da raça Canindé submetidas a regime de manejo semi-intensivo nas épocas, seca e chuvosa, em região semiárida**

*Reproductive performance of native goats Caninde race subjected to semi-intensive management system in the dry and rainy seasons in semiarid region*

**José André Júnior<sup>1,\*</sup>, Aurino Alves Simplício<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN); <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN), Parnamirim, RN, Brasil.

\*E-mail: zeandre\_ufersa@yahoo.com.br

### **Abstract**

*The aim of this study was to evaluate the reproductive performance of native goats of Canindé breed, kept in semi-intensive management system in semiarid region of Northeast Brazil. The does were maintained in native pasture predominantly composed by "caatinga". And also received supplementation with multiple mixture throughout the year, regardless of the season, rainy or dry. Three hundred and seventy seven females were submitted to five breeding seasons. The percentages of pregnancy and parturition were 85.94% and 82.22%, respectively and the prolificacy was 1.24. It is concluded that the season of breeding season occur can affect the reproductive performance of native goats in the semi arid zone of Brazil.*

**Keywords:** breeding season, fertility, production system.

**Palavras-chave:** estação de monta, fertilidade, sistema de produção.

### **Introdução**

A produção de caprinos é uma atividade pecuária importante na zona semiárida do Nordeste do Brasil. Em geral, os sistemas de produção, particularmente em exploração para corte, no semiárido são baseados em regime de manejo extensivo usando a Caatinga nativa como suporte forrageiro. E, praticados, principalmente nas pequenas propriedades onde predominam a agricultura familiar (Costa et al., 2010). As adversidades climáticas inerentes ao semiárido nordestino contribuem para que a atividade pecuária na região assumam um elevado grau de risco. Por outro lado, a caprinocultura desponta como sendo uma das principais alternativas para geração de renda e redução da insegurança alimentar na região (Roberto et al., 2010). A estacionalidade das chuvas por longo período, no nordeste brasileiro, contribui negativamente para a fertilidade e a taxa de reprodução dos caprinos o que implica em variações sazonais na disponibilidade de produtos no mercado e a mudanças significativas no preço e, na renda dos produtores. No entanto, ressalta-se que a escassez e a irregularidade na distribuição das chuvas podem ser vista como uma oportunidade para que se busque a organização e gestão da atividade, com sua inserção nos mercados mais exigentes, independentemente do tipo de produtor (André Júnior et al., 2013). O desempenho reprodutivo e produtivo dos caprinos guarda relação direta com o genótipo, o bem-estar animal, o regime de manejo em uso e as práticas de manejo alimentar, da nutrição, da prevenção de doenças e promoção da saúde e reprodutivo (Simplício e Simplício, 2006). Nesse contexto a eficiência reprodutiva, possivelmente é o parâmetro que mais contribui para elevar a produtividade dos rebanhos, em especial, por ser possível aperfeiçoá-la mediante o uso de técnicas, ressaltando-se a importância da gestão do ambiente; das práticas de manejo anteriormente enumeradas e do descarte orientado. Uma opção de manejo para contornar o desafio da escassez e irregularidade na distribuição das chuvas é programar a estação de monta que permite a maior uniformidade da produção, favorecendo a avaliação reprodutiva e produtiva das matrizes e reprodutores; a seleção e o melhoramento dos rebanhos (De Moura Neto et al., 2010). O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho reprodutivo de cabras nativas da raça Canindé submetidas ao regime de manejo semi-intensivo nas épocas, seca e chuvosa, na zona semiárida do Nordeste.

### **Material e Métodos**

O sistema foi implantado na Estação Experimental Terras Secas, situada nas coordenadas geográficas: Latitude 05°17'43,05"S; Longitude 36°16'24,64"O e a Altitude de 57 metros, de propriedade da EMPARN, município de Pedro Avelino. O rebanho foi desafiado para se obter a média de três partos, a cada dois anos, no período de agosto de 2011 a dezembro de 2015 contemplando cinco (05) estações de monta e cinco (05) de parto visando a exploração mista, isto é, a produção de leite, carne, pele e esterco. As fêmeas tiveram como suporte forrageiro a pastagem nativa constituída por caatinga, mantendo-se um animal adulto, para 1,5 hectares/ano e independente da época, chuvosa ou seca. Aos animais adultos foi permitido acesso diário e livre a mistura múltipla, em cocho coletivo. Os reprodutores foram mantidos em baias individuais, com acesso a capim elefante verde picado, à vontade e a 400 g, diária, de uma mistura concentrada a base de milho triturado, 70,0%; farelo de soja, 25,0%; sal mineral com monensina, 2,0% e cloreto de sódio, 3,0%. Ainda, submetidos a avaliação clínica e andrológica não apresentando alterações que pudessem afetar o desempenho reprodutivo. As estações de monta (EM) duravam 49 dias e os intervalos entre partos (IP) programados para oito (08) meses. Aproximadamente, 25 dias após o término da EM as cabras foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia. Para as

análises estatísticas, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilco pela função shapiro test (x) do programa R Core Team (2013). Para verificação da normalidade dos dados foram usados métodos não paramétricos para os dados de porcentagem de gestação, fertilidade ao parto e prolificidade e aplicado o teste de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5,0%.

### Resultados e Discussão

Obteve-se 310 partos das 377 matrizes correspondendo a média de 2,78 partos por matriz a cada dois anos. A primeira quadra chuvosa superou a média pluviométrica histórica da região que é de 589,50 mm (EMPARN, 2016) e de forma bem distribuída. Durante o período avaliado verificou-se que no ano de 2011 concentrou-se a maior quantidade de chuvas com 37,6% do acumulado dos cinco últimos anos, enquanto os anos de 2012, 2013, 2014 e 2015 registraram 12,2%, 10,0%, 18,2% e 22,0% do acumulado, nessa ordem (Fig. 1).

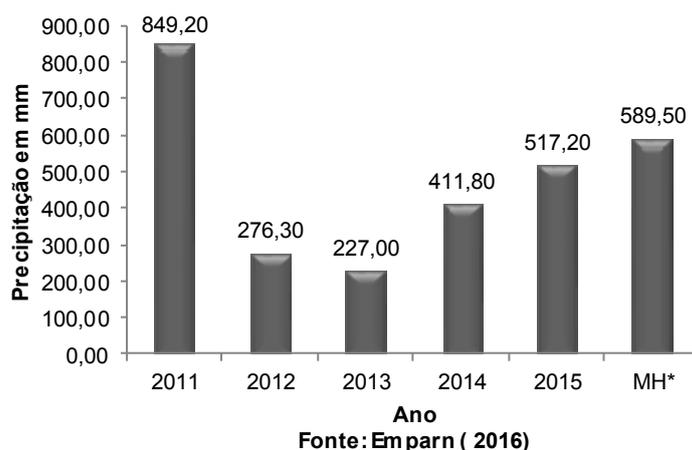


Figura 1. Precipitação pluviométrica nos últimos cinco anos

A fertilidade ao parto (FP) foi influenciada pelas estações de monta (EM) que, por sua vez, refletiram as condições do tempo nas épocas em que elas ocorreram. De Moura Neto et al. (2014) avaliaram o efeito da EM num sistema de produção de caprinos suplementados na época seca no semiárido e descrevem como valores médios para as raças Canindé e Repartida 63,33% e 1,27 para FP e prolificidade (P), respectivamente. O valor médio de 82,22% encontrado em nosso estudo para FP supera o descrito pelos autores, mas a P de 1,24 foi inferior. Ressalte-se que os sistemas de produção se distinguem quanto à frequência de suplementação das matrizes, onde no sistema avaliado a suplementação foi contínua independente de época. Isto sugere que a suplementação ao longo do ano favorece, positivamente a obtenção de elevada FP quando comparada aquela disponibilizada, apenas na época seca (Tab. 1). O valor de FP nesse estudo foi superior aos 80,50% descrito por Nogueira et al. (2011) em estudo para avaliar o efeito de regimes alimentares em cabras nativas mantidas em pastagem nativa de caatinga, mas os autores descrevem a prolificidade média da ordem de 1,40. Na investigação de Nogueira et al. (2011) as fêmeas foram suplementadas com mistura concentrada, uma vez ao dia, enquanto em nosso trabalho foi usado proteinado de baixo consumo.

Tabela 1. Diagnóstico de gestação (DG), fertilidade ao parto (FP), prolificidade (P), taxa de desmame (TD) e de reprodução (TR) para as estações de monta (EM).

EM	DG, %	FP, %	P	TD, %	TR
I	92,59 ± 0,26 <sup>a</sup>	87,65 ± 0,33 <sup>ab</sup>	1,58 ± 0,50 <sup>a</sup>	94,36 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,28
II	66,67 ± 0,47 <sup>b</sup>	62,96 ± 0,49 <sup>c</sup>	1,47 ± 0,50 <sup>a</sup>	82,35 ± 0,30 <sup>ab</sup>	0,74
III	83,95 ± 0,37 <sup>a</sup>	75,31 ± 0,43 <sup>bc</sup>	1,11 ± 0,32 <sup>b</sup>	93,44 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,79
IV	91,42 ± 0,28 <sup>a</sup>	91,43 ± 0,29 <sup>ab</sup>	1,54 ± 0,50 <sup>a</sup>	78,12 ± 0,71 <sup>b</sup>	1,10
V	98,44 ± 0,13 <sup>a</sup>	98,44 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,60 <sup>a</sup>	83,07 ± 0,37 <sup>ab</sup>	1,45
Total	85,94 ± 0,30	82,22 ± 0,33	1,24 ± 0,48	86,56 ± 0,32	1,07

Médias seguidas de letras diferentes (a,b,c) na mesma coluna, diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P < 0,05).



### **Conclusão**

A estação de monta programada aliada a suplementação proteico-energética ao longo do ano favoreceu a obtenção de índices reprodutivos e produtivos compatíveis com a exploração mista de caprinos no semiárido NORDESTINO e foco no IP com oito meses de duração.

### **Agradecimentos**

Ao BNB e A EMPARN.

### **Referências**

**André Júnior J, Medeiros HR, Correia Andre DH.** Sistema misto de produção de caprinos nativos como estratégia para viabilidade econômica na Mesorregião Central Potiguar. *Revista Centauro*, v.4, n.1, p 07-14, 2013.

**Costa RG, Dal Monte HLB, Pimenta Filho EC, Holanda Júnior EV, Cruz GRBD, Menezes MPC.** Typology and characterization of goat milk production systems in the Cariris Paraibanos. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.656-666, 2010.

**De Moura Neto JB, Moreira JN, Nogueira DM, Voltolini TV, de França CA.** Efeito da estação de monta e do tipo de cruzamento sobre o desempenho de cabras na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Rev Cient Prod Anim*, v. 12, p.60-63, 2014.

**Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio grande do Norte (EMPARN).** Monitoramento pluviométrico. Disponível em: <http://189.124.135.176/monitoramento/monitoramento.php>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

**Nogueira DM, Voltolini TV, Moreira JN, Lopes Júnior ES, de Oliveira VG.** Efeito de regimes alimentares sobre o peso corporal e parâmetros reprodutivos de cabras nativas. *Archivos de zootecnia*, v.60, p.1339-1342, 2011.

**Simplicio AA, Simplicio KMMG.** Caprinocultura e ovinocultura de corte: Desafios e oportunidades. *Revista do CFMV*, n.39, p.7-18, 2006.



## **Desenvolvimento ponderal de crias caprinas da raça Canindé exploradas em regime de manejo semi-intensivo na zona semiárida da região Nordeste**

*Growth rate of Canindé kids explored under semi-intensive management system in the semiarid zone of Northeast region*

**José André Júnior<sup>1,\*</sup>, Aurino Alves Simplício<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN); <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN), Parnamirim, RN, Brasil.

\*E-mail: zeandre\_ufersa@yahoo.com.br

### **Abstract**

*The aim of this study was to evaluate the weight development of native kids of Canindé breed, from birth to 84 days of age in semiarid zone of Northeast Brazil. The does were maintained in native pasture predominantly composed by "caatinga". And also received supplementation with multiple mixture throughout the year, regardless of the season, rainy or dry. Three handed and seventy seven females were submitted to five breeding seasons. There were single, double and triple births. The type of birth, season and sex affect the total weight while the player did not affect the overall weight of the kids.*

**Keywords:** *production system, breeding season, birth season.*

**Palavras-chave:** sistema de produção, estação de monta, estação de parto.

### **Introdução**

A produção de caprinos é uma atividade pecuária importante na zona semiárida do Nordeste do Brasil. No entanto, os sistemas de produção, particularmente em exploração para corte, no semiárido, em geral, são baseados em regime de manejo extensivo usando a Caatinga nativa como suporte forrageiro. E, praticados, principalmente nas pequenas propriedades onde predominam a agricultura familiar (Costa et al., 2010). No nordeste brasileiro a escassez e má distribuição das chuvas, por longo período, pode afetar negativamente o desempenho reprodutivo dos caprinos. Bem como o desenvolvimento das crias e, em consequência, a disponibilidade de produtos no mercado e a mudanças significativas no preço de comercialização e na renda dos produtores. Ressalta-se, ainda, que a escassez e a irregularidade na distribuição das chuvas podem ser vistas como uma oportunidade para que se busque a organização e gestão da atividade, com sua inserção nos mercados mais exigentes, independentemente do tipo de produtor (André Júnior et al., 2013). O desempenho reprodutivo e produtivo dos caprinos guarda relação direta com o genótipo, o bem-estar animal, o regime de manejo em uso e as práticas de manejo alimentar, da nutrição, da prevenção de doenças e promoção da saúde e reprodutivo (Simplício e Simplício, 2006). Com este enfoque, a eficiência reprodutiva, possivelmente é o parâmetro que mais contribui para se otimizar a eficiência produtiva dos rebanhos. Pois, é possível elevar esse parâmetro por meio do uso de técnicas, destacando-se a importância da gestão do ambiente; das práticas de manejo anteriormente enumeradas; do descarte orientado dos animais adultos e dos cuidados dispensados as crias no período de amamentação e na fase de recria. As características relacionadas ao crescimento do animal geralmente sofrem influências de fatores genéticos e ambientais, nesse foco, o desenvolvimento ponderal é uma peculiaridade que pode ser usada para representar o processo do crescimento dos animais, uma vez que, ao relacionar o peso com a idade dos animais, é possível alinhar os programas alimentares para identificar a idade mais adequada para abate (Figueiredo Filho et al., 2012). Mas, ainda são escassos estudos relacionados à influência desses fatores sobre desenvolvimento de crias caprinas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento das crias do nascimento aos 84 dias de vida, independente da época em que os partos ocorreram na zona semiárida do Nordeste.

### **Material e Métodos**

O sistema foi implantado na Estação Experimental Terras Secas, situada nas coordenadas geográficas: Latitude 05°17'43,05"S; Longitude 36°16'24,64"O e a Altitude de 57 metros, de propriedade da EMPARN, município de Pedro Avelino, no período de agosto de 2011 a dezembro de 2015 contemplando cinco (05) estações de monta e cinco (05) de parto visando a exploração mista, isto é, a produção de leite, carne, pele e esterco. As cabras tiveram como suporte forrageiro a pastagem nativa constituída por caatinga, mantendo-se um animal adulto, para 1,5 hectares/ano e, independente da época, chuvosa ou seca, a mistura múltipla com acesso diário e livre em cocho coletivo. Os reprodutores foram mantidos em baias individuais, com acesso a capim elefante verde picado, à vontade e a 400 g, diária, de ração concentrada a base de milho triturado; farelo de soja; sal mineral com monensina e cloreto de sódio. As matrizes foram expostas a cinco EM seguindo as relações matrizes: reprodutor de 40:1 e 41:1; 40:1 e 41:1; 40:1 e 41:1; 43:1 e 27:1; 26:1 e 38:1; com os reprodutores A, B, C e D. As estações de monta (EM) duravam 49 dias quando os reprodutores permaneciam juntos as matrizes, apenas, das 17:00 horas às 07:30 do dia seguinte. Os intervalos entre partos (IP) foram programados para oito

(08) meses de duração. Salienta-se que os reprodutores foram submetidos a avaliação clínica e andrológica não apresentando alterações que pudessem afetar o desempenho reprodutivo. Após 25 dias do término da EM as cabras foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia. Durante todo o período de amamentação as crias tinham acesso às mães das 17:00 horas até às 07:00 horas da manhã seguinte. Do nascimento até o desmame, ocorrido aos 63 dias, as crias permaneceram confinadas no centro de manejo com acesso a ração concentrada a base de milho triturado, farelo de soja, cloreto de sódio e sal mineral com monensina a contar do início da segunda semana de vida. E, acesso a volumoso a partir dos 42 dias de vida. Observou-se a ocorrência de ruminação, por poucas crias, já no final da terceira semana de vida, mas a existência de consumo mais expressivo somente a partir do final da quarta/início da quinta semana de vida. O desenvolvimento das crias foi acompanhado do nascimento até o desmame e feita análise de variância sendo aplicado o teste de Tukey ao nível de significância de 5,0%.

### Resultados e Discussão

Durante o período avaliado verificou-se que no ano de 2011 concentrou-se a maior quantidade de chuvas com 37,6% do acumulado dos cinco últimos anos, enquanto os anos de 2012, 2013, 2014 e 2015 registraram 12,2%, 10,0%, 18,2% e 22% do acumulado respectivamente. (Fig. 1).

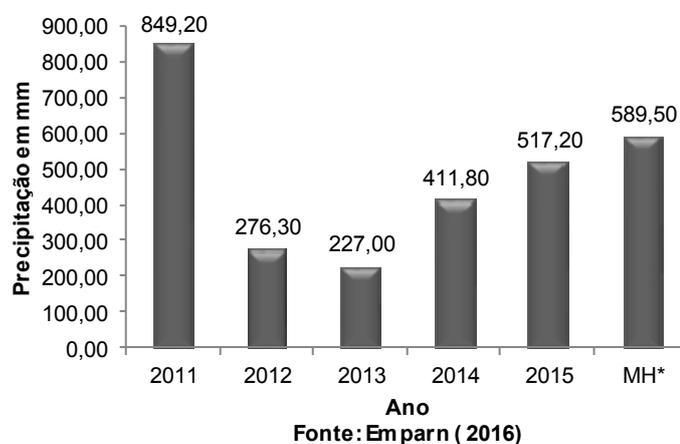


Figura 1. Precipitação pluviométrica nos últimos cinco anos.

Verificou-se efeito significativo ( $P < 0,05$ ) no desenvolvimento das crias do nascimento até aos 84 dias. Ressalte-se que o peso aos 84 dias retrata o peso ao desmame, corrigido (Tab. 1).

Evidencia-se que o tipo de nascimento afeta, positivamente o peso médio das crias, isto é, nascimentos múltiplos produzem mais kg de crias ao desmame independente da época do nascimento. Sarmento et al. (2010) descrevem efeito significativo ( $P < 0,05$ ) da ordem de parto sobre a prolificidade enfatizando que a chance de ocorrência de partos múltiplos aumentava com o aumento da idade da matriz. Para Figueiredo Filho et al. (2012) os efeitos ambientais, do ano e época de nascimento, do tipo de nascimento, do sexo e rebanho são responsáveis pela grande variação da curva de crescimento ajustada ao peso à medida que a idade dos caprinos aumenta. Essas informações corroboram com os achados em nosso estudo e dão suporte a acertiva que práticas de manejo, em particular do ambiente, da promoção da saúde e nutrição, favorecem o desenvolvimento corporal das crias no transcorrer do período de amamentação. Ressalte-se que não houve efeito ( $P > 0,05$ ) dos reprodutores sobre o desenvolvimento das crias (Tab. 2).

Tabela 1. Peso ao nascer (P0), peso aos 28 dias (P28), peso aos 56 dias (P56), peso aos 84 dias (P84), em kg, em função do tipo de nascimento.

Variável	Tipo de nascimento		
	Simples	Duplo	Triplo
P0	2,06 ± 0,43 <sup>c</sup>	3,83 ± 0,80 <sup>b</sup>	5,43 ± 0,91 <sup>a</sup>
P28	4,18 ± 1,03 <sup>c</sup>	6,38 ± 1,98 <sup>b</sup>	9,83 ± 1,73 <sup>a</sup>
P56	6,98 ± 2,10 <sup>c</sup>	10,86 ± 3,77 <sup>b</sup>	14,67 ± 3,48 <sup>a</sup>
P84	8,91 ± 2,91 <sup>b</sup>	13,53 ± 4,93 <sup>a</sup>	16,40 ± 4,35 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).



Tabela 2. Peso ao nascer (P0), peso aos 28 dias (P28), peso aos 56 dias (P56), peso aos 84 dias (P84), em kg, em função do reprodutor.

Variável	Reprodutor			
	A	B	C	D
P0	3,17 ± 1,19	2,86 ± 1,18	2,79 ± 1,08	3,06 ± 1,11
P28	5,32 ± 1,73	4,76 ± 1,75	5,25 ± 2,06	5,98 ± 2,30
P56	9,02 ± 3,52	8,67 ± 3,16	8,96 ± 3,68	9,42 ± 4,28
P84	11,60 ± 4,60	10,92 ± 3,95	11,42 ± 4,79	10,95 ± 5,16

Médias seguidas de letras distintas, na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

### Conclusão

O tipo de nascimento a estação e o sexo das crias interferem no peso total enquanto, o reprodutor não afeta o peso total das crias.

### Agradecimentos

Ao BNB e A EMPARN.

### Referências

- André Júnior J, Medeiros HR, Correia Andre DH.** Sistema misto de produção de caprinos nativos como estratégia para viabilidade econômica na Mesorregião Central Potiguar. *Revista Centauro*, v.4, p.7-14, 2013.
- Costa RG, dal Monte HLB, Pimenta Filho EC, Holanda Júnior EV, Cruz GRBD, Menezes MPC.** Typology and characterization of goat milk production systems in the Cariris Paraibanos. *Rev Bras Zootec*, v.39, n.3, p.656-666, 2010.
- Figueiredo Filho LAS, Sarmiento JLR, Campelo JEG, da Silva Santos NP, de Sousa JER, Biagiotti D.** Fatores ambientais e genéticos sobre a curva de crescimento de caprinos mestiços. *Comunicata Scientiae*, v.3, p.154-161, 2012.
- Sarmiento JLR, Pimenta Filho EC, Abreu UD, Ribeiro MN, Sousa JD.** Prolificidade de caprinos mestiços leiteiros no semiárido nordestino. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.1471-1476, 2010.
- Simplicio AA, Simplicio KMMG.** Caprinocultura e ovinocultura de corte: Desafios e oportunidades. *Revista do CFMV*, n.39, p.7-18, 2006.



## **Deteção de *Brucella ovis* por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de urina de ovinos naturalmente infectados na microrregião de Teresina, PI**

*Brucella ovis* detection by polymerase chain reaction (PCR) in naturally infected sheep urine samples in the micro region of Teresina, PI

**Letícia Soares de Araújo Teixeira, Misael das Virgens Santana, Flaviane Alves de Pinho, Gustavo Henrique Chaves Martins, Patrícia Maria Almeida Queiros, Francisco Felipe Ferreira Soares, Francisca Dácia Arruda Viana, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro\***

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

\*E-mail: lysbarradas@yahoo.com.br

### **Abstract**

*Ovine Brucellosis is an infectious disease responsible for the production of reproductive disorders, triggering economic losses to sheep production. The research's objective was detect B. ovis DNA in sheeps belonging to cities in the micro region of Teresina-PI. Thus, were collected 100 urine and blood samples of sheeps older than or equal to six months. Urine samples were subjected to conventional PCR and samples of blood AGID technique. From 100 blood samples, 17 (17%) were reactive to AGID. In conventional PCR, from 100 urine samples, six (6%) were positive. There was agreement between the tests, however, was considered weak (18.9%), based on the Kappa coefficient ranking. Thus, it was observed that both techniques are valid and can be regarded as tools of choice for the diagnosis of ovine brucellosis.*

**Keywords:** *Brucella ovis*, PCR, urine.

**Palavras-chave:** *Brucella ovis*, PCR, urina.

### **Introdução**

A brucelose é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica comum a diversas espécies animais, como, por exemplo, a espécie ovina, onde a infecção por *B. ovis* ocasiona epididimites, orquites, abortamentos, elevada frequência de nascidos vivos, contudo, apresentando baixo peso e baixa viabilidade condicionando, dessa forma, a elevada mortalidade dos cordeiros (Nozaki et al., 2008).

O agente etiológico da brucelose ovina, *B. ovis* pertence ao gênero *Brucella*, o qual alberga nove espécies já descobertas e conhecidas (Schlabritz - Loutsevitch et al., 2009). Dentre as doenças da reprodução a brucelose tem destaque, pois acomete e compromete os órgãos reprodutivos tanto de machos como de fêmeas, provocando sérios distúrbios que culminam, como consequência, no desencadeamento de elevados prejuízos econômicos ao sistema de produção e aos criadores de animais.

Dentre as novas tecnologias, a aplicação da análise de DNA tem se intensificado muito nos últimos anos, e o desenvolvimento do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido largamente empregado nas áreas biológicas, sobretudo na medicina veterinária (Oliveira, 2003). Além da biologia molecular existem outras técnicas sorológicas que são comumente utilizadas e recomendadas pelo ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, como, por exemplo, o teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), considerado teste padrão de triagem para o diagnóstico da brucelose ovina.

Devido a grande importância da ovinocultura no nordeste salientando-se o Estado do Piauí, objetivou-se através da pesquisa a utilização de ferramentas diagnósticas moleculares, PCR convencional para a deteção de DNA de *B. ovis* a partir de amostras de urina de ovinos oriundos de municípios da microrregião de Teresina/Piauí. Dessa forma, proporcionando um maior conhecimento da extensão da enfermidade para adoção de medidas de prevenção e controle da mesma na região.

### **Material e Métodos**

Realizou-se coleta de amostras de sangue e urina de 100 animais da espécie ovina com idade superior e igual a seis meses de ambos os sexos distribuídos em cinco municípios da microrregião de Teresina/PI. As amostras de sangue foram obtidas através da punção da veia jugular após antissepsia com álcool iodado a 2%; as amostras de urina foram coletadas através do bloqueio nasal por alguns segundos e por micção espontânea. Os tubos contendo as amostras foram mantidos em uma caixa isotérmica contendo gelo para o transporte.

As amostras de sangue após centrifugação foram submetidas à técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), e as amostras de urina foram submetidas ao processo de extração de DNA e posteriormente submetidas à técnica de PCR convencional utilizando o primer ORF AO512 (F: 5'TTCAGGCGACTGCTAATGGCAC-3' e R: 5'-AAACCGATACCTCATCCCCGAG3') de acordo com o descrito por Xavier et al.(2010). Os procedimentos foram realizados visando a busca de anticorpos anti - *Brucella ovis*, e o DNA bacteriano, respectivamente. A técnica de IDGA e PCR foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN) da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

O índice de concordância (Kappa) entre os exames PCR convencional e IDGA foi calculado utilizando o



programa Stata/SE 10.0 (CollegeStation, TX, USA).

### Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti – *Brucella ovis* através da técnica de imunodifusão em gel de agar (IDGA) foram: 17 (17%) animais reagentes e 83 (83%) animais não reagentes de um total de 100 animais estudados. Na técnica de PCR convencional para detecção de DNA de *Brucella ovis* a partir de amostras de urina, foi obtido como resultado: seis (6%) animais positivos e 94 (94%) animais negativos de um total de 100 animais pesquisados. Vale ressaltar que três animais foram igualmente positivos em ambos os testes. Contudo a concordância entre as técnicas de IDGA x PCR convencional foi considerada fraca (18,9%), baseando-se na classificação do coeficiente Kappa descrito por Landis e Koch (1977).

Neste estudo obteve-se na PCR convencional um total de seis animais positivos, correspondendo a um percentual de 6% de positividade, este dado discorda quanto ao resultado obtido por Costa et al. (2012) em seu experimento, pois realizaram uma pesquisa em 90 ovinos oriundos de propriedades do estado do Piauí. E submeteram amostras de urina a técnica de PCR e obtiveram dezoito (20%) amostras positivas à PCR, resultado superior ao encontrado nesta pesquisa.

Resultados semelhantes aos deste estudo foram observados por Costa et. al. (2012), quando submeteram amostras de soro de ovinos a técnica de IDGA, e identificaram dezesseis (17,8%) carneiros soropositivos. Sendo que neste estudo identificou-se dezessete (17%) ovinos soropositivos.

No estudo realizado por Costa et al. (2013) objetivaram realizar comparação entre as técnicas PCR gênero específica, espécie específica e nested PCR espécie específica em amostras de sêmen e urina de ovinos experimentalmente infectados, e obtiveram como resultado na nested PCR espécie específica em amostras de urina, utilizando mesmo par de primers externo usado nesta pesquisa, 49 (65,3%) amostras positivas de um total de 75, sendo que nesta pesquisa obteve-se apenas seis (6%) animais positivos de um total de 100 animais estudados.

### Conclusão

Vale ressaltar que as técnicas, PCR convencional e IDGA, avaliadas neste estudo são válidas e podem ser consideradas como uma boa ferramenta para o diagnóstico da infecção por *B. ovis*. Portanto, recomenda-se a utilização dos testes para um seguro e eficiente diagnóstico da brucelose ovina.

### Referências

- Costa LF, Nozaki CN, Lira NSC, Antunes JMAP, Xavier MN, Costa EA, Paixão TA, Santos RL, Megid J.** Species-specific nested PCR as a diagnostic tool for *Brucella ovis* infection in rams. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.65, p.55-60, 2013.
- Costa EA, Sant'Ana FM, Carvalho CJS, Moustacas VS, Silva SMMS, Paixão TA, Santos RL.** Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the state of Piauí. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.64, p.751-754, 2012.
- Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. v.33, p.159-174.
- Nozaki CN.** Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas diferentes fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*. 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- Oliveira CJR.** Aplicações teóricas da biologia molecular/engenharia genética em análises clínicas. Apostila (Disciplina Engenharia Genética) - Curso de Biomedicina, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Metodista, São Paulo, 2003, p.17-20.
- Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, Dick JR EJD, Snider CL, Cappelli D, Gene B, Hubbard GB.** A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. *Journal Med. Primatol*, v.38, p.70-73, 2009.
- Xavier MN, Silva TM, Costa EA, Paixão TA, Moustacas VS, Carvalho CA Jr, Sant'Anna FM, Robles CA, Gouveia AM, Lage AP, Tsohis RM, Santos RL.** Development and evaluation of a specie-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiology*, v.145, p.158-164.



## **Distribuição dos partos na presença e ausência de luz em ovelhas Dorper**

*Distribution of births in the presence and absence of light in Dorper sheep*

**Ingrid Vilmara Pereira de Sousa<sup>1,\*</sup>, Cássia Batista da Silva<sup>1</sup>, Naelson Railson de Sousa Gomes<sup>1</sup>,  
Gláucia Brandão Fagundes<sup>2</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>3</sup>, Mônica Arrivabene<sup>4</sup>, Willames Costa Neves<sup>5</sup>,  
Tânia Vasconcelos Cavalcante<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos pela Universidade Federal do Piauí – UFPI; <sup>2</sup>Mestranda em Zootecnia pela Universidade Federal do Piauí – UFPI; <sup>3</sup>Docente do Colégio Técnico de Teresina–CTT; <sup>4</sup>Docente do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária–DCCV; <sup>5</sup>Docente do Departamento de Morfofisiologia Veterinária– DMV,

\*E-mail: ingridvilmara19@outlook.com

### **Abstract**

*The aim of this study was to evaluate the distribution of births in the period of presence and absence of light in Dorper sheep. forty sheep were used separately in two locations from the College of Technical Teresina, Piauí belonging to the Federal University of Finance and Paradise Herd in Belo Jardim, Pernambuco. The animals were subjected to a breeding season; as well as the diagnosis of pregnancy. The analysis of the incidence of the type of parturition, according to the presence and absence of light were obtained from the follow-up observation and daily obstetric care until the time of delivery for later compared by chi-square test ( $P < 0, 05$ ). It was found that there was a higher incidence of parturições during the light period when compared with the periods without light. The conclusion of this research that the presence of light appears to influence the time of delivery of Dorper sheep.*

**Keywords:** sheep, parturition, light.

**Palavras-chave:** ovelhas, parturição, luz.

### **Introdução**

O conhecimento das parturições de ovelhas Dorper, de acordo com a presença e ausência de luz, poderia otimizar a eficiência da produção. Desta forma, é indispensável um planejamento no manejo reprodutivo adequado, de acordo com a fase das matrizes e das modificações ocorridas do feto no período que antecede a parição. Segundo Hafez, (1995) o feto determina o dia do parto, enquanto a mãe decide a hora do mesmo. Assim, a adoção pelo conhecimento da ocorrência dos diferentes momentos do parto, visando identificar o momento de maior incidência de partos de acordo com a presença e ausência de luz tem por fim, a conscientização de tratadores e criadores para melhoria da assistência à ovelha e a cordeiros de interesse ao mercado pecuário. Assim, objetivou-se observar e identificar o momento do parto, bem como a distribuição das parturições, de acordo com a presença e ausência de luz em ovelhas Dorper.

### **Material e Métodos**

Foram utilizadas ovelhas de duas localidades no Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina, Piauí (n=25) e na Fazenda Rebanho Paraíso no município de Belo Jardim, Pernambuco (n=15). Todas as fêmeas foram submetidas a uma estação de monta; bem como ao diagnóstico de gestação através do ultrassom, via retal para confirmação de prenhez entre 44 e 60 dias após a última data de cobertura. As ovelhas prenhes tiveram o acompanhamento de observação diário até o momento do parto. As análises da incidência do tipo do momento do parto, de acordo com a presença e ausência de luz foram obtidos a partir do acompanhamento de observação e assistência obstétrica diária até o momento do parto. Os dados obtidos em ambos os casos, presença e ausência de luz, foram submetidos, separadamente, ao teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro, para a comparação entre médias pelo programa computacional SAS (Statistical Analysis System) para análise de variância.

### **Resultados e Discussão**

A Tabela 1 revela uma elevada taxa no momento das partições tanto de crias fêmeas como de machos quando expostos à luz. De outro lado, as taxas no momento das partições, tanto de fêmeas quanto de machos, submetidos à ausência de luz foram praticamente bem menores. Aplicando-se a análise de variância a estes dados, (Tab.1) obtém-se uma diferença altamente significativa para os fatores de presença e ausência de luz, ou seja, a luz atua significativamente no momento do parto de ovelhas Dorper. Os resultados deste trabalho, semelhante aos reportados por George (1969) e de Lindahl, que ao realizarem um estudo com ovelhas Dorset e Merino observaram pico de nascimentos de cordeiros ocorrerem entre 9 e 12 horas da manhã de ovelhas das raças Hampshire, Shropshire, South-down, Merino, Targhee e Dorset. Observa-se que raças citadas acima são todas produtoras de lã enquanto que deste estudo são de corte. Romano e Piaggio (1999) reportaram em seus estudos que a maioria dos partos em cabras Nubianas acontece durante o dia (matutino:vespertino), bem como



nos estudos verificados por Aleksiev (2008). Embora as condições climáticas do referido estudo não tenham ocorridos nas mesmas condições de ambos os estudos referenciados, é importante ressaltar as evidências crescentes da interligação entre a ritmicidade circadiana e reprodução (Boden e Kennaway, 2006) bem como, é importante salientar que o sistema circadiano fetal pode desempenhar um papel na determinação no momento do parto nos períodos de presença e ausência de luz. Prestes e Landim-Alvarenga, (2006) ressaltaram que no final do período gestacional o feto sofre uma série de mudanças metabólicas estimuladas pelas modificações hormonais que preparam para o parto, o que resulta em um preparo para a vida livre.

Tabela 1. Valores médios de porcentagem dos tipos de sexo (macho:fêmea) de cordeiros ao nascer, sob condições de presença e ausência de luminosidade. Teresina – PI e Belo Jardim – PE, 2016.

	Presença de Luz	Ausência de Luz	Total
Nascimentos	27 (72,96%)	10 (27,02%)	37 (99,98%)
Fêmeas	15	7	22
Machos	12	3	15

Houve diferença entre tratamentos ( $P < 0,05$ ) pelo teste qui-quadrado.

### Conclusão

A presença de luz parece influenciar no momento do parto de cordeiros.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Dona Odete e Sr. Pedro, bem como o Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina pela concessão dos animais e pela contribuição para a realização do trabalho.

### Referências

- Aleksiev Y.** Diurnal distribution of the time of parturition in the Danube fine wool breed of sheep. *Bulgarian J Agric Sci*, v.13, p.723, 2007.
- Hafez ESE.** Reprodução Animal. São Paulo, Manole, 6e. 1995. p.235-284. Início do Parto.
- Prestes NC, Landim-Alvarenga FC.** Obstetrícia Veterinária. Rio de Janeiro - Br: Guanabara Koogan, 241p, 2006.
- Romano JE, Piaggio J.** Time of parturition in Nubian goats. *Small Ruminant Research*, v.33, p. 285-288, 1999.



## **Efeito da adição de angiotensina-(1-7) na taxa de estradiol de cabras submetidas a protocolo de sincronização do estro e ovulação**

*Effect of angiotensin (1-7) on estradiol rate of goats undergoing synchronization protocol of estrus and ovulation*

**Andréia da Silva Costa\*, Hiran Esmeraldo Albuquerque Beserra, Amilton Paulo Raposo Costa, Antônio de Sousa Júnior, Joilson Ferreira Batista**

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: andrea\_vet@hotmail.com

### **Abstract**

*This study evaluated the effect of angiotensin- (1-7) on the estradiol levels of goats submitted to a protocol of synchronization of estrus and ovulation when applied close to the ovulatory period. The animals were divided into two experimental groups: Control (n = 10) and Angiotensin- (1-7) (n = 10). All animals were submitted to estrus synchronization protocol and on days 12 and 13 the animals received the treatments according to the experimental groups and blood samples from the external jugular vein were collected every 12 hours for estradiol dosing (E2) by the Elisa test. The results were submitted to analysis of variance followed by the Dunnett's test (P <0.05). No increase in serum estradiol concentration was observed in any of the treatments. It was concluded that the application of angiotensin- (1-7) during the preovulatory period, with only two applications, was not sufficient to significantly increase estradiol levels.*

**Keywords:** hormone, ovary, small ruminants.

**Palavras-chave:** hormônio, ovário, pequenos ruminantes.

### **Introdução**

Pesquisas apontam que a Angiotensina-(1-7) [(Ang-(1-7)] – um peptídeo do Sistema Renina Angiotensina-(SRA) - está presente em ovários de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro e que a Ang-(1-7) adicionada ao meio de perfusão de ovários de rata *in vitro* (1µM) aumentou a produção de estradiol e progesterona (Costa et al., 2003). Outro estudo demonstra ainda aumento da produção de estradiol e progesterona em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* com Ang-(1-7) bem como o aumento da taxa de ovulação (Viana et al., 2011). Pereira et al. (2015) encontrou imunorreatividade para angiotensina-(1-7) em folículos antrais, nas células da teca e no estroma de ovários de ovelhas.

Costa et al. (2014) observou um aumento na produção de estradiol próximo à ovulação em ovelhas submetidas à protocolo de sincronização de estro quando da aplicação de maleato de enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) nos três últimos dias de um protocolo de sincronização de estro. Isto pode ser favorável aos animais que receberam enalapril já que o estradiol aumenta a frequência dos pulsos e, consequentemente, o pico de LH seguido de ovulação (Moraes et al., 2002). Este aumento ocorreu durante o período pré-ovulatório e isto pode representar o pico de estradiol (Saifullizam et al., 2010) que induz o pico pré-ovulatório de LH. O mecanismo desta resposta pode ser devido ao aumento de angiotensina-(1-7) que ocorre como consequência da inibição da ECA (Brosnihan et al., 2004). O objetivo deste estudo foi avaliar efeito da adição de angiotensina-(1-7) nos níveis de estradiol de cabras submetidas a um protocolo de sincronização do estro e ovulação quando da sua aplicação próximo ao período ovulatório.

### **Material e Métodos**

Antes de iniciar a sincronização do estro e da ovulação um pré-experimento foi realizado a fim de obter uma dose capaz de provocar efeitos cardiovasculares em caprinos os quais seriam a evidência de sua absorção e atividade. A dose encontrada foi de 20µg/kg a qual foi usada posteriormente no protocolo experimental. A angiotensina-(1-7) era de apresentação em pó e acrescidas de ciclodextrinas que são carboidratos complexos utilizados em produtos farmacêuticos apenas para dar solubilidade ao produto.

O experimento foi realizado em uma propriedade da Sub-Região Meio Norte do Brasil onde foram utilizadas 20 cabras, clinicamente sadias, aptas à reprodução e apresentando escore corporal, variando de 3 a 4, considerado bom de acordo com a escala utilizada por Ribeiro (1998). Durante o experimento foi mantido o manejo habitual das propriedades: sistema semi-intensivo, com acesso a pastagem nativa e cultivada em regime de pastejo contínuo, suplementação com ração 18% PB, à base de 1% do peso vivo, fornecimento de sal mineral e água à vontade. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, de modo que no final obteve-se: Grupo Controle (n=10) e Grupo Angiotensina-(1-7) (n=10).

Todos os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização do estro e ovulação, que constou da aplicação de esponjas vaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona durante 11 dias (D0-D11). No 9º dia foram aplicados, via intramuscular, 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e 125 µg

de cloprostenol. No dia 11 foram removidas as esponjas e nos dias 12 e 13 (24 e 48h após a retirada das esponjas, respectivamente) os animais receberam os tratamentos de acordo com os grupos experimentais: o grupo controle recebeu 30 µg/kg de ciclodextrina em 2 ml de água destilada por animal, via subcutânea, e o grupo angiotensina recebeu solução de Angiotensina-(1-7) + ciclodextrina diluída em água destilada na concentração de 20µg/kg. Amostras de sangue da veia jugular externa foram então coletadas nos dias D12 e D13 a cada 12 horas (antes e após aplicação de Angiotensina-(1-7) ou ciclodextrina) para pesquisa de estradiol (E2) utilizando sistema de coleta a vácuo com tubos heparinizados (Vacutainer®), conector e agulhas estéreis. O sangue foi centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos para obtenção do plasma, que foi congelado a -20°C até a realização das dosagens. Posteriormente as dosagens foram realizadas pelo teste de Elisa, no setor especializado do Laboratório de Sanidade Animal-LASAN/CCA/UFPI, utilizando kits comerciais próprios. Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Dunnett's com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

Não foi observado aumento na concentração sérica de estradiol em nenhum dos tratamentos (Fig. 1), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P < 0.05$ ). No entanto, embora não havendo diferença estatisticamente significativa, o grupo tratado com angiotensina-(1-7) teve um leve aumento na quantidade de estradiol em D12 após 12 horas da aplicação do peptídeo enquanto no grupo controle houve uma queda deste percentual no mesmo período. Assim, observou-se tendência a um aumento dos níveis de estradiol quando se utilizou angiotensina-(1-7) como adjuvante em protocolo de sincronização do estro e ovulação em cabras. É possível que a aplicação de angiotensina-(1-7) possa exercer uma influência benéfica em protocolos de sincronização de estro e ovulação como uma possível via de acesso para uma melhoria na taxa de ovulação de animais que receberem ang-(1-7) em protocolos de sincronização do estro e ovulação durante o período pré-ovulatório uma vez que o estradiol aumenta a frequência dos impulsos e conseqüentemente o pico de LH seguido de ovulação (Moraes et al., 2002). O mecanismo do efeito Ang- (1-7) sobre a produção de estradiol é desconhecido, no entanto, recentemente, tem sido demonstrado que este peptídeo ativa a proteína PI3K/Akt, através do receptor Mas em diferentes tipos de células (Giani et al 2007; Sampaio et al 2007.). Portanto, a ang-(1-7) pode desempenhar um papel na produção de estradiol através da via PI3K/Akt, uma vez que de acordo com McDonald et al. (2006), uma ativação da PI3K/Akt é necessária para as ações estimuladoras de FSH sobre a expressão da aromatase e secreção de estradiol.

Desta forma, mais estudos com relação à quantidade de dias e número de vezes por dia de aplicação do referido peptídeo tornam-se necessários.

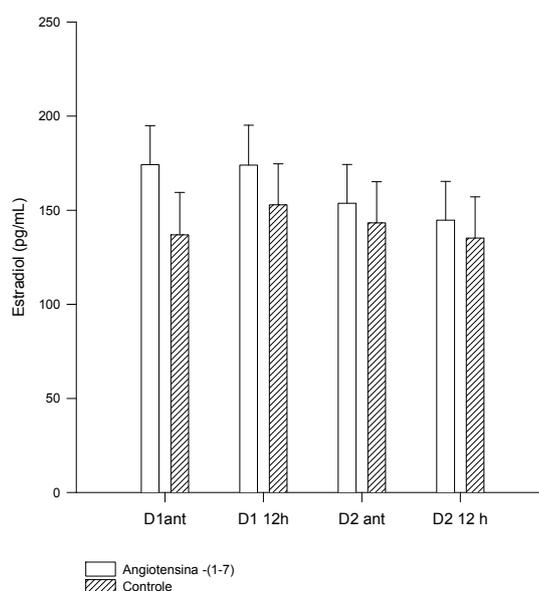


Figura 1. Níveis de estradiol em cabras submetidas a tratamento com ou sem angiotensina-(1-7) nos dias 12 e 13 do protocolo de IATF. Não houve diferença significativa em ambos os grupos ( $P < 0.05$ ).

### Conclusão

Conclui-se que a aplicação de angiotensina-(1-7) durante o período pré-ovulatório, com apenas duas aplicações, não foram suficientes para aumentar os níveis de estradiol de maneira significativa.



### Referências

- Brosnihan KB, Neves LAA, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC.** Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol Res*, v.37, p.1255-1262, 2004.
- Costa AP, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RA, dos Reis AM.** Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.
- Costa AS, Junior AS, Viana GEN, Muratori MCS, Costa APR.** Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases oestradiol production in ewes submitted to oestrous synchronization protocol. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.53-55, 2014.
- Giani JF, Gironacci MM, Muñoz MC, Peña C, Turyn D, Dominici FP.** Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.293, p.1154-1163, 2007.
- Mcdonald CA, Millena AC, Reddy S, Finlay S, Vizcarra J, Khan SA, Davis JS.** Follicle-stimulating hormone-induced aromatase in immature rat Sertoli Cells requires an active Phosphatidylinositol 3-Kinase pathway and is inhibited via the Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway. *Mol Endocrinol*, v.20, p.608-618, 2006.
- Moraes JCF, Souza CJH, Gonçalves PBD.** Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos, In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, ed. Varela, p.25-55, 2002.
- Pereira AM, Souza Junior A, Machado FB, GonçalvesGK, Feitosa LCS, Reis AM, Santos Santos RAS, Honorato-Sampaio K, Costa AR.** The effect of angiotensin- converting enzyme inhibition throughout a superovulation protocol in ewes. *Res Vet Sci*, v.103, p.205-210, 2015.
- Ribeiro SDA.** *Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos*. Ed Nobel, São Paulo, p. 124-128, 1998.
- Saifullizam AK, Routly JE, Smith RF, Dobson H.** Effect of insulin on the relationship of estrous behaviors to estradiol and LH surges in intact ewes. *Physiology & Behavior*, v.99, p.555-561, 2010.
- Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM.** Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, v.49, p.185-192, 2007.
- Viana GEN, Pereira VM, Honorato-Sampaio K, Oliveira CA, Santos RAS, Reis AM.** Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. *Experimental Physiology*, v.96, p.957-965, 2011.



## **Efeito da estimulação hormonal ovariana e polivinilpirrolidona sobre a maturação *in vitro* de oócitos de cabras Anglo Nubiana**

*Effect of hormonal ovarian stimulation and polyvinylpyrrolidone on in vitro maturation of oocytes of Anglo Nubian goats*

**George Antonio Maciel Mudo\***, Ana Arlete de Amorim Silva, Laisa Gomes Medeiros Ribeiro, Maria Naiara Pereira da Silva, Maria Lilian Gomes Loiola, Raphael Amorim de Oliveira, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior

Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil.

\*E-mail: george.mudo@gmail.com

### **Abstract**

To evaluate the effect of hormonal stimulation treatments with PVP on the production and maturation of COCs, 27 goats received intravaginal devices (CIDR) for 10 days and 125 µg cloprostenol on day 8 of treatment. The goats were distributed in the following groups: FSH-eCG, 300 IU of eCG and 70 mg pFSH, 36 h prior to the withdrawal of CIDR; FSH, receiving 180 mg (40/40; 35/35, 30 mg) at 12 h intervals; FSH-PVP10 and FSH-PVP40 receiving 70 mg FSH dissolved in PVP 10,000 MW (24 hours before CIDR) and PVP MW 40,000 (48 hours before CIDR), respectively. After follicular aspiration, COCs of grade I and II were submitted to IVM. Recovery rate from the FSH-PVP10 was higher (73.33%) than FSH-PVP40 (44.26%) and FSH-eCG (27.14%). COCs with grades I and II, were more frequently observed ( $P < 0.05$ ) in FSH-PVP40 than FSH-eCG. FSH-PVP40 is an alternative to recovery and mature oocytes *in vitro*.

**Keywords:** FSH, goat, PVP.

**Palavras-chave:** caprino, FSH, PVP.

### **Introdução**

A competência e a aquisição do oócito em retomar a meiose espontaneamente fora do folículo são adquiridas quando este é oriundo de folículo diâmetro superior a dois milímetros. A estimulação ovariana tem sido utilizada em cabras para induzir o crescimento de vários folículos, resultando em um maior número de oócitos (Baldassarre et al., 2003). Estudos realizados em vacas e em ovelhas demonstraram que a superestimulação pode ser induzida por uma única injeção de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona (PVP). Porém, pouco se sabe sobre os fatores que podem afetar a capacidade do PVP em agir como um veículo para o FSH em protocolos de superestimulação em cabras (Alessandro et al., 2001). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos de estimulação hormonal com gonadotrofinas dissolvidas em polivinilpirrolidona sobre a produção e a taxa de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de cabras Anglo Nubiana.

### **Material e Métodos**

Foram utilizadas 27 cabras da raça Anglo Nubiana, as quais receberam dispositivos intravaginais contendo 330 mg de progesterona (CIDR), por 10 dias e, no dia 8 do tratamento, receberam 125 µg de cloprostenol. As cabras foram distribuídas em quatro grupos: Grupo FSH (n = 6), 180 mg de pFSH (40/40; 35/35; 30 mg), aplicadas a cada 12 h e iniciada 72 horas antes da retirada do CIDR; Grupo FSH-eCG (n = 7), que consistiu no uso de 80 mg de pFSH, combinado com 300 UI de eCG, 36 horas antes da retirada do dispositivo; Grupo FSH-PVP10 (n = 7), que consistiu no uso de 70 mg pFSH dissolvidos em PVP 10.000 PM a 30%, 24 horas antes da retirada do CIDR; e o Grupo FSH-PVP40 (n = 7), 70 mg de pFSH dissolvidos em PVP 40.000 PM, a 30%, 48 horas antes da retirada do CIDR. Após a retirada do CIDR, a avaliação dos ovários foi realizada por laparotomia. Os folículos  $\geq 2$  mm foram puncionados e aspirados com uma bomba de vácuo a uma pressão de 8 mL/min, com um cateter 18G, em meio TCM 199, suplementado com NaHCO<sub>3</sub> (2,2 g/mL), heparina (20 UI/mL), gentamicina (50 mg/mL), piruvato de sódio (0,2 mM) e SFB (10%). Apenas os oócitos de Graus I e II foram selecionados e incubados em placas de quatro poços com meio MIV, contendo EGF (10 ng/mL), FSH/LH (20 mg/mL), estradiol (1 mg/mL), cisteamina (100 mM) e SOE (10%), sob óleo mineral. As placas foram incubadas a 38,5°C em estufa com atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (e.p.). Para comparação dos parâmetros, foi utilizada a Análise de Variância one-way e o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **Resultados e Discussão**

A taxa de recuperação do grupo FSH-PVP10 foi maior (73,33%) do que o grupo FSH-PVP40 (44,26%) e do grupo FSH-eCG (27,14%). Os nossos resultados são inferiores aos obtidos por Baldassarre et al. (2003), que relataram taxas acima de 80%. Uma justificativa, está relacionada às oscilações de pressão no sistema de aspiração da bomba à vácuo, o que levou a prejuízos no ato da punção dos folículos, reduzindo a taxa de



recuperação subsequente. Já em relação ao grau de qualidade do oócitos, os CCOs de graus I e II foram mais frequentemente observados ( $P < 0,05$ ) no grupo FSH-PVP 40 quando comparado com o grupo FSH-eCG. No presente estudo, o regime de uma única dose (FSH-eCG) não foi tão eficaz em estimular o seu crescimento em folículos de tamanho médio ou grandes. Em vacas Angus estimuladas, a administração de três doses de 40, 80 e 80 mg de FSH, 24 h antes da aspiração, aumentou, significativamente, a resposta folicular e a taxa de recuperação de oócitos em comparação com o tratamento de dose única (Chaubal et al., 2007). Com isso, sugerimos que o tratamento com FSH-eCG resultou em uma superestimulação inadequada, gerando uma baixa taxa de recuperação, reduzindo o número de oócitos até o momento da colheita. Após a MIV, não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) para a taxa de maturação nos diferentes grupos tratamento, onde foram respectivamente de 42,86% (FSH-eCG), 27,50% (FSH), 29,41% (FSH-PVP10) e 40% (FSH-PVP40).

### **Conclusão**

Os tratamentos de estimulação com FSH dissolvidos em PVP foram eficazes na recuperação, qualidade e maturação *in vitro* de oócitos em cabras Anglo Nubiana.

### **Referências**

- Alessandro AGD, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellittib A.** Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.255-264, 2001.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN.** Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, 59, p. 831-839, 2003.
- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PEJ, Ezamand P, Yang X.** Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, v.67, p.719-728, 2007.



## **Efeito da Insulina-N sobre a Integridade das Membranas Plasmáticas em Sêmen Fresco de Ovino, utilizado Gema de Ovo de Codorna**

*Insulin- N Effects on Plasma Membranes Integrity in Ovine Fresh Semen, using Quail Egg of Yolk*

**Wayllba Assunção Barcelos<sup>1,\*</sup>, Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>2</sup>, Talyta Luiza Miranda Lima<sup>1</sup>, Giovanni Santos de Abreu Junior<sup>1</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão – UEMA; <sup>2</sup>Universidade de São Paulo – USP; <sup>3</sup> Universidade do Acre- UFAC, Rio Branco, AC, Brasil.

\*E-mail: wayllba95@gmail.com

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate the effect of insulin on the membrane integrity evaluated by the eosin test and nigrosine in ovine semen. Seven sheep were used, harvest were made with the aid of electroejaculator. The yolk-citrate extender was used for dilution of the ejaculate (25x10<sup>6</sup> sperm / mL) using quail's egg yolk. Each ejaculate was divided into four equal fractions, corresponding to treatments: control group (G<sub>com</sub>) using only dilutive citrat gem; Group 50 (G<sub>50</sub>) plus dilutive 50UI/ml insulin type N; Group 100 (G<sub>100</sub>) plus dilutive 100 IU/ML Insulin type N; Group 200 (G<sub>200</sub>) plus dilutive 200 IU/ML Insulin type N. After dilution, the semen remained in water - bath at 45°C to perform the eosin test and nigrosine for evaluation by time (0, 20, 40 and 60 minutes) for membrane integrity. Thus, the use of insulin does not preserve the integrity of the membranes during the incubation period of 45C, with a gradual decrease due to stress caused by time and temperature at which the semen was subjected.*

**Keywords:** ovine, semen, Insulin-N.

**Palavras-chave:** ovino, sêmen, Insulina-N.

### **Introdução**

A Insulina é uma proteína formada por duas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ), com 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, interligadas por duas pontes dissulfeto, produzido pelas células  $\beta$  do pâncreas, atuante na captação de aminoácidos e glicose, promove a síntese das proteínas e lipídios exercendo também funções intracelulares e a nível de membranas plasmáticas (Abdelmonein et al., 1998). Esse hormônio promove a diferenciação das espermatogônias em espermátocito primário por meio da ligação dos receptores de IGF-I (Nakayama et al. 1999).

Nos espermatozoides a insulina fornece energia, sendo esta liberada no ejaculado, com produção do NADPH, influenciando a capacidade fecundante e a motilidade espermática (Andò e Aquila, 2005).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da insulina sobre a integridade das membranas avaliadas pelo teste de eosina e nigrosina em sêmen de ovino diluídos com Citrato gema, utilizando gema de ovo de codorna.

### **Material e Métodos**

Sete ovinos sem raça definida, com média de 3 anos foram utilizados. As colheitas foram feitas com auxílio do Electroejaculador, avaliando posteriormente o sêmen quanto as suas características de motilidade espermática progressiva, vigor e turbilhonamento segundo o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

O diluidor Tris- Gema foi usado para diluição dos ejaculados (25x10<sup>6</sup> sptz/mL), utilizando gema de ovo de codorna. Cada ejaculado foi dividido em quatro frações iguais, correspondente aos tratamentos: Grupo Controle (G<sub>com</sub>) utilizando somente diluidor Tris- Gema; Grupo 50 (G<sub>50</sub>) diluidor acrescido de 50UI/mL de Insulina tipo N; Grupo 100 (G<sub>100</sub>) diluidor acrescido de 100 UI/ML Insulina tipo N; Grupo 200 (G<sub>200</sub>) diluidor acrescido de 200 UI/ML Insulina tipo N.

Após a diluição, o sêmen foi submetido ao intenso estresse para avaliar o efeito da insulina, permanecendo em banho – maria a 45°C para realização do teste de eosina e nigrosina durante o intervalo de tempo (0,20,40 e 60 minutos). Para realização do teste, 10  $\mu$ L de sêmen foram alíquotados sobre lâmina e lamínula e 10  $\mu$ L do corante eosina e nigrosina foram depositados sobre o sêmen e homogeneizado para posterior esfregaço. Após 10 minutos de secagem da lâmina, foi realizada a leitura em microscópio com aumento de 100x sobre óleo de imersão.

### **Resultados e Discussão**

Os animais apresentaram médias para circunferência escrotal de 29,07  $\pm$  2,9. As médias de largura direita e esquerda foram de 5,7  $\pm$  0,72 e 5,8  $\pm$  0,83 cm respectivamente e para comprimento escrotal direito e esquerdo foram de 8,07  $\pm$  1,22 e 7,9  $\pm$  0,59 cm motilidade progressiva média de 86  $\pm$  8,00 e vigor 3  $\pm$  0,00.



Os resultados da integridade de membranas avaliados pelo teste estão apresentados na tabela 1. De acordo com os dados obtidos, o uso da insulina não influenciou na integridade das membranas durante o período de armazenamento dentre os tempos avaliados, corroborando com os achados de Fagundes et al, 2010.

Mesmo não tendo influenciado na integridade da membrana, propõe que a adição de insulina pode ser utilizada para atuação no metabolismo espermático e na manutenção da qualidade da amostra seminal. Contudo, é crucial desenvolver maiores estudos para determinar em qual mecanismo metabólico a insulina atua no espermatozoide e qual sua correlação com a fertilidade.

Tabela 1. Integridade de membranas em sêmen fresco de ovinos nos diferentes tempos.

Tratamento	Integridade de Membranas			
	T0`	T20`	T40`	T60`
Controle	81,57 ± 16,78	81,14 ± 9,37	80 ± 11,33	78 ± 10,66
50 UI	82,85 ± 6,96	89,28 ± 5,52	82 ± 10,58	80,28 ± 7,01
100 UI	83,00 ± 13,82	80,85 ± 11,85	79,71 ± 10,17	73,42 ± 11,64
200 UI	84,14 ± 9,78	80,57 ± 10,35	73,57 ± 10,92	71,28 ± 6,52

Avaliação em coluna, Teste T, letras distintas diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

### Consideração final

A utilização de Insulina não preserva a integridade das membranas durante o período de incubação de 45°C, havendo uma diminuição gradativa devido ao estresse ocasionada pelo tempo e temperatura no qual o sêmen foi submetido.

### Referências

- Abdelmonein IY, Beth R, Saba K.** The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *J Androl*, v.19, p.207, 1998.
- Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, Andò.** Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol e Metab*, v.90, p.4753-4761, 2005b.
- Fagundes BT, Maurício FV, Silva JFS, Shimoya A, Barreto MAP, Ferreira VM.** Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.273-278.
- Nakayama Y, Yamamoto T, And Abe SI.** "IGF-I, IGF-II and Insulin Promote Differentiation of Spermatogonia to Primary Spermatoocytes in Organ Culture of Newt Testes". *Int J Dev Biol*, v.43, p.343-347, 1999.



## **Efeito da Insulina-N sobre a Motilidade Espermática em Sêmen Fresco de Ovíno durante 60 minutos de armazenamento utilizado Gema de Ovo de Codorna**

*Insulin- N Effects on Sperm Motility in Ovine Fresh Semen over 60 minutes using Quail Egg of Yolk*

**Talyta Luiza Miranda Lima<sup>1,\*</sup>, Samara Cristine Costa Pinto<sup>2</sup>, Wayllba Assunção Barcelos<sup>1</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão – UEMA; <sup>2</sup>Universidade de São Paulo – USP; <sup>3</sup>Universidade do Acre- UFAC, Rio Branco, AC, Brasil.

\*E-mail: talyta.50@hotmail.com

### **Abstract**

*The objective of this study was to evaluate the effect of n-type insulin on sheep semen on the time and temperature motility after 60 minutes of incubation at 45°C. To therefore 7 sheep were used, the collects were made with the aid of the Electro ejaculator. The citrate-yolk diluent was used to dilute the ejaculates (25x10<sup>6</sup> spz/ ml) using quail egg yolk. Each ejaculate was divided into four equal fractions, corresponding to the treatments: control group (G<sub>cont</sub>), using only tris-gem; Group 50 (G<sub>500</sub>) Diluent plus 50 IU / ml N-type Insulin; Group 100 (G<sub>100</sub>) diluent plus 100 IU / ml Insulin type N; Group 200 (G<sub>200</sub>) diluent plus 200 UI / ml N-type Insulin. After dilution, the semen remained in a water bath at 45°C for the fast thermoresistance test on the time evaluation (0, 20, 40, 60 Minutes), for sperm motility and vigor. The data, were submitted to the t test, and those that did not present parameters with normal distribution were compared by the Friedman test. According to the obtained data, the insulin in the concentrations used experimentally, it was not possible to verify positive effect of the supplementation of the same, and high concentrations decrease the sperm viability.*

**Keywords:** ovine, semen, Insulin-N.

**Palavras-chave:** ovino, sêmen, Insulina-N.

### **Introdução**

A insulina hormônio anabólico que promove a captação de glicose e aminoácidos, a síntese de proteínas e lipídeos e o aumento das funções intracelulares e da membrana plasmática (Abdelmonein et al., 1998).

Os espermatozoides são capazes de secretar insulina, nas células não capacitadas, o hormônio localiza-se a nível subacrossomal na peça intermediária e no flagelo. Quanto a função da insulina, liberada pelos espermatozoides, ainda hoje, não está totalmente elucidada, acredita-se que esta, tenha efeito autócrino no metabolismo da glicose e também possa estar envolvida nos eventos da capacitação espermática, pois para iniciar os processos catabólicos e manter a motilidade espermática, o balanço iônico e várias funções celulares necessitam da glicólise.

Os espermatozoides metabolizam facilmente monossacarídeos, mas não metabolizam outros açúcares ou carboidratos complexos, sendo a presença de insulina essencial para a movimentação da glicose através da membrana plasmática, induzindo o aumento do número de proteínas transportadoras específicas (Davies, 1999; Cunningham, 1997; Aquila et al., 2005).

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da insulina do tipo N em sêmen de ovinos sobre motilidade quanto ao tempo e temperatura após 60 minutos de incubação a 45°C.

### **Material e Métodos**

Sete ovinos sem raça definida, com média de 3 anos foram utilizados. As colheitas foram feitas com auxílio do Eletroejaculador, avaliando posteriormente o sêmen quanto as suas características de motilidade espermática progressiva, vigor e turbilhonamento segundo o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

O diluidor Citrato-Gema foi usado para diluição dos ejaculados (25x10<sup>6</sup> spz/mL), utilizando gema de ovo de codorna. Cada ejaculado foi dividido em quatro frações iguais, correspondente aos tratamentos: Grupo Controle (G<sub>cont</sub>) utilizando somente diluidor Tris- Gema; Grupo 50 (G<sub>500</sub>) diluidor acrescido de 50UI/mL de Insulina tipo N; Grupo 100 (G<sub>100</sub>) diluidor acrescido de 100 UI/MI Insulina tipo N; Grupo 200 (G<sub>200</sub>) diluidor acrescido de 200 UI/MI Insulina tipo N.

Após a diluição, o sêmen permaneceu em banho – maria a 45°C para realização do teste de termorresistência rápido para avaliação por tempo (0, 20, 40 e 60 minutos) para motilidade e vigor espermático, com objetivo de determinar a resistência dos espermatozoides às condições impostas.

As avaliações de motilidade espermática no momento da coleta, vigor espermático foram apresentadas de forma descritiva, utilizando à média e o desvio padrão de cada resposta. As variáveis paramétricas testadas por ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey. Todas as variáveis passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors. As variáveis que tinham respostas subjetivas ou não entraram na



normalidade após transformação foram analisadas como não paramétricas, comparando-se os ranqueamentos pelo teste de Friedman.

### Resultados e Discussão

Os animais avaliados apresentaram circunferência escrotal de  $29,07 \pm 2,95$  cm, com de largura  $5,95 \pm 0,94$  cm (testículo direito) e  $5,85 \pm 0,83$  cm (testículo esquerdo) e motilidade progressiva média de  $86 \pm 8,00$  e vigor  $3 \pm 0,00$ .

Os resultados para motilidade progressiva quanto ao tempo estão apresentados na tabela 1. De acordo com os dados obtidos a insulina nas concentrações utilizadas não melhorou os parâmetros da motilidade progressiva avaliadas durante os tempos, dados que corroboram com TILBURG et al, 2008 em sêmen de ovinos utilizando Insulina. Observou que elevadas concentrações de Insulina, 200 UI/mL, foi deletéria aos espermatozoides quando comparados com os demais grupos. Onde os melhores resultados quanto a preservação da motilidade foi garantida com uso de 50 UI/mL.

Tabela 1. Médias e Desvios padrões do efeito do tratamento das Motilidades Espermáticas do Sêmen fresco de ovinos de acordo com os tratamento e tempos.

Tratamento	Motilidade Espermática			
	T0`	T20`	T40`	T60`
Controle	$85,71 \pm 7,86$	$83,25 \pm 10,36^a$	$61,42 \pm 10,69^a$	$37,14 \pm 22,88^{ab}$
50 UI	$88,57 \pm 3,77$	$88,12 \pm 3,72^a$	$54,28 \pm 7,86^a$	$35,71 \pm 7,86^a$
100 UI	$82,85 \pm 9,51$	$78,37 \pm 9,91^a$	$40,00 \pm 11,54^b$	$22,85 \pm 16,03^{ab}$
200 UI	$80 \pm 10,00$	$70,0 \pm 16,90^b$	$40,00 \pm 10,00^b$	$12,85 \pm 12,53^b$

Avaliação em coluna, Teste Friedman, letras distintas diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

### Consideração final

Dessa forma, o uso de Insulina nas concentrações utilizadas experimentalmente, não foi possível verificar efeito positivo da suplementação do mesmo, e concentrações elevadas prejudicam na viabilidade espermática.

### Referências

- Abdelmonein IY, Beth R, Saba K, Kenneth GG.** The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.19, p.207-221, 1998.
- Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, Andò.** Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, v.90, p.4753-4761, 2005b.
- Cunningham DVM.** Tratado de fisiologia veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- Davies Morel MCG. Equine artificial insemination. Cabi publishing, Walling Ford, Oxon, U.K., 1999.
- van Tilburg MF, Silva JFS, Dias AJB, Quirino CR, Fagundes B.** Influência da insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. *Ciênc Anim Bras*, v.9, n.3, p.731-739, 2008.



## Efeito da melatonina na maturação *in vitro* de oócitos caprinos

*Effect of melatonin on in vitro maturation of goat oocytes*

**Bruna Dias Mangueira Bastos\***, Ana Arlete de Amorim Silva, Maria Naiara Pereira da Silva, Matheus de Jesus Sá Silva, **Joedson Dantas Gonçalves**, Luana Barbosa Freire de Figueiredo, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Lopes Júnior

Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil.

\*E-mail: brunamangueira@hotmail.com

### Abstract

To evaluate the effect of melatonin on *in vitro* maturation of goat oocytes, 12 females were used as oocyte donor. They were subjected to ovarian stimulation and ovum pickup by laparotomy. Oocytes were evaluated and allocated into three groups of *in vitro* maturation: M0 (oocytes matured in TCM199 and supplements); M10 and M50 (oocytes matured in M0 medium supplemented with 10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M melatonin, respectively). All groups were subjected to the cell incubator for 24 hours at 38.5°C with a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. For data analysis, Chi-square test was used, with a probability of 5% and a correlation test. In conclusion, melatonin reduced *in vitro* maturation rates of goat oocytes.

**Keywords:** caprine, IVP, supplement.

**Palavras-chave:** caprino, PIV, suplemento.

### Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma das biotécnicas da reprodução que permite a conservação de recursos biológicos, para a reprodução de espécies ameaçadas de extinção ou de fêmeas geneticamente superiores incapazes de se reproduzirem de maneira natural, produzindo embriões de qualidade para posterior transferência ou criopreservação. A PIV é composta pelas etapas de maturação (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos, além do cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. É conhecida a influência negativa da elevada produção de radicais livres e, principalmente na fase de maturação do oócito, em virtude da aceleração do metabolismo celular. De modo especial, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pode atuar como um potente sequestrador de radicais livres, uma vez que estudos demonstraram que, ao se adicionar melatonina ao meio MIV, são observadas excelentes taxas de maturação oocitária (Hardeland, 2005). Entretanto, na literatura, não há relatos sobre o efeito da inclusão de melatonina na MIV de oócitos caprinos como antioxidante. Desta forma o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de melatonina no meio de maturação *in vitro* de oócitos caprinos.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), no Campus Ciências Agrárias da UNIVASF, em Petrolina-PE. Foram utilizadas como doadoras de oócitos, 12 cabras Sem Padrão Racial Definido. As fêmeas foram submetidas a um protocolo de estimulação ovariana para, então, ser realizada a colheita de oócitos por laparotomia. O trato reprodutivo foi exteriorizado e os folículos presentes em ambos os ovários foram, individualmente, puncionados e aspirados, utilizando uma agulha 18G acoplada a um tubo de colheita e a uma bomba de vácuo. A pressão de vácuo foi ajustada a 30 mmHg, gerando um fluxo de fluido de 7,0-8,0 mL/min. Os oócitos colhidos foram avaliados de acordo com Gonçalves et al. (2008), sendo selecionados aqueles classificados como de graus I e II. Os mesmos foram divididos em três grupos de maturação: no grupo M0, os oócitos foram imersos em meio TCM-199, suplementado com 2,2 mg de bicarbonato de sódio, 5 mg de LH, 0,5 mg de FSH e 10%(v/v) de soro fetal bovino; já nos grupos M10 e M50, os oócitos foram imersos no mesmo meio do grupo M0, sendo adicionados 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de melatonina, respectivamente. Os oócitos foram, então, dispostos em placas de cinco poços com meio MIV, sob óleo mineral, durante 24 horas, em incubadora de cultivo, a 38,5°C, em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

### Resultados e Discussão

Em nosso experimento, a adição de melatonina ao meio de maturação reduziu, significativamente ( $P > 0,05$ ), a taxa de maturação (Tab. 1). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Wei et al. (2013), que, trabalhando com oócitos humanos, observaram uma menor taxa de maturação ao adicionarem altas concentrações de melatonina 10<sup>5</sup> e 10<sup>7</sup>M. Alguns autores relatam que concentrações fisiológicas de espécies reativas de oxigênio (EROs) são necessárias para o recomeço da meiose (Takami et al., 1999). O mecanismo de ação de antioxidantes na inibição da maturação do oócito não é bem elucidado, mas uma possível hipótese é que a ação de antioxidantes pode envolver a manutenção de níveis inibitórios de cAMP dentro do oócito, que é um



agente bem conhecido para evitar a maturação dos oócitos (Cho; Stern; Biggers, 1974).

Tabela 1. Número (média  $\pm$  e.p.) de oócitos caprinos maturáveis (graus I e II) e maturados *in vitro*, bem como taxa de maturação sob diferentes concentrações de melatonina (M0 = 0  $\mu$ M; M10 = 10  $\mu$ M; M50 = 50  $\mu$ M).

Tratamento	Número de oócitos maturáveis	Número de oócitos maturados	Taxa de maturação(%)
M0	6,33 $\pm$ 0,54	4,60 $\pm$ 0,72	72,66 <sup>a</sup>
M10	6,00 $\pm$ 0,47	2,00 $\pm$ 0,94	33,33 <sup>b</sup>
M50	6,00 $\pm$ 1,24	1,60 $\pm$ 0,98	26,66 <sup>b</sup>

### Conclusão

A inclusão de melatonina, nas concentrações testadas, provocou uma redução nas taxas de maturação oocitária *in vitro* de caprinos.

### Referências

- Cho WK, Stern S, Biggers JD.** Efeito inibitório do dibutilil cAMP na maturação do oócito de rato *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*, v.187, p.383-386, 1974.
- Gonçalves PBD, Oliveira MAL, Mezzalira A, Montagner MM, Visintin JA, COSTA LFS.** Produção In Vitro de Embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2.ed. São Paulo: Varela, p.340, 2008.
- Hardeland R.** Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, v.27, p.119-30, 2005.
- Takami M, Preston S, Toyloy V, Behrman HR.** Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.4, p.684-688,1999.
- Wei D, Zhang C, Xie J, Song X, Yin B, Liu Q, Hu L, Hao H, Geng J, Wang P.** A suplementação com baixas concentrações de melatonina melhora a maturação nuclear de oócitos humanos *in vitro*. *J Assist Reprod Genet*, v.30, p.933-938, 2013.



## **Efeito da melatonina sobre a integridade das membranas plasmática e mitocondrial de espermatozoides criopreservados de ovino**

*Effect of Melatonin on the plasmatic and mitochondrial integrity membrane of sperm cryopreserved ram*

**Priscilla Niely da Costa Sá<sup>1,\*</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>, Viviany Sousa Rodrigues<sup>1</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>2</sup>, Filipe Nunes Barros<sup>1</sup>, Marlon de Araújo Castelo Branco<sup>1</sup>, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>, Jose Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil; <sup>2</sup>Colégio Técnico de Teresina, CTT/UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: priscillaniely@gmail.com

### **Abstract**

*This study evaluate the effect of melatonin supplementation to TRIS-GEMA diluter in plasmatic and mitochondria membrane integrity of semen ram cryopreserved. Was used seven ejaculates of six ram, which were pooled in pool, according to the experimental groups: Control; T1 -  $1 \times 10^{-7}$  mol / L and T2 -  $1 \times 10^{-9}$  mol / L melatonin. Posteriorly the diluting the samples were packaged in straws of 0.25 ml and cryopreserved. After thawing at 37°C for 30 seconds, the samples were analyzed for Test thermoresistance slow (TTR) and acrosomal membrane integrity. For statistical analysis we used the Duncan test ( $\alpha = 0.05$ ) for mean comparison. Treatments 1 and 2 differed statistically control for plasma membrane integrity at times 60, 120 and 180min. It was concluded that supplementation  $1 \times 10^{-7}$  mol / L and  $1 \times 10^{-9}$  mol / L of melatonin increased the integrity of the plasma membrane to 60, 120 and 180 minutes.*

**Keywords:** Criopreservação, melatonin, sperm.

**Palavras-chave:** Criopreservação, melatonina, sêmen.

### **Introdução**

A alta suscetibilidade dos espermatozoides a dano durante a criopreservação é refletida na desestabilização da membrana plasmática e elevação da concentração de cálcio intracelular, bem como no decréscimo da viabilidade, motilidade e integridade da membrana celular (Grossfeld et al., 2008).

Procurando melhorar a qualidade pós-descongelamento do sêmen, diversas pesquisas têm estudado a adição de substâncias sintéticas ou naturais ao ejaculado capazes de minimizar os efeitos deletérios da criopreservação. A exemplo de outras substâncias naturais, a melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina), uma indolamina secretada pela glândula pineal, no cérebro (Awad et al., 2006) participa numa série de funções fisiológicas, incluindo o controle da reprodução sazonal, além de afetar o sistema imunitário e ritmos circadianos.

Desta forma, o presente trabalho foi conduzido para avaliar o efeito da suplementação de melatonina ao diluidor TRIS-gema, sobre a integridade das membranas plasmática e mitocondrial de semen criopreservados de ovino.

### **Material e Métodos**

Foram utilizados 42 ejaculados de seis ovinos, coletados pela técnica de vagina artificial, os quais foram reunidos em pool, e avaliados quanto aos aspectos macroscópicos (volume e aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração espermática e patologias). Posteriormente o sêmen foi diluído em TrisGema de acordo com os tratamentos experimentais: controle; T1 -  $1 \times 10^{-7}$  mol/L de melatonina e T2 -  $1 \times 10^{-9}$  mol/L de melatonina. Em seguida as alíquotas foram envasado em palhetas de 0,25 mL, congelado em máquina automatizada (TK3000) e armazenadas em botijão criogênico (-196 0C). O efeito da melatonina sobre os parâmetros espermáticos de integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial foram avaliados no sêmen pós-descongelamento.

Os dados de integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial foram submetidos a análise de variância (ANAVA) ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013), em seguida realizou-se o Teste de Duncan para comparação de médias ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Resultados e Discussão**

A criopreservação atua gerando choque térmico na célula espermática, resultando no decréscimo que pode ser irreversível na motilidade espermática, acarretando a redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (Watson, 2000).

Ao avaliar o potencial de membrana mitocondrial (Tab.1) observou-se que não houve diferença estatística entre as concentrações de melatonina.

A membrana plasmática é extremamente sensível às crioinjúrias, caracterizadas pela presença de uma bicamada lipídica de ácidos graxos poliinsaturados, tornando-se instável a ação das ROS (Peña et al., 2005). A sua integridade apresenta uma relação positiva com a fecundação, sendo a membrana plasmática responsável pela manutenção da homeostase celular, que pode ser alterada pelo processo de criopreservação (Amann e Pickett, 1987).



Tabela 1. Potencial de membrana mitocondrial (MM) pós descongelação de espermatozoides ovino criopreservados em diferentes concentrações de melatonina.

Tratamento	Potencial de membrana mitocondrial pós-descongelação			
	0 min	60 min	120 min	180 min
Controle (%)	65,85 ± 4,67 <sup>aA</sup>	57,71 ± 14,38 <sup>aA</sup>	47,28 ± 9,14 <sup>aA</sup>	46,14 ± 12,70 <sup>aA</sup>
T1 (%)	64,85 ± 22,22 <sup>aA</sup>	67,19 ± 19,48 <sup>aA</sup>	69,85 ± 29,87 <sup>aA</sup>	71 ± 13,03 <sup>aA</sup>
T2 (%)	61,85 ± 28,97 <sup>aA</sup>	70,28 ± 25,72 <sup>aA</sup>	64,57 ± 30,57 <sup>aA</sup>	65,85 ± 27,49 <sup>aA</sup>

\*a,b,c = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A,B,C = Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).  $x \pm s$ : média e desvio padrão.

A importância das mitocôndrias espermáticas se deve ao fato que a energia necessária para a motilidade dos espermatozoides ocorre através da geração de ATP (Silva, 2010). Desta forma, as alterações das membranas, decorrente da criopreservação, podem provocar conseqüente diminuição do potencial mitocondrial (Aitken, et al., 2012).

Os resultados da avaliação da integridade da membrana plasmática (Tab. 2) mostraram que houve diferença estatística entre as diferentes concentrações de melatonina, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos, para os tratamentos de  $1 \times 10^{-7}$  mol/L e  $1 \times 10^{-9}$  mol/L de melatonina, diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 2. Integridade da membrana plasmática (MP) pós descongelação de espermatozoides ovino criopreservados em diferentes concentrações de melatonina.

Tratamento	Integridade da membrana plasmática pós-descongelação			
	0 min	60 min	120 min	180 min
Controle (%)	64,71 ± 9,92 <sup>aA</sup>	54,28 ± 8,67 <sup>bA</sup>	44,57 ± 9,32 <sup>Ba</sup>	39,71 ± 8,36 <sup>bA</sup>
T1 (%)	62,85 ± 16,55 <sup>aA</sup>	66,2 ± 16,03 <sup>aA</sup>	67,3 ± 9,32 <sup>aA</sup>	61,85 ± 8,36 <sup>aA</sup>
T2 (%)	75,85 ± 7,15 <sup>aA</sup>	77,14 ± 8,17 <sup>aA</sup>	74,54 ± 9,29 <sup>aA</sup>	72,45 ± 7,80 <sup>aA</sup>

\*a,b,c = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A,B,C = Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).  $x \pm s$ : média e desvio padrão.

Silva et al. (2011) observaram que a adição de  $1 \mu\text{M}$  de melatonina em sêmen criopreservado de ovino reduziu a proporção de espermatozoides com membrana plasmática lesionada nos tempos 0 e 180min. No entanto ao adicionar  $100 \text{pM}$  de melatonina houve um aumento no número de espermatozoides com membrana plasmática lesionada. Esses dados diferem ao comparar-se com o presente trabalho, para as concentrações de  $1 \times 10^{-7}$  mol/L e de  $1 \times 10^{-9}$  mol/L de melatonina nos tempos de 60, 120 e 180min., se detectando diferença significativa  $P < 0,05$  com relação ao controle.

## Conclusão

Conclui-se que a suplementação de melatonina na concentração de  $1 \times 10^{-9}$  mol/L adicionada ao diluidor melhorou a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de ovinos.

## Referências

- Aitken RJ, Iulii GN, Gibb Z, Baker MA. The simmet lecture: new horizons on an old landscape-oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. In: 17. Internacional Congress on Animal Reproduction-ICAR, 2012, Vancouver, Canadá. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.7-14, 2012.
- Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Awad H, Halawa F, Mostafa T, Atta H. Melatonin hormone profile in infertile males. *Int J Androl*, v.29, p.409-413, 2006.
- Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, v.70, p.1225-1233, 2008.
- Peña FJ, Saravia F, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez HM. Um método novo e simples para avaliar as alterações da membrana início em congelados e descongelados espermatozoides javali. *Inter J Androl*, v.28, p.107-114, 2005.
- Silva CMB. Efeito da melatonina em espermatozoides de equino. 2010. 72p. Tese (Doutorado), Universidade Técnica de Lisboa, 2010.
- Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta agouti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, v.76, p.1084-1089, 2011.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.481-492, 2000.



## Efeito da melatonina sobre a viabilidade de espermatozoides criopreservados de ovinos

*Effect of melatonin on the feasibility of sperm cryopreserved of ram*

Priscilla Niely da Costa Sá\*, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, Luiz Harlilton Cavalcante Monteiro Mota, Viviany Sousa Rodrigues, Jefferson Hallison Lustosa Silva, Filipe Nunes Barros, Felipe Pereira da Silva Barçante, Jose Adalmir Torres de Souza

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

\*E-mail: priscillaniely@gmail.com

### Abstract

*This study to evaluate the effect of melatonin supplementation to TRIS-GEMA diluter in sperm viability of semen ram cryopreserved. Was used seven ejaculates of six ram, which were pooled in pool, according to the experimental groups: T1 - control; T2 -  $1 \times 10^{-7}$  mol / L and T3 -  $1 \times 10^{-9}$  mol / L melatonin. Posteriorly the diluting the samples were packaged in straws of 0.25 ml and cryopreserved. After thawing at 37°C for 30 seconds, the samples were analyzed for Test thermoresistance slow (TTR) and acrosomal membrane integrity. For statistical analysis we used the Duncan test ( $\alpha = 0.05$ ) for mean comparison. The results demonstrated that to the TTR at time 0 min, T2 showed 54.28% motility, and T1 obtained lower values in the times 0 and 60 minutes for force. Supplementation of  $1 \times 10^{-9}$  mol / L of melatonin improved total motility.*

**Keywords:** *criopreservação, melatonina, ovine.*

**Palavras-chave:** *criopreservação, melatonina, ovino.*

### Introdução

A criopreservação é uma biotécnica utilizada para preservar materiais genéticos por um longo período de tempo, no entanto esta provoca danos à estrutura espermática, à medida que ocorre o decréscimo da temperatura na etapa de congelamento, as propriedades físicas de todas as membranas espermáticas são alteradas. (Watson, 1995).

A alta suscetibilidade dos espermatozoides a danos durante a criopreservação é refletida na desestabilização da membrana plasmática e elevação da concentração de cálcio intracelular, bem como no decréscimo da viabilidade, motilidade e integridade da membrana celular (Grossfeld et al., 2008).

Alguns estudos tem utilizados a adição de substratos ao diluidor espermático com o intuito de reduzir a desestabilização das membranas, dentre estes pode-se citar a melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, a qual atua de forma direta e indireta na preservação da viabilidade seminal (Ashrafi, 2013).

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de melatonina ao diluidor Tris-Gema sobre a viabilidade de espermatozoides criopreservados em ovinos.

### Material e Métodos

Foram utilizados 42 ejaculados de seis ovinos, coletados pela técnica de vagina artificial, os quais foram reunidos em pool, e avaliados quanto aos aspectos macroscópicos (volume e aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração espermática e patologias). Posteriormente o sêmen foi diluído em TrisGema de acordo com os tratamentos experimentais: T1 – controle; T2 -  $1 \times 10^{-7}$  mol/L de melatonina e T3 -  $1 \times 10^{-9}$  mol/L de melatonina. Em seguida as alíquotas foram envasado em palhetas de 0,25 mL, congelado em máquina automatizada (TK3000) e armazenadas em botijão criogênico (-196 OC). O efeito da melatonina sobre os parâmetros espermáticos de termorresistência lento e integridade de membrana acrossomal foram avaliados no sêmen pós-descongelamento.

Os dados para o teste de termorresistência, e integridade de membrana acrossomal foram submetidos a análise de variância (ANAVA) ( $\alpha = 0,05$ ) utilizando o programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013), em seguida realizou-se o Teste de Duncan para comparação de médias ( $\alpha = 0,05$ ).

### Resultados e Discussões

Os efeitos das diferentes concentrações de melatonina sobre a motilidade espermática após a descongelamento nos espermatozoides ovinos submetidos ao teste de termorresistência (TTR) são apresentados na Tabela 1. Os resultados demonstraram que os tratamentos diferiram ( $P > 0,05$ ), entre si e entre os tempos de incubação. A importância de se melhorar a motilidade está relacionada ao possível aumento da fertilidade com obtenção de maiores taxas de prenhez após o uso de sêmen criopreservado.

Com relação ao vigor espermático, entre os tratamentos avaliados, verificou-se que T1 diferiu estatisticamente ( $P > 0,05$ ) do controle e do T2 nos tempos de incubação de 0 e 60 min, apresentando menos valores para este parâmetro, no entanto não diferiu ( $P < 0,05$ ) dos demais tratamentos nos períodos de 120 e 180 minutos (Tab. 2). Os resultados demonstraram quanto ao efeito da melatonina nas concentrações estudadas para as características de integridade da membrana acrossomal (Tab. 3) que T2 no tempo 120 min diferiu



estatisticamente dos demais tratamentos no mesmo tempo.

Ao avaliar efeito da melatonina sobre a integridade da membrana acrossomal nos períodos de 0, 60, 120 e 180 minutos observou-se que não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ), entre os tratamentos avaliados e nem entre os tempos (Tab. 3).

Ressalta-se que a melatonina é capaz de reduzir a desestabilização das membranas celular através de diversas ações, inclusive aumentando a atividade, de enzimas como a glutathione peroxidase e superóxido dismutase o que melhora os aspectos seminais depreciados com a criopreservação (Tan et al., 2007).

Tabela 1. Motilidade total (%) pós descongelação de espermatozoides ovinos criopreservados em diferentes concentrações de melatonina avaliados pelo TTR.

Tratamento	Motilidade espermática pós-descongelação			
	0 min	60 min	120 min	180 min
Controle (%)	44,28 ± 6,07 <sup>bA</sup>	36,42 ± 7,48 <sup>bAB</sup>	31,42 ± 8,52 <sup>bBC</sup>	22,14 ± 8,09 <sup>bC</sup>
T1 (%)	32,85 ± 4,87 <sup>cA</sup>	34,28 ± 5,34 <sup>bA</sup>	22,85 ± 4,87 <sup>bB</sup>	15,7 ± 5,34 <sup>bB</sup>
T2 (%)	54,28 ± 7,86 <sup>aA</sup>	51,42 ± 6,9 <sup>aAB</sup>	41,42 ± 6,9 <sup>aBC</sup>	34,28 ± 5,34 <sup>cC</sup>

\*a,b,c = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A,B,C = Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). x±s:média e desvio padrão.

Tabela 2. Vigor total (%) pós descongelação de espermatozoides ovinos criopreservados em diferentes concentrações de melatonina avaliados pelo TTR.

Tratamento	Vigor espermática pós-descongelação			
	0 min	60 min	120 min	180 min
Controle	2,85 ± 0,37 <sup>aA</sup>	2,57 ± 0,53 <sup>aA</sup>	2,42 ± 0,53 <sup>aA</sup>	2,14 ± 0,37 <sup>aA</sup>
T1	2,14 ± 0,37 <sup>bA</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>bA</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>aA</sup>	1,42 ± 0,53 <sup>aB</sup>
T2	3,00 ± 0,00 <sup>aA</sup>	2,85 ± 0,37 <sup>aAB</sup>	2,42 ± 0,53 <sup>aAB</sup>	2,28 ± 0,48 <sup>aB</sup>

\*a,b,c = Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A,B,C = Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). x±s:média e desvio padrão.

Tabela 3. Integridade da membrana acrossomal (MA) de espermatozoides ovino em diferentes concentrações de melatonina em TRIS – gema descongelado, submetido ao teste de termorresistencia.

Parâmetros	Integridade espermática pós- descongelação			
	0 min	60 min	120 min	180 min
	MA	MA	MA	MA
Controle	82,28 ± 17,71 <sup>a,A</sup>	81,57 ± 18,42 <sup>a,A</sup>	78,57 ± 7,41 <sup>b,A</sup>	76,28 ± 7,15 <sup>a,A</sup>
T1	80,57 ± 9,53 <sup>aA</sup>	82,14 ± 8,31 <sup>aA</sup>	78,71 ± 7,95 <sup>bA</sup>	75,85 ± 9,42 <sup>aA</sup>
T2	91,28 ± 5,82 <sup>aA</sup>	90,00 ± 6,08 <sup>aA</sup>	88,00 ± 5,34 <sup>aA</sup>	86,42 ± 7,67 <sup>aA</sup>

a,b,c, valores com diferentes superíndices na mesma coluna diferem estatisticamente  $P < 0,05$ ; A,B,C valores com diferentes superíndices na mesma linha diferem estatisticamente, mesma linha  $P < 0,05$ .

### Conclusões

A suplementação de  $1 \times 10^{-9}$  mol/L de melatonina aumentou a motilidade total. No entanto as concentrações de  $1 \times 10^{-7}$  mol/L e  $1 \times 10^{-9}$  mol/L de melatonina não alterou a integridade da membrana acrossomal.

### Referencias

- Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.139, p.25-30, 2013.
- Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, v.70, p.1225-1233, 2008.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, v.2, n.2, p.181-197, 2007.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertility and Dev*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.



## **Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) em duas diferentes doses sobre a concentração sérica de progesterona (P4) em cabras Sem Padrão Racial Definido (SPRD) submetidas à inseminação artificial em tempo fixo(IATF)**

*Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on two different doses on the serum concentration of progesterone (P4) in undefined breed goats submitted to Fixed Time Artificial Insemination (FTAI)*

**Silvana Benvindo Ferreira<sup>1</sup>, \*, Antônio de Sousa Junior<sup>1</sup>, Lauro César Soares Feitosa<sup>1</sup>, Luanna Soares de Melo Evangelista<sup>1</sup>, Katiene Régia Silva Sousa<sup>2</sup>, Ícaro Oliveira Torres de Souza<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Teresina, UFPI; <sup>2</sup>Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, UFMA, São Luís, MA, Brasil.

\*E-mail: siluanabf@hotmail.com

### **Abstract**

*The objective of this work was to evaluate the influence of the association of rbST with a protocol of FTAI on the concentration of progesterone (P4) in undefined breed goats. Goats were inseminated following the 11-day protocol. In D6, the animals were divided into three experimental groups: GI (n = 42) 250 mg rbST, SC, G-II (n = 39) 125 mg rbST, SC, and G-III (n = 41) (control). P4 hormonal dosages were performed by ELISA on D0, D09, D12 and D21. The results show that treatment with somatotropin at two different doses associated with an IATF protocol did not affect the serum progesterone concentration.*

**Keywords:** goats, fertility, progesterone.

**Palavras-chave:** cabras, fertilidade, progesterona.

### **Introdução**

A valorização dos caprinos e seus produtos no mercado mundial estimulam pesquisas com o objetivo de otimizar os sistemas de produção. Para tanto, as biotecnologias da reprodução surgem como ferramentas imprescindíveis para o desenvolvimento deste setor destacando-se a inseminação artificial em tempo fixo, considerada uma das principais biotecnologias da reprodução, que permite a execução de programas reprodutivos em qualquer fase do ciclo reprodutivo, aumentando a fertilidade dos rebanhos, possibilitando a previsão do estro e o período ideal de inseminação (Traldi et al, 2007). Todavia inúmeros fatores podem interferir na taxa de prenhez gerando resultados variados devendo considerar ainda as perdas advindas de abortos e mortalidade embrionária.

A somatotropina desponta como alternativa associadas a biotécnicas reprodutivas por possui efeitos diretos e indiretos sobre o desempenho reprodutivo, atuando em diferentes etapas do processo de luteólise e do reconhecimento materno da gestação, atuando no corpo lúteo (CL), no útero e no embrião, acelerando o crescimento do CL e elevando a secreção de P4 (Lucy et al., 1995), estimular a atividade secretória das glândulas endometriais e aumentar o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária (Moreira et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da associação da somatotropina bovina recombinante (rbST) a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo(IATF) sobre a sobre a concentração de progesterona (P4) em cabras Sem Padrão Racial Definido(SPRD).

### **Material e Métodos**

Foram utilizadas 122 fêmeas adultas, selecionadas de acordo com o histórico reprodutivo e sanitário favoráveis. Como protocolo de sincronização do estro, no D0, foram inseridas esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de medroxiprogesterona, por um período de 11 dias. No D6 os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: G-I (n=42) que foram administrados 250 mg de rbST (Boostin®, Schering-Plough/Intervet, Brasil), via subcutânea em uma única dose, G-II (n=39) que receberam 125 mg de rbST, via subcutânea em uma única dose e G-III (n=41) que receberam solução fisiológica (controle), da mesma forma que os demais grupos. No D9 todas as fêmeas receberam injeções intramusculares de 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina-eCG e 75µg de Cloprostenol Sódico-PGF2α. No último dia do tratamento hormonal (D11) as esponjas foram removidas e aproximadamente 36±2 horas após depois as cabras foram inseminadas em tempo fixo por via transcervical. Utilizou-se com sêmen congelado/descongelado, oriundo de um único reprodutor, selecionado por exame andrológico e registro de fertilidade comprovado. O diagnóstico de prenhez foi realizado por exames ultrassonográficos aos 30 e 45 dias após a IATF.

As colheitas de sangue para dosagem de progesterona (P4) foram realizadas por venopunção da jugular com tubos a vácuo, sem anticoagulante, nos dias da colocação do implante (D0), da aplicação de eCG e Cloprostenol Sódico-PGF2α (D09), na IATF (D12) e pós IATF (D21). Após a colheita, o sangue foi centrifugado a 1500G para obtenção do soro, que foi acondicionado em tubos de 2mL do tipo ependorff e acondicionados em freezer a - 20°C. As dosagens hormonais foram realizadas por Ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados de



concentração de P4 foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas de acordo com Software Statistical Analysis System (SAS, 2002).

### Resultados e Discussão

Os valores de P4 não diferiram entre os grupos, como consta na Tabela 1. Esperava-se que no dia (D21) os grupos G1 e G2, tivessem uma concentração maior de P4 em relação ao grupo controle, pois sabe-se que o rbST estimula a função do CL e aumenta a produção de deste hormônio (Lucy, 2000). A ausência de efeito positivo da rbST na concentração sérica de progesterona concorda com os achados de Nascimento et al. (2013) e Montero-Pardo et al. (2011) que também não encontraram diferença na concentração de P4 entre ovelhas tratadas e não tratadas com rbST.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão na concentração de P4 em cabras SPRD, tratadas ou não tratadas com r-bST (250mg ou 125mg), cinco dias antes da retirada do progestágeno.

Tratamentos	D0	D9	D12	D21
Grupo I (250 mg r-bST)	14,75 ± 14,99 a	10,91 ± 14,99 a	14,50 ± 14,99 a	9,83 ± 14,99 a
Grupo II (125 mg r-bST)	15,16 ± 15,00 a	10,33 ± 15,00 a	14,33 ± 15,00 a	10,16 ± 15,00 a
Grupo III (Controle)	14,33 ± 15,00 a	14,16 ± 15,00 a	13,33 ± 15,00 a	8,17 ± 15,00 a

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

O corpo lúteo contém receptores tanto para a somatotropina como para o IGF-I. De fato, existe potencial efeito da rbST favorecendo a fertilidade por meio de sua influência sobre o corpo lúteo, através da secreção de progesterona (Santos et al., 2004). In vitro, o IGF-I estimula a produção de progesterona pelo tecido luteal. In vivo, foi possível observar que o aumento nas concentrações de P4 após tratamento com rbST foi considerado dose-dependente (Gallo e Block, 1991).

Observa-se, portanto, resultados ainda divergentes entre os mais renomados grupos de pesquisa, instigando debates entre autores que relacionam a eficiência do tratamento com somatotropina ao metabolismo animal (Baruselli et al., 2007). Além disso, variações características da espécie contemplada no estudo, dose de rbST, posologia e o momento ideal a ser utilizada, são indicativos para que outros estudos sejam realizados.

### Conclusão

Os resultados mostram que o tratamento com somatotropina em duas diferentes doses associado a um protocolo de IATF não afetou a concentração sérica de progesterona.

### Referências

- Baruselli PS, Gimenes LU, Sales JNS.** Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.205-211, 2007.
- Lucy MC, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, KO Y, Savio JD, Badinga L.** Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domest Anim Endocrinol*, v. 12, p.73-80, 1995.
- Lucy MC.** Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and indulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*, v.83, p.1635-1647, 2000.
- Gallo GF, Block E.** Effects of recombinant bovine on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. *J Anim Sci*, v.71, p.343-353, 1991.
- Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW.** Use of bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, v.57, p.1371-87, 2002.
- Montero-Pardo A, Hernández-Cerón J, Rojas-Maya S, Valencia J, Rodríguez-Cortez A, Gutiérrez CG.** Increased cleavage and blastocyst rate in ewes treated with bovine somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization. *Anim Reprod Sci*, v.125, p.69-73, 2011.
- Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvão KN.** The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*, v. 82-83, p.513-535, 2004.
- Traldi AS, Loureiro M.F.P, Capezzuto A, Mazorra AL.** Métodos de controle da atividade reprodutiva em caprinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.254-260, 2007.



## **Efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre a concentração espermática de ovinos Santa Inês**

*Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) in sperm concentration of sheep Santa Inês*

**Leopoldina Almeida Gomes<sup>1,\*</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>2</sup>, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>,  
Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>, Olivardo Facó<sup>3</sup>, Willams Costa Neves<sup>1</sup>,  
Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>2</sup>Colégio Técnico de Teresina (CTT); <sup>3</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

\*E-mail: le\_medvet@hotmail.com.br

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate among the seminal characteristics, sperm concentration of Santa Ines sheep, aged 22-36 months treated with recombinant bovine somatotropin (rbST). Divided into groups randomly: G-I (2mL / 0.9% NaCl), G-II (100mg / rbST) and G-III (125mg / rbST), receiving treatments subcutaneously every 14 days (D0,14,28, 42,56,70). They were measured scrototesticular biometrics. The ejaculates were collected by artificial vagina, with dummy sheep, and analyzed for volume, vortex, motility, vigor, morphology and sperm concentration. There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) in PE (30,1cm) and in almost all semen parameters. However, on sperm concentration (sperm / mL) in G-III, there was an increase ( $787.69 \pm 480.72$ ) compared to groups. It was concluded that the dose of 125mg / rbST increases the sperm concentration of ovine Santa Ines.*

**Keywords:** ovine, somatotropi, semen.

**Palavras-chave:** ovino, somatotropina, semen.

### **Introdução**

O GH ou somatotropina (ST) é um hormônio pituitário que regula inúmeros mecanismos do crescimento animal, metabolismo de nutrientes além de afetar as funções reprodutivas, com mecanismos biológicos que são classificados como somatogênicos, estimulando a proliferação celular, gametogênese e esteroidogênese, mediados por IGF-I produzidos pelo fígado, com ação sobre vários tecidos (Gonçalves Neto et al., 2009). Diante disso, objetivou-se com o estudo avaliar o efeito da somatotropina bovina recombinante sobre a concentração espermática de ejaculados de ovinos Santa Inês.

### **Material e Métodos**

O experimento foi desenvolvido de março a maio de 2014, no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – LBRA, do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFPI, Teresina-PI. Foram selecionados 18 ovinos Santa Inês com faixa etária entre 22 a 36 meses, divididos em três grupos aleatórios: G1- solução fisiológica NaCl 0,9%; G2-100mg/rbST e o G3- 125mg/rbST (BOOSTIN<sup>®</sup> Intervet Schering Plough), com aplicações a cada 14 dias via subcutânea, de acordo com MacDonal e Deaver (1993), seguidas de coletas de sêmen, por vagina artificial, avaliados andrologicamente (CBRA, 1998). Durante as coletas foram realizados biometria escrototesticular, além das características seminais (volume, motilidade total 0-100%, vigor 0-5, turbilhão 0-5), e dentre elas a concentração espermática. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x6, três tratamentos por seis animais e seis coletas pré-determinadas, utilizando o MIXED do software Statistical Analysis System (SAS, 2015). As médias foram estimadas por quadrados mínimos das variáveis estudadas comparadas pelo teste t e de Tukey-Kramer para dados não balanceados, teste de Tukey em níveis de 5% de probabilidade.

### **Resultados e Discussão**

Ao exame clínico geral e ultrassonográfico quanto à integridade dos órgãos reprodutivos dos ovinos, não foi detectado lesões e alterações que comprometessem o desempenho reprodutivo. Na biometria escrototesticular não foi verificado diferença estatística (Tab.1), porém apresentaram médias segundo manual do CBRA (2013) que estabelece como padrão um PE de no mínimo 30 cm. Não foi observado diferença entre os grupos tratados e não tratados com rbST sobre as características seminais. Entretanto, verificou-se que houve diferença significativa sobre a concentração espermática, apresentando-se elevada ( $787,7^b$ ) nos animais tratados com 125 mg de rbST. De acordo com Sauerwein et. al (2000), o rbST pode agir indiretamente elevando as concentrações de IGF-I, influenciando na espermatogênese e na esteroidogênese. Além de possuir mecanismos biológicos que estimulam a proliferação celular, em nível testicular e uma maior produção espermática, ativando assim uma maior quantidade de túbulos seminíferos, acarretando em maior atividade espermatogênica, porém sem aumentar o volume testicular (FAROFA et al., 2009).



Tabela 1. Características físicas do sêmen fresco de ovinos Santa Inês tratados ou não com rbST.

Parâmetros	CV %	Tratamentos		
		G-I (Controle) (n=6)	G-II (100mg/rbST) (n=6)	G-III (125mg/rbST) (n=6)
VOL (mL)	-	0,88 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>	1,01 <sup>a</sup>
TURB (0-5)	-	3,37 <sup>a</sup>	3,42 <sup>a</sup>	3,03 <sup>a</sup>
MOT (%)	-	76,3 <sup>a</sup>	76,9 <sup>a</sup>	62,2 <sup>b</sup>
VIG (0-5)	37%	3,50 <sup>a</sup>	3,42 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>
CONC (10 <sup>6</sup> /mL)	23%	561,9 <sup>b</sup>	680,0 <sup>b</sup>	787,7 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste t ( $P > 0,05$ ). Volume (Vol), Turbilhão (TURB), Motilidade (MOT); CV % diferentes para as variáveis vigor (VIG); concentração espermática (CONC); \* Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tuckey-Krumer ( $P > 0,05$ ).

### Conclusão

Concluiu-se que a dose de 125mg/rbST aumentou a concentração espermática de ovinos da raça Santa Inês.

### Referências

- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3. ed., Belo Horizonte, 2013. 104p.
- Farofa TS, Rockenbach TL, Velho IC, Rabassa VR, Bianchi Corrêa MN.** Efeito da aplicação da somatotropina (ST) no desempenho reprodutivo de machos ruminantes e suínos, 2009. Acesso 27 de fevereiro de 2014. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/nupeec>.
- MacDonald RD, Deaver DR.** Testicular development in the bulls treated with recombinant bovine somatotropin. *J Anim Sci*, v.7, p.1540-1545, 1993.
- Gonçalves Neto J, Fernandes SAA, Silva FF, Pedreira MS.** Uso da Somatotropina Bovina em búfalas: Efeitos sobre a produção e composição do leite. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.6, p.1056-1071, 2009.
- Pacheco A, Oliveira AFM, Quirino CR, Landim AV.** Características seminais de carneiros da raça santa inês na pré-puberdade, puberdade e na pós-puberdade. *ARS Veterinaria, SP*, v.25, 090-099, 2009.
- SAS.** Institute Inc. SAS/STAT® 14.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2015.
- Sauerwein H, Meyer HHD, Schams D.** Divergent effects of estrogens on the somatotropic axis in male and female calves. *J Reprod Dev*, v.38, p.271-278, 1992.



## **Efeito da Somatotropina Bovina Recombinante (rbST) associado a um protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo em cabras SPRD**

*Effect of Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) associated with a protocol Artificial Insemination in Fixed Time in SPRD goats*

**Filipe Nunes Barros<sup>1,\*</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>2</sup>, Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1</sup>, Sávio Ruan Sampaio de Sousa<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>, Ícaro Oliveira Torres de Souza<sup>1</sup>, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí; <sup>2</sup>Colégio Técnico de Teresina, Teresina, Piauí, Brasil.

\*E-mail: filipenbarros@hotmail.com

### **Abstract**

*We evaluated the effect of Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) seven days before the start of the synchronization protocol on pregnancy rate in goats. Were used 101 females without defined breed in semi-intensive system, randomly divided into two groups. Seven days before the start of estrus synchronization, G1 (n = 49) received 125 mg of rbST, IM, and G2 (n = 52) physiological saline, subcutaneously. In D0, the groups received 1 mL of BE, IM, and were synchronized with intravaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone for 11 days. In D9, they received 300 IU of eCG and 75 µg of PGF<sub>2α</sub>. On D11, the sponges were removed, we performed IATF 36 and 48 hours later, transcervically. It was used pool of Anglo Nubian's semen. Gestational diagnosis was performed 30 days later. A single dose administration of rbST, seven days before estrus synchronization, did not increase the pregnancy rate.*

**Keywords:** goat, growth hormone, ovulation.

**Palavras-chave:** caprino, hormônio do crescimento, ovulação.

### **Introdução**

A maximização da produtividade e da eficiência reprodutiva na caprinocultura fez com que a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) se expandisse com sucesso, possibilitando regular o momento da ovulação, a função do corpo lúteo, o desenvolvimento das ondas foliculares (Ribeiro et al., 2009) e, portanto, o momento ideal de inseminação.

Estudos apontam a somatotropina (ST) como ferramenta para o incremento das biotécnicas reprodutivas. O tratamento com bST atua aumentando a expressão dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), que age elevando o número de folículos recrutados da onda folicular, seu crescimento e acelerando o desenvolvimento do corpo lúteo (Lucy, 2000). Estudos *in vivo* em ovinos e caprinos mostraram que o uso de 125 mg da rbST aumentou as concentrações no soro de IGF-1, maximizando as gestações (Montero-Pardo et al., 2011).

Portanto, este trabalho avaliou o efeito da somatotropina bovina recombinante (rbST) sete dias antes da sincronização de estro em cabras sobre a taxa de prenhez, e secundariamente, o local da IATF.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado em duas fazendas localizadas nos municípios de Matões - MA e Coelho Neto - MA. Foram utilizadas 101 cabras sem padrão racial definido, mantidas em regime semi-intensivo. Elas foram avaliadas quanto à saúde geral e integridade dos órgãos reprodutivos, por exames ultrassonográficos. Sete dias (dia -7) antes do início da sincronização, formou-se aleatoriamente dois grupos: G1 (n=49) foi administrado 125 mg de rbST (Boostin®), intramuscular (IM), e no G2 (n=52), foi administrado solução fisiológica, via subcutânea (SC).

No dia 0, em ambos os grupos, foi administrado 1mL de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®) e inseridas esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de Medroxiprogesterona (Progespon®) por um período de onze dias. No nono dia (dia 9) todas as cabras receberam 300UI de eCG (Novormon®) e 75 µg de PGF<sub>2α</sub> (Ciosin®), via IM. No décimo primeiro dia (dia 11) foi realizada a remoção das esponjas.

O sêmen foi coletado de três reprodutores Anglo-Nubiano, por vaginal artificial, com fertilidade comprovada de acordo com Manual para Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), formando *pool* seminal. Os tubos coletores foram mantidos a 37°C durante avaliação dos aspectos físicos e diluição do sêmen. Após a avaliação, o sêmen foi diluído na proporção 1: 9 utilizando diluidor a base de água de coco (50% água de coco, 25% água destilada e 25% citrato de sódio 5%) (Nunes e Cobarnous, 1995) e mantido em banho-maria. Posteriormente envasou-se em palhetas de 0,25 ml.

A primeira IATF foi realizada 36 horas após a retirada das esponjas, via transcervical, e a segunda IATF, 12 horas depois, utilizando uma única dose de sêmen fresco em palheta de 0,25 ml por inseminação. O diagnóstico de prenhez foi realizado por exames ultrassonográficos 30 dias após a primeira IATF.

O delineamento utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado. Os dados referentes à taxa de



preenhez e aos efeitos do local de deposição do sêmen foram arranjados em tabelas de contigência e, posteriormente, submetidos à análise pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Os dados foram avaliados no SAS (Statistical Analysis System), versão 9.0 (SAS, 2002).

### Resultados e Discussão

As taxas de prenhez dos grupos (G1 e G2) relacionadas ao local de deposição do sêmen na IATF (cervical superficial, cervical média e intra-uterina), foram apresentadas na Tab. 1. Não houve diferença entre os tratamentos avaliados em relação a cada local de deposição do sêmen.

Tabela 1. Taxas de prenhez em cabras SPRD, de acordo com local de deposição do sêmen.

Local	Taxa de Prenhez	
	G1	G2
Cervical Superficial	54,16 <sup>a</sup> (13/24)	29,17 <sup>a</sup> (7/24)
Cervical Média	50,0 <sup>a</sup> (2/4)	75,0 <sup>a</sup> (3/4)
Intra-Uterina	42,85 <sup>a</sup> (9/21)	37,5 <sup>a</sup> (9/24)

\*Médias seguidas de letras diferente minúscula na mesma linha diferem entre-se pelo teste de  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

Observou-se que não houve diferença estatística na taxa de prenhez entre os tratamentos em relação ao local de deposição do sêmen. Esses resultados concordam com os dados obtidos por Ferreira (2012), que fez uso do rbST e utilizou sêmen congelado/descongelado.

Esses dados discordam dos encontrados por Frazão-Sobrinho et al. (2005), em que o local de deposição do sêmen em programas de IA e IATF na espécie caprina mostrou importância relevante na taxa de concepção por tratamento, com uma melhor taxa de prenhez na deposição intrauterina. A redução na taxa de prenhez na IA uterina, aqui observada, pode ser atribuída a traumas ou lesões provocadas na tentativa de atingir o útero.

Na Tab. 2, a administração em dose única de rbST, sete dias antes do protocolo de sincronização não promoveu uma melhoria na taxa de prenhez em cabras SPRD, mesmo apresentando maior valor numérico nas cabras que receberam 125 mg de rbST (48,98% x 36,54%). Corroborando com o resultado, Ferreira (2012), não observou influência positiva na taxa de prenhez ao administrar rbST em doses de 125 mg e 250 mg, em aplicação única, cinco dias antes da retirada dos progestágenos em cabras SPRD. Da mesma forma, Amorim et al. (2008), observaram que a taxa de parto e o número médio de crias por parto não foram influenciados pela rbST em relação do grupo controle em cabras sincronizadas.

Tabela 2. Taxa de prenhez de cabras com ou sem à aplicação da Somatotropina Bovina Recombinante (rbST).

Grupo	Taxa de Prenhez
G1(rbST)	48,98% <sup>a</sup> (24/49)
G2(controle)	36,54% <sup>a</sup> (19/52)

\*Médias seguidas de letras diferente minúscula na mesma coluna diferem entre-se pelo teste do  $\chi^2$  ( $P < 0,05$ ).

Entretanto, Martínez et al. (2011) observaram que a aplicação de 125 mg de rbST em cabras, cinco dias antes da remoção do progestágeno, melhorou a resposta estral e taxa de prenhez. Os mesmos autores também verificaram que as concentrações de IGF-I e insulina aumentaram significativamente 1 dia após a injeção de rbST e permaneceram elevadas até o dia 12 pós-tratamento, o que promove uma melhor fertilização. Além disso, o rbST tem efeito favorável sobre o desenvolvimento embrionário (Hernández-Cerón e Gutierrez-Aguilar, 2013). Esse melhor desenvolvimento é importante para melhor sinalização do embrião no útero materno, contribuindo para o reconhecimento materno da gestação (Roberts et al., 1992), sendo responsável pelo resultado na taxa de prenhez.

### Conclusão

Conclui-se que a administração do rbST em fêmeas caprinas, sete dias antes do início do protocolo de sincronização de estro, não apresentou melhoria significativa na taxa de prenhez em relação ao grupo controle.

### Referências

- Amorim EAM, Torres CAA, Fonseca JF, Amorim LS, Maffili VV, Bruschi JH, Guimarães JD, Cecon PR, Alves NG. Sincronização de estro com CIDR reutilizado em cabras lactantes da raça Toggenburg tratadas com somatotropina bovina recombinante (r-bST). *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.60, p.51-57, 2008.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.



- Ferreira SB.** Influência da somatotropina bovina recombinante (rbst) em doses diferentes sobre a fertilidade de cabras. 2012. 83p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, Teresina, 2012.
- Frazão Sobrinho JM, Almeida ECS, Vieira RJ, Sousa Junior A.** Efeito do número de inseminações e do local de deposição do sêmen sobre a fertilidade de cabras SRD inseminadas por via transcervical com sêmen congelado. In: Congresso Norte/ Nordeste de Reprodução Animal, 6, 2005, Teresina. *Anais...* Teresina: CBRA, 2005. CD - Room.
- Joel Hernández-Cerón, Gutierrez-Aguilar CG.** La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia*, v. 47, p. 35-45, 2013.
- Lucy MC.** Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*, v.83, p.1635-1647, 2000.
- Martínez AMCG, Gutiérrez HYM, Domínguez YJ, Hernández-Cerón.** Respuesta estral y tasa de preñezen cabras en anestro estacional tratadas con progestágenos y somatotropina bovina. *Rev Mex de Cienc*, v.2, p.221-227, 2011.
- Montero-Pardo A, Hernandez-Ceron J, Rojas-Maya S, Valencia J, Rodriguez-Cortez A, Gutierrez CG.** Increased cleavage and blastocyst rate in ewes treated with bovine somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization. *Anim Reprod Sci*, v.125, p.69-73, 2011.
- Nunes JF, Cobarnous Y.** Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. *Ciência Animal*, v.5, n. 1/2, p.15-21, 1995.
- Ribeiro PHPR, Costa Filho LCC, Rodrigues LA, Alves LGC, Silva AS.** Efeitos de diferentes indutores de crescimento folicular na taxa de prenhes de vacas Nelores submetidas a protocolos IATF. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira Zootecnia, 2009, Maringá. *Anais...* Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009. CD-ROM.
- Roberts RM, Cross JC, Leaman DW.** Interferons as hormones of pregnancy. *Endocrine Reviews*, v.13, p.432-452, 1992.



## Efeito de um inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina sobre a esteroidogênese, e Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) em cabras superovuladas

*Effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on steroidogenesis, angiotensin II and angiotensin-(1-7) in superovulated goats*

Lauro César Soares Feitosa<sup>1</sup>\*, Siluana Benvindo Ferreira<sup>2</sup>, Andreia da Silva Costa<sup>3</sup>, Antônio de Sousa Junior<sup>4</sup>, Gregório Elias Nunes Viana<sup>5</sup>, Amilton Paulo Raposo Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UFPI; <sup>2</sup>Agência de Defesa Agropecuária do Piauí – ADAPI; <sup>3</sup>Doutoranda Pós-graduação em Ciência Animal, UFPI; <sup>4</sup>Colégio Técnico de Teresina – CTT; <sup>5</sup>Departamento de Morfologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*Email: lcsfeitosa@ufpi.edu.br

### Abstract

*Local renin angiotensin (RAS) system has been described in the ovary, which has been implicated in various reproductive functions. To evaluate the ovarian RAS in, 13 goats were randomly divided into two groups: Enalapril (n = 7) and control (n = 6). Then, they received superovulation protocol. Enalapril further group received subcutaneously (2mg/kg) enalapril maleate (0.4 mg/kg/day). Blood samples were collected on days 3, 6, 9 and 11, and follicular fluid samples from pre-ovulatory ovarian follicles after exposure by celiotomy on D11. Ang II in serum and follicular fluid were evaluated on days 9 and 12, Ang-(1-7) on day 12 by HPLC and RIA. E2 and P4 concentrations in serum were determined by ELISA. Ang-(1-7) concentrations in plasma was greater on day 9 (P < 0.05), important period for the recruitment and follicular selection. This may indicate that these peptides can an important function in follicular development and oocyte maturation in superovulated goats.*

**Keywords:** ovary, peptides, renin-angiotensin system.

**Palavras-chave:** ovário, peptídeos, sistema renina-angiotensina.

### Introdução

O sistema Renina-Angiotensina sistêmico é bem conhecido pela sua ação no controle do balanço eletrolítico e na regulação da pressão sanguínea. Porém, várias pesquisas tem demonstrado a presença de um sistema renina-angiotensina completo em vários órgãos, incluindo o sistema reprodutivo (Costa et al., 2003; Feitosa et al., 2010; Reis et al., 2011). Além disso, existem evidências de que este sistema possa desempenhar um papel importante em processos reprodutivos como desenvolvimento folicular (Gonçalves et al., 2012), dominância folicular (Ferreira et al., 2011b), maturação oocitária (Honorato-Sampaio, 2012), ovulação (Viana et al., 2011) desenvolvimento do corpo lúteo (Kobayashi et al., 2002).

Frequentemente são relatados papéis opostos para estes peptídeos (Santos et al., 2008) principalmente na ovulação e esteroidogênese. A Ang II tem sido implicada como agente vital na ovulação em ratos e vacas (Ferreira et al., 2007; Portela et al., 2011; Gonçalves et al., 2012). Outros autores relatam que a Ang II atua de forma fundamental na maturação oocitária independente de gonadotropinas, ação que pode ser intermediada pelas prostaglandinas E<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> (Barreta et al., 2008). Entretanto, alguns estudos revelam que a Ang-(1-7) pode ser um fator importante na foliculogênese (Gonçalves et al., 2012), maturação oocitária (Honorato-Sampaio et al., 2012) ovulação (Viana et al., 2011) e esteroidogênese (Costa et al., 2003). É possível que o efeito antes atribuído a Ang II possa ser parcialmente causado pela Ang-(1-7), visto que, alguns relatos afirmam que após uso de um inibidor da ECA, não houve influência na ovulação (Petterson et al., 1992). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do enalapril sobre as concentrações plasmáticas e do fluido folicular de Ang II e Ang-(1-7), além do efeito sobre as concentrações plasmáticas de estrógeno e progesterona e sobre o tamanho de folículos.

### Material e Métodos

O Experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí que está localizado a 5°50'39'' de latitude sul e 42° 50'12'' de longitude oeste. Foram utilizadas 13 cabras sem padrão racial definido (3,6±1,47 anos; peso 31±5,77kg), alimentadas com capim e suplementadas com ração concentrada (16–18% PB), com água e sal mineral *ad libitum*. Para a superovulação, as cabras receberam dispositivos intravaginais com 0,33mg de progesterona (Eazi Breed - CIDR®, Pfizer Saúde animal) por 11 dias. No nono dia receberam 100mg de cloprostenol sódico (Sincrocio/Ourofino) por via intramuscular. Após o nono dia as cabras receberam injeções intramusculares de FSH (Pluset/Serono) separadas em seis aplicações com intervalos de 12 h (60mg, 60mg, 40mg, 40mg, 25mg, 25mg).

Para a avaliação do efeito do inibidor de ECA, as cabras foram divididas aleatoriamente em dois grupos: 1) animais (n = 7) que receberam maleato de enalapril (Pharlab) por via subcutânea, nas seguintes doses: 1–3 dia = 0,125 mg/kg/dia; 4 -6 dias = 0,250 mg/kg/dia; 7–11 dias = 0,325 mg/kg/dia; 2) e grupo controle (n = 6) que receberam solução salina. Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular utilizando tubos de vacutainer com EDTA nos dias 3, 6, 9 e 11. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro estocado a -80°C para dosagem de Progesterona (P4) e Estrógeno (E2). No final do protocolo de tratamento, as cabras, após jejum de 24h, foram anestesiadas com administração intravenosa simultânea de Xilazina (0,1

mg/kg) (Dorcipec®, Vallée) e Ketamina (15 mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands). A laparotomia foi realizada por meio de incisão de 10cm da linha alba na região hipogástrica. O trato reprodutivo foi cuidadosamente exteriorizado e os folículos grandes ( $\geq 4$ mm) foram puncionados com agulha 26G (0,45x13mm) para coleta do líquido folicular, o qual foi estocado em microtubos tipo eppendorf®, adicionado de 1,0 mL de solução inibidora de protease (Conforme Honorato-Sampaio et al., 2012) sendo então congelados em nitrogênio líquido (-196° C) e conservados em freezer a -80°C até o processamento.

Ang II e Ang-(1-7) foram dosadas no fluido folicular e no soro. Ambas as amostras, foram descongeladas e processadas para extração de peptídeos por meio de cartuchos Bond-Elut (Analytichem International, Harbor City, CA, USA), depois, liofilizados em concentrador Speed Vacuum, e reconstituídos para 65% do volume original com solução tampão. Os peptídeos foram quantificados no reconstituido por Radioimunoensaio (Reis et al., 2011). Os anticorpos policlonais anti-Ang II e anti-Ang-(1-7) foram descritos por Simões et al., (2004). Concentrações de progesterona (P4) e estrógeno (E2) no soro foi realizado por Ensaio Imunoabsorvente ligado a Enzima (ELISA) usando kits comerciais (DRG Diagnostics, Marburg, Germany).

### Resultados e Discussão

Não houve diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) para a concentração plasmática de progesterona e estrógeno entre os grupos Enalapril e controle. Não houve diferença estatística significativa na concentração plasmática de Ang II entre os grupos enalapril e controle. Além disso, não houve diferença estatística significativa para a concentração plasmática de Ang-(1-7) no D12.

No entanto, a concentração plasmática de Ang-(1-7) no dia 09 de tratamento de sincronização e superovulação, foi maior no grupo tratado com enalapril (Fig. 1). Este é um período crítico para a o desenvolvimento folicular, visto que o aumento gradual na concentração de estradiol, influenciado pelo FSH por meio da estimulação da expressão da enzima P450 aromatase nas células da granulosa, é de fundamental importância para o recrutamento e seleção de um maior número de folículos (CHENG et al., 2002). O aumento da produção de Ang-(1-7) pode ter ocorrido pela redução na taxa de clivagem de Ang I em Ang II, causada pela inibição da ECA, e ainda, pela conversão direta de Ang I e Ang II em Ang-(1-7), sugerindo que alguns efeitos anteriormente atribuídos a Ang II possa ser intermediado pela Ang-(1-7). Com relação às concentrações de Ang II e Ang-(1-7) no fluido folicular, não foi observado diferença estatística ( $P > 0,05$ ).

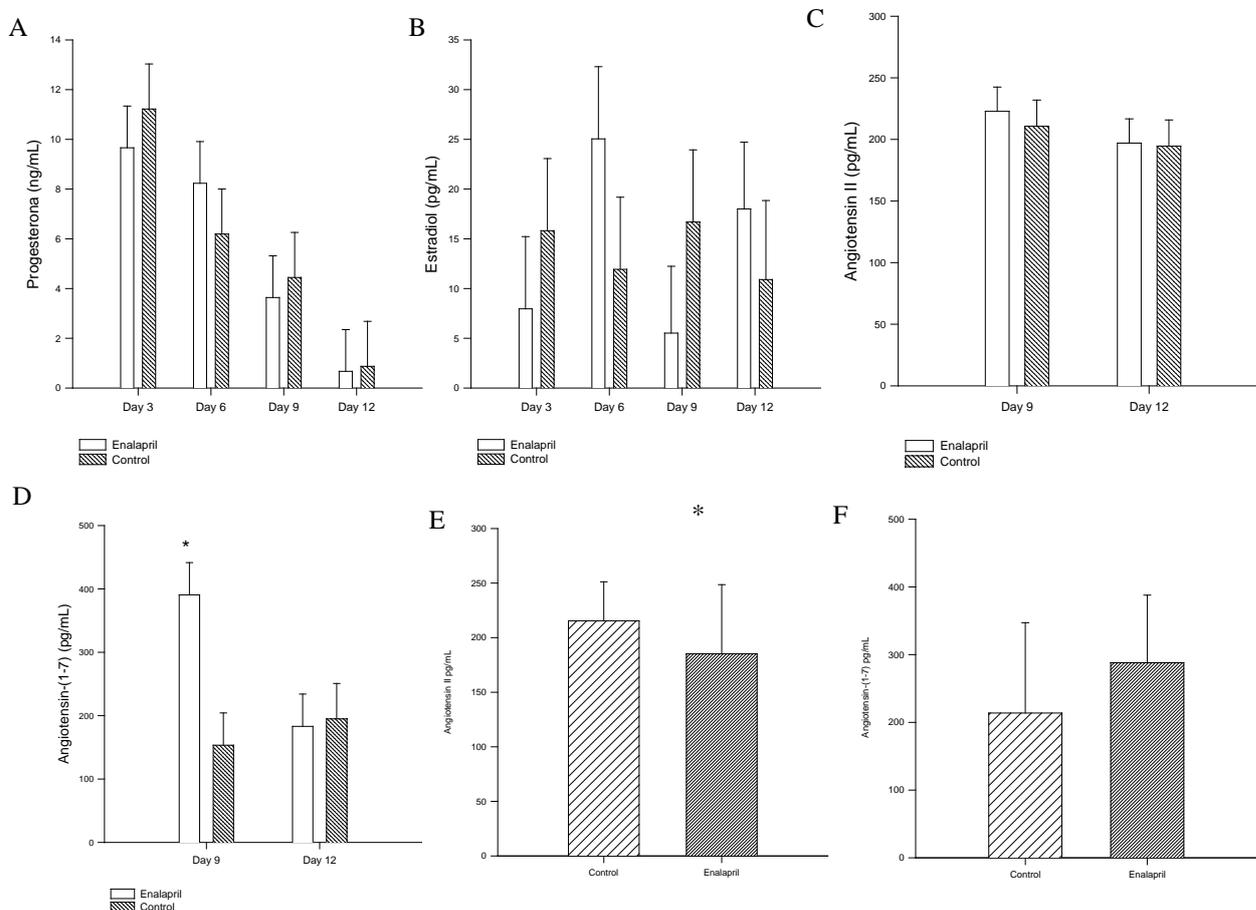


Figura 1. Níveis plasmáticos de Progesterona e estrógeno (A e B), de Ang II e Ang-(1-7), e no fluido folicular de Ang II e Ang-(1-7) no dia 9 de protocolo de superovulação em cabras SRD superovuladas. \*( $P \leq 0,05$ ).



### **Conclusão**

A inibição da ECA por meio do uso de Enalapril aumentou a produção de angiotensina-(1-7) no início do tratamento superovulatório. Isto pode indicar uma possível ação deste peptídeos nos processos de desenvolvimento folicular e maturação oocitária em cabras superovuladas.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a CAPES/PROCAD NF 157/2010.

### **Referências**

**Barreta MH, Oliveira JFC, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, Gonçalves PB.** Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub>. *Reproduction*, v.136, p.733-740, 2008.

**Costa AP, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RA, dos Reis AM.** Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.

**Feitosa LCS, Viana GEN, Reis AM, Costa APR.** Sistema renina-angiotensina ovariano. *Rev Bras Reprod Anim*, v.4, p.243-251, 2010.

**Gonçalves PBD, Ferreira R, Gasperin B, Oliveira JF.** Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. *Reproduction*, v.143, p.11-20, 2012.

**Honorato-Sampaio K, Pereira VM, Santos RAS, Reis AM.** Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotropin-induced maturation in the rat preovulatory follicle. *Experimental Physiology*, v.97, n.5, p.642-650, 2012.



## **Efeito do óleo de *mauritia flexuosa* sobre a integridade estrutural de espermatozoides caprinos criopreservados**

*Mauritia flexuosa* oil effect on the structural integrity of sperm cryopreserved goats

**Danilo de Sousa Lima\*, Kenney de Paiva Porfirio, Ney Rômulo de Oliveira Paula, Janaina de Fatima Saraiva Cardoso, Marlene Pessas Sipaubá, Bruno Leandro Maranhão Diniz, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva, Tuanny Creuza Medeiros Damasceno**

Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: danilolimaufpi@hotmail.com

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate the effect of Mauritia flexuosa oil on the structural integrity of sperm cryopreserved goats. four clinically healthy goats were used. thirty-two samples were taken, with dilution in Tris-egg yolk-glycerol and diluent containing vegetable oil (Mauritia flexuosa). After cryopreservation, the samples were thawed and evaluated for sperm plasma membrane integrity parameters of acrosome and mitochondrial activity. The percentage of cells with mitochondrial activity and acrosome integrity were higher in the control group ( $P < 0.05$ ). There was no difference in the percentage of cells with membrane integrity between the groups ( $P > 0.05$ ). The addition of the seminal Mauritia flexuosa thinner not kept mitochondrial activity parameters and plasma membrane integrity of sperm at levels similar to conventional thinner, but was able to maintain the integrity of the sperm plasma membrane.*

**Keywords:** goats, mauritia flexuosa, semen.

**Palavras-chave:** caprinos, mauritia flexuosa, sêmen.

### **Introdução**

O Brasil apresenta uma grande diversidade de frutas nativas, com características sensoriais peculiares e alto potencial nutricional e econômico (Rufino et al., 2010). O buriti (*Mauritia flexuosa* L.) é um fruto silvestre encontrado principalmente nas margens dos rios e áreas úmidas do Piauí, Amazônia e do Cerrado brasileiro (Almeida, 1998). Composto por antioxidantes, sendo considerados fonte de carotenóides, ácido ascórbico, compostos fenólicos, possuindo ainda atividades bactericida (Melo et al, 2008). Nesta perspectiva, o buriti (*Mauritia flexuosa*) possuindo, características que o qualificam com potencial para o desenvolvimento de diluentes seminais e/ou meios de conservação celulares, objetivou-se avaliar a eficiência do diluente Tris suplementado com diferentes concentrações de óleo de *Mauritia Flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Campus Petrônio Portela, Cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil.

Foram utilizados quatro caprinos, com idade média de 4 anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal 3,5 numa escala de (0-5). Os animais eram alimentados diariamente com volumoso (capim elefante), concentrado (ração peletizada, 300g/animal/dia) e sal mineral *ad libitum*. Foram utilizados 64 ejaculados provenientes dos quatro bodes. A coleta do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor graduado recomendada pelo manual do CBRA (2013). Foram realizadas coletas em duas etapas. Primeiro foi realizado um teste de toxicidade no total de trinta e duas coletas, sendo oito ejaculados de cada animal, os ejaculados foram avaliados com a adição de 5%, 10%, 15%, 20% de diluente a base de óleo de *Mauritia flexuosa*, para se verificar qual melhor concentração. Após o teste de toxicidade, foi escolhido a concentração que apresentou o melhor resultado. Logo após, foram realizadas mais trinta e duas coletas, que foram diluídos em Tris-gema-glicerol (grupo controle) GC ou diluente contendo óleo vegetal (*Mauritia flexuosa*) GB. As amostras foram criopreservadas com auxílio do aparelho Tk3000<sup>®</sup>. Posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos. Após o período mínimo de uma semana as partidas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e a integridade da membrana espermática avaliada com o uso de sondas fluorescentes, conforme descrito por Harrison e Vickers (1990), onde alíquotas de 50 µL de sêmen serão diluídas em 150 µL de TRIS contendo 5 µL de diacetato de carboxifluoresceína e 20 µL de iodeto de propídio, incubadas por 10 minutos a 37°C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. A análise se deu pela contagem de 100 espermatozoides em microscópio de epifluorescência em aumento de 1000 vezes. As células que apresentarem fluorescência verde serão consideradas íntegras, enquanto aquelas apresentando fluorescência vermelha serão consideradas danificadas.

Durante a verificação de atividade mitocondrial, alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de JC-1 e incubados por 10 minutos a 37°C. Um total de 100 espermatozoides foram



avaliados em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000 vezes sob óleo de imersão. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

Para análise do acrossoma foi utilizado o isocianato de fluoresceína conjugado (FITC-PNA). Uma alíquota de 20 µL da solução de FITC-PNA foi descongelada e adicionada a 480 µL de PBS. Aliquotas de 20µL dessa solução foram inseridas sobre lâminas, previamente preparadas com 10 µL de sêmen e incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 µL de meio de montagem UCD foi colocado sobre lâmina e coberta com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides, em aumento de 1000x, usando microscopia de epifluorescência. Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossoma intacto, quando a região acrossomal estava com fluorescência verde intenso, ou acrossoma reagido, quando não apresentou a coloração verde intenso ou sem fluorescência.

Para análise estatística dos dados foi realizado a análise de variância e o teste de Tukey para comparação de médias. Considerou-se um nível de significância de 5%. Foi utilizado o software SAS (*Statistical Analysis System*).

### Resultados e Discussão

No presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos testados na avaliação da membrana plasmática através do uso de sondas florescentes (Tab. 1), o que é bastante satisfatório uma vez para uma boa taxa de fertilidade as membranas devem estar integras para realizar tal função.

Tabela 1. Características seminais para integridade de membrana plasmática, integridade mitocondrial e integridade do acrossoma, pós-descongelamento de espermatozoides caprinos acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa*.

Parâmetros	GC	GB5%
Membrana plasmática (%)	49,72 ± 21,96 <sup>a</sup>	37,84 ± 26,67 <sup>a</sup>
Mitocôndrias (%)	34,28 ± 27,50 <sup>a</sup>	13,31 ± 20,94 <sup>b</sup>
Acrossoma (%)	39,25 ± 19,29 <sup>a</sup>	26,15 ± 18,76 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. GC: Grupo Controle; GB5%: Grupo Buriti, concentração 5%.

A baixa fertilidade do sêmen descongelado é atribuída, em grande parte, as alterações por que passam as membranas espermáticas (Plasmáticas, acrossomais e mitocondriais) durante os processos de congelamento e descongelamento (Medina et al., 2000). Neste contexto, as análises através de sondas fluorescentes tornam-se essenciais para verificar se há ou não alterações que possam tornar os espermatozoides inaptos a fertilização.

De acordo com Snoeck et al. (2007), os espermatozoides devem possuir membrana e organelas integras e funcionais e um genoma haploide intacto para obtenção de sucesso na concepção.

Medina et al. (2000), utilizando sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana de espermatozoides ovinos verificaram que o número de membranas integras aumentaram na medida que se aumentava os níveis de testosterona.

Em relação a avaliação de mitocôndria e acrossomo através do uso das sondas foi possível observar que o grupo contendo óleo de buriti apresentou menor qualidade nesses parâmetros quando comparado com o grupo controle.

Em relação a avaliação da viabilidade do acrossomo os resultados desse trabalho são semelhantes ao encontrados por Medina et al. (2000), onde os autores afirmam que o principal motivo de acrossomo danificado seria a influência da criopreservação.

### Consideração Final

A adição de *Mauritia flexuosa* ao diluidor seminal não manteve os parâmetros de atividade mitocondrial e a integridade de membrana plasmática de espermatozoides em níveis semelhantes ao diluidor convencional, porém foi capaz de manter a integridade da membrana plasmática espermática.

### Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro, através do ETENE/FUNDECI.

### Referências

- Almeida SP, Carneiro JGM. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 464p, 1998.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 3a. Ed., Belo Horizonte, 2013.
- Mediana VH, Vicente WRR, Esper CR, Malheiros EB. Uso de sondas Fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após a criopreservação. ARS



Veterinaria, v.16, p.204-209, 2000.

**Melo KS, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM.** Comportamento reológico da polpa do buriti com leite. *Rev Biol Ciênc da Terra*, v.8, n.2, 2008.

**Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J.** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v.121, p.996-1002, 2010.

**Snoeck PPN, Henry M, Melo MIV.** Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pos descongelamento de sêmen equino. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.56-64, 2007.



## **Efeito do óleo essencial de *Croton nepetifolius* sobre a penetração cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês**

*Effect of the essential oil of Croton nepetifolius Baill on cervical penetration in crossbred Dorper and Santa Inês ewes*

**Aionne de Souza Leite Guimarães<sup>1,\*</sup>, George Antonio Maciel Mudo<sup>1</sup>, Bruna Dias Manguera Bastos<sup>1</sup>, Ana Arlete de Amorim Silva<sup>1</sup>, Hélder Anderson Lima Silva<sup>1</sup>, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>2</sup>, Mabel Freitas Cordeiro<sup>1</sup>, Edilson Soares Lopes Júnior<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Brasil; <sup>2</sup>Colegiado de Farmácia, UNIVASF, Petrolina, PE, Brasil.

\*E-mail: aionneveterinaria@hotmail.com

### **Abstract**

*To evaluate the use of the Croton nepetifolius Baill (OECn) essential oil in cervical penetrability in ewe, forty crossbred females of Dorper and Santa Inês were submitted to estrous synchronization and distributed into four groups (n = 10). A control group and another three groups treated with 200 µg / misoprostol sheep (Misoprostol), 50 µg / mL (OECn50) and 100 µg / mL (OECn100) of OECn oil respectively, before the introduction of an artificial insemination applicator (AI). The depth of cervical penetration and the passage time of the mandrel of AI were recorded and analyzed using ANOVA and the Tukey and Chi-square tests. There was no significant difference in cervical penetrability, but the Misoprostol and OECn100 groups presented a lower penetrability time when compared to the Control group. Therefore, the use of Croton nepetifolius Baill essential oil facilitates cervical sheep penetration.*

**Keywords:** cervix, dilatation, sheep.

**Palavras-chave:** cérvix, dilatação, ovino.

### **Introdução**

A penetração da cérvix ovina no momento da inseminação artificial (IA) é o maior entrave desta biotécnica da reprodução ovina. Neste sentido, alguns fármacos sintéticos têm sido utilizados como dilatadores cervicais, porém, além de serem de alto custo e de difícil acesso, ainda apresentam resultados variáveis e inconsistentes. Pereira et al. (2012) avaliaram o efeito *in vitro* do óleo de *Croton nepetifolius* (OECn) na musculatura cervical em cérvices ovinas oriundas de abatedouro, constatando uma inibição de 100% das contrações de toda musculatura cervical. Todavia, não existem estudos no tocante ao efeito do uso do OECn sobre a dilatação cervical de ovelhas no momento da IA. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso do OECn na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, em Petrolina, Pernambuco. Foram utilizadas 40 ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês, com idade de (média ± erro padrão) 3,38 ± 0,15 anos, escore de condição corporal 3,35 ± 0,05 e com, no mínimo, uma parição. Os estros das ovelhas foram sincronizados por 14 dias de impregnação progesterônica (CIDR) via intravaginal, sendo aplicado por via intramuscular, na retirada do CIDR, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina. No momento da retirada do CIDR, as ovelhas foram igualmente (n=10) distribuídas em quatro grupos. O grupo Controle abrangeu ovelhas que receberam no fundo do saco vaginal, usando uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial bovina, 5 mL de solução fisiológica a 0,9% NaCl, 54 h após a retirada do CIDR e 5 minutos antes de iniciar a mensuração da penetrabilidade cervical (MPC). No grupo Misoprostol, foi administrado, também no fundo de saco vaginal, uma solução de 5 mL de solução fisiológica e 200 µg de Misoprostol, 48 h após a retirada do CIDR e seis horas antes da MPC. No grupo OECn50, foi administrado, também no fundo de saco vaginal e utilizando uma seringa hipodérmica de 1 mL, 50 µg/mL do óleo de *Croton nepetifolius* (OECn), 54 h após a retirada do CIDR e cinco minutos antes da MPC. E no grupo OECn100, foi realizado o mesmo procedimento utilizado no grupo OECn50, porém sendo aplicado 100 µg/mL do OECn. Para avaliar a profundidade e tempo de penetrabilidade cervical, foram utilizados os tempos 0, 24, 48, 54, 60, 66 e 72 h após a retirada do CIDR. Depois de visualizada a cérvix, a extremidade do mandril do aplicador de inseminação artificial bovina, adaptado com graduações de 0,5 cm, foi posicionada no orifício externo da cérvix. Em seguida, o mandril foi introduzido para dentro da cérvix e avançado até o máximo permitido, ponto este registrado como a profundidade de penetração cervical. Para comparação dos diversos parâmetros, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05). Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste Qui-quadrado.



### **Resultados e Discussão**

Não foi verificada diferença significativa entre os grupos de tratamentos ( $P > 0,05$ ) quanto ao grau de profundidade cervical, sendo obtido o valor médio de 4,27 cm. Resultados semelhantes foram observados por Moura et al. (2011), que alcançaram 4,4 cm de penetração de cervice. Já em relação ao tempo de passagem cervical, o grupo OECn100 apresentou um menor tempo de penetrabilidade quando comparado com o Controle, às 60 e 66 horas após a remoção do CIDR. E, às 72 h, o grupo OECn100 apresentou um menor tempo de penetrabilidade quando comparado ao OECn50 e Controle. Pereira et al. (2012), utilizando o OECn, verificou contrações espontâneas no músculo liso cervical da ovelha durante a fase luteal do ciclo estral a partir da concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$ . O OECn possui ação miorelaxante no músculo liso, o qual requer a diminuição dos níveis intracelulares de cálcio e/ou a diminuição da sensibilidade das proteínas contrateis a concentração de cálcio intracelular (Magalhães, 2002).

### **Conclusão**

O uso de 100  $\mu\text{g}$  de OECn facilita o tempo de penetrabilidade cervical ovina, 60 horas após o final de um tratamento progesterônico de sincronização do estro.

### **Referências**

- Magalhães PJC.** Estudo farmacológico do óleo essencial *Croton nepetaefolius* Baill. sobre os músculos liso traqueal e vascular sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos de gânglio celiaco. 2002. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2002.
- Moura DS, Lourenço TT, Moscardini MM, Scott C, Fonseca PO, Souza FF.** Aspectos morfológicos da cervice de ovelhas. *Pesq Vet Bras*, v.31, p.33-38, 2011.
- Pereira AF, Melo LM, Morais SM, Cardoso JHL, Freitas VJF.** Relaxant effect of the essential oil of *Croton nepetifolius* on ovine cervix. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.22, p.522-527, 2012.



## **Eficiência do diluente tris suplementado com óleo de *mauritia flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após criopreservação**

*Efficiency Tris diluent supplemented with oil concentrations on the quality of goat semen after cryopreservation*

**Danilo de Sousa Lima\*, Kenney de Paiva Porfírio, Ney Rômulo de Oliveira Paula, Janaina de Fatima Saraiva Cardoso, Marlene Pessôas Sipaubá, Tuanny Creuza Medeiro Damasceno, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva, Bruno Leandro Maranhão Diniz**

Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: danilolimauufpi@hotmail.com

### **Abstract**

*The aim of this study was to investigate the effects of Tris use supplemented with Mauritia Flexuosa oil as diluent for goat semen cryopreservation. four goats, clinically healthy were used. The animals were fed daily with roughage, concentrate and mineral salt will. Initially, we conducted a toxicity test total of 32 collections. After the toxicity test, the concentration was chosen that showed the best result. Soon after, there were 32 more collections, which were diluted in Tris-egg yolk-glycerol (control group) or GC diluent containing vegetable oil (Mauritia flexuosa) GB. Samples were cryopreserved with the aid of Tk3000® device. Subsequently samples were thawed and analyzed for motility and sperm morphology force. It was observed obtaining post thaw motility in the group plus oil burity which shows a possible alternative to replacement products derived from animal origin.*

**Keywords:** Goats, *mauritia flexuosa*, semen.

**Palavras-chave:** caprinos, *mauritia flexuosa*, sêmen.

### **Introdução**

O Brasil apresenta uma grande diversidade de frutas nativas, com características sensoriais peculiares e alto potencial nutricional e econômico (Rufino et al., 2010). O buriti (*Mauritia flexuosa* L.) é um fruto silvestre encontrado principalmente nas margens dos rios e áreas úmidas do Piauí, Amazônia e do Cerrado brasileiro (Almeida, 1998). Composto por antioxidantes, sendo considerados fonte de carotenóides, ácido ascórbico, compostos fenólicos, possuindo ainda atividade bactericida (Melo et al, 2008). Nesta perspectiva, o buriti (*Mauritia flexuosa*), possuindo, características que o qualificam com potencial para o desenvolvimento de diluentes seminais e/ou meios de conservação celulares, objetivou-se avaliar a eficiência do diluente Tris suplementado com diferentes concentrações de óleo de *Mauritia Flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil. Foram utilizados quatro caprinos, com idade média de 4 anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal 3,5 numa escala de (0-5). Os animais eram alimentados diariamente com volumoso (capim elefante), concentrado (ração peletizada, 300g/animal/dia) e sal mineral *ad libitum*. Foram utilizados 64 ejaculados provenientes dos quatro bodes. As coletas de sêmen foram realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor graduado recomendada pelo manual do CBRA (2013). Foram realizadas coletas em duas etapas. Primeiro foi realizado um teste de toxicidade no total de trinta e duas coletas, sendo oito ejaculados de cada animal, os ejaculados foram avaliados com a adição de 5%, 10%, 15% e 20% de diluente a base de óleo de *Mauritia flexuosa*, para determinação da melhor concentração. Após o teste de toxicidade, foi escolhido a concentração que apresentou o melhor resultado. Posteriormente, foram realizadas mais trinta e duas coletas, que foram diluídos em Tris-gema-glicerol (grupo controle) GC ou diluente contendo óleo vegetal (*Mauritia flexuosa*) GB. As amostras foram criopreservadas com auxílio do aparelho Tk3000®. Em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijões criogênicos. Após o período mínimo de uma semana as partidas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo eppendorf e homogeneizadas para a análise imediata de motilidade, vigor espermático e morfologia.

### **Resultados e Discussão**

As características microscópicas do sêmen pós descongelamento acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa* estão descritos na Tab. 1.

Os parâmetros de motilidade e vigor espermáticos do grupo controle foram superiores quando comparado com o grupo (GB5%) apresentando diferença significativa no teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em relação ao parâmetro morfologia ambos os grupos não apresentaram diferença significativa.



Os resultados desse trabalho para o grupo controle estão de acordo com os parâmetros mínimos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para o sêmen caprino congelado (CBRA, 2013). Para se obter esses parâmetros fisiológicos adequados e bons resultados após a criopreservação, Silva e Guerra (2011), relatam que se faz necessária a padronização de protocolos de criopreservação para cada espécie animal.

O óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) pode ser utilizado em tecnologias aplicadas ao sêmen animal devido suas características que qualificam com potencial para o desenvolvimento de diluentes seminais. Porém um dos requisitos para o sucesso de sua aplicação como diluidor e crioprotetor é manter a viabilidade da célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelação e descongelação seminal (Salmito Vanderley et al., 2012).

Tabela 1. Características seminais (Médias  $\pm$  Desvio padrão) pós-descongelação do sêmen de bodes acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa*

Parâmetros	GC	GB5%
Motilidade	36,25 $\pm$ 8,94 <sup>a</sup>	18,15 $\pm$ 13,63 <sup>b</sup>
Vigor	2,34 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	1,74 $\pm$ 1,24 <sup>b</sup>
Morfologia	96,03 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	96,03 $\pm$ 1,33 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. GC: Grupo Controle; GB5%: Grupo Buriti, concentração 5%.

Neste presente trabalho os resultados mostraram que a adição do óleo de buriti ao diluente e crioprotetor seminal, apesar dos baixos resultados, apresentou dados satisfatórios na substituição da gema de ovo como crioprotetor. Esse achado é um grande avanço principalmente na parte sanitária uma vez que o grande gargalo da utilização da gema de ovo é o não controle sanitário por se tratar de um produto de origem animal.

Corroborando com esses resultados, Cavaltante et al. (2014) utilizando um produto vegetal a base de Água de Coco em Pó (ACP-102<sup>®</sup>), verificaram que o uso desse produto conferiu uma menor proteção aos espermatozoides de ovinos quando comparado ao grupo controle contendo o Tris. Porém os autores também afirmam que seu uso pode se tornar uma alternativa viável desde que haja um aprimoramento de sua fórmula.

### Consideração Final

A obtenção de motilidade pós descongelamento no grupo sem gema de ovo acrescido de óleo de buriti demonstra uma possível alternativa na substituição de produtos oriundos de origem animal, no entanto novos estudos são necessários para que se possa obter resultados equivalentes a crioprotetores convencionais a base de gema de ovo.

### Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro, através do ETENE/FUNDECI.

### Referências

- Almeida SP, Carneiro JGM. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- Cavalcante JM, Brasil OO, Salgueiro CCM, Salmito-Vanderley, Nunes JF. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente a base de água de coco em pó (ACP-102). *Ciênc Anim Bras*, v.15, p.344-353, 2014.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 3a. ed. Belo Horizonte, 2013.
- Melo KS, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM. Comportamento reológico da polpa do buriti com leite. *Revista Biologia Ciências da Terra*, v.8, p.197-206, 2008.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v.121, p.996-1002, 2010.
- Salmito-Vanderley CBS, Vieira MJA F, Leite LV, Oliveira FCE, Linhares FRA, Salgueiro CCM, Nunes JF. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*, v.22, p.255-268, 2012.
- Silva SV, Guerra MMP. Efeito da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para a redução das crioinjúrias. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.370-384, 2011.



## **Estro e morfologia cervical de ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês submetidas à sincronização do estro**

*Estrus and cervical morphology of crossbred Dorper and Santa Inês ewes submitted to estrus synchronization*

**Aionne de Souza Leite Guimarães\*, Eldo Gonçalves de Souza Silva, George Antonio Maciel Mudo, Ana Arlete de Amorim Silva, Bruna Dias Manguiera Bastos, Hélder Anderson Lima Silva, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior**

Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil.

\*E-mail: aionneveterinaria@hotmail.com

### **Abstract**

*In order to correlate the beginning of estrus to vaginal and cervical morphologies after synchronization of estrus in ewes. Forty crossbred females of Dorper and Santa Inês were submitted to estrous synchronization using CIDR and eCG. After hormonal treatment, we recorded oestrus, morphology of vagina and cervix. The data were analyzed using the Analysis of Variance and the Tukey and Chi-square tests. All sheep presented estrus, beginning at  $32.30 \pm 0.99$  h after removal of the CIDR. There was a predominance of ewes with vaginal and cervical epithelium with pink coloration. At 0 h and 24 h after CIDR removal, 90% and 75% of the ewes presented incomplete crystallization respectively. The maximum crystallization of the cervical mucus occurred at 48 hours after withdrawal of the CIDR. Therefore, the histomorphology of the mucosa and cervical mucus varies according to the time of estrus of sheep.*

**Keywords:** cervix, oestrus, sheep.

**Palavras-chave:** cervice, estral, ovino.

### **Introdução**

A penetração da cervice sofre grande influência do momento da inseminação artificial em relação ao estro. Siqueira (2006) observou que a taxa de concepção resultante de inseminação artificial com sêmen resfriado, realizada entre 12 e 24 horas do início do estro, foi maior que quando as inseminações foram realizadas após aquele intervalo. Fonseca et al. (2010) relataram em cabras que o momento do da inseminação artificial deve ser considerando tanto o início do estro quanto a morfologia cervical. Porém, informações da relação entre o momento do início do estro e a morfologia cervical como possível indicador do momento da inseminação artificial são escassos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi correlacionar o início do estro às morfologias vaginal e cervical após sincronização dos estros de ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, em Petrolina, Pernambuco. Foram utilizadas 40 ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês, com idade de (média  $\pm$  erro padrão)  $3,38 \pm 0,15$  anos, escore de condição corporal  $3,35 \pm 0,05$  e com, no mínimo, uma parição. Todas as ovelhas receberam por via intravaginal, um dispositivo liberador de progesterona (CIDR), o qual permaneceu na porção cranial da vagina por 14 dias. No momento da retirada do CIDR, também foi administrado, por via intramuscular, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). Decorridas 12 horas da retirada do CIDR, iniciou-se a detecção do estro, sendo repetida a cada quatro horas. As morfologias vaginal e cervical foram avaliadas nos tempos 0, 24, 48, 54, 60, 66 e 72 h após a retirada do CIDR. Também durante os mesmos momentos, foi avaliada a quantidade, a coloração e o aspecto histológico do muco cervical. Quanto ao aspecto histológico, foi realizado um esfregaço (lâminas) do muco cervical utilizando um swab estéril. As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente durante 15 minutos e, logo em seguida, foi avaliada sob microscopia óptica, a um aumento de 100X, para posterior análise dos diferentes padrões de cristalização, sendo estes classificados como: incompleto ou de cristalização atípica, de cristalização completa ou típica e degradados cristalização. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste Qui-quadrado.

### **Resultados e Discussão**

Com relação ao comportamento estral, todas as ovelhas apresentaram estro, sendo o intervalo de tempo entre a retirada do CIDR e o início do estro de  $32,30 \pm 0,99$  h com a maioria dos animais em estro até 32 horas após a retirada do CIDR. Do momento da retirada do dispositivo (0 h) até 60 horas após sua retirada, foi verificado um aumento da descarga de muco cervical, sendo reduzido às 72 horas. No que se refere à coloração dos epitélios vaginal e cervical em relação à retirada do CIDR, em todos os momentos de observação, predominou as ovelhas que apresentavam epitélios vaginal e cervical de coloração rosa. No que diz respeito à



descarga vaginal, esta pode ser observada um a dois dias antes do início do estro, sendo mais evidentes no seu decorrer (Siqueira, 2006) e o estradiol tem uma grande influência sobre o fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo em ovinos, bem como o aumento deste fluxo reflete na cor do epitélio vaginal e cervical. Às 0 h e 24 h após a retirada do CIDR, 90 e 75% das ovelhas apresentaram cristalização incompleta, respectivamente. A cristalização máxima foi observada às 48 h e o início da degradação da cristalização foi observado a partir das 54 até 72 h após a retirada do CIDR. Em relação ao padrão de cristalização, foi verificada a cristalização completa, 48 h após a retirada do CIDR. A cristalização está associada com o aumento de conteúdo aquoso e alterações nas quantidades relativas de glicoproteínas (Gould e Ansari, 1981).

### **Conclusão**

Portanto, a morfologia vaginal e cervical, bem como a histologia do muco cervical se comportam de acordo com o momento do estro de ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês.

### **Referências**

- Fonseca JF, Cruz RC, Pinto PHN, Facó O.** Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia, 1, 2010, Ilhéus. Anais do I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia. Ilhéus: UESC, 2010. p. 1-30.
- Gould KG, Ansari AH.** Electrolyte interactions in cervical mucus and their relationship to circulating hormone levels. *Contraception*, v. 23, p.507-516, 1981.
- Menárguez M, Pastor LM, Odeblad E.** Morphological characterization of different human cervical mucus type using light and scanning electron microscopy. *Human Reproduction*, v. 18, p.1782-1789, 2003.
- Siqueira AP.** Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2006.



## Estudo vídeoassistido via vaginal com tentativa de histeroscopia para inseminação artificial em ovinos

*Vaginal video-assisted study with attempt to hysteroscopy for artificial insemination in sheep*

Augusto Ryonosuke Taira<sup>1\*</sup>, Moises Moreira Lima<sup>2</sup>, Renata Sitta Gomes Mariano<sup>1</sup>, Priscila Del Aguila da Silva<sup>1</sup>, Naiara Nantes Rodrigues<sup>1</sup>, Luisa Pucci Bueno Borges<sup>3</sup>, Pedro Paulo Maia Teixeira, <sup>2</sup>Wilter Ricardo Russiano Vicente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Campus Jaboticabal, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup> Universidade Federal do Pará. Campus Castanhal, Pará, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade de Franca. Franca, São Paulo, Brasil.

\*E-mail: augusto.vete@gmail.com

### Abstract

Whereas intrauterine deposition of semen is essential to obtain high rates of fertilization, the aim of this study was to develop a new technique of video-assisted transcervical artificial insemination. It was used a rigid endoscope with 17.5 cm by 2.5 mm of diameter to facilitate the passage of cervical rings and allow intrauterine deposition of semen. The frequency of types of cervical ostium was 40%, 30%, 20% and 10%, being papilla, smooth, flap and rosettes respectively. The average penetration was  $1.4 \pm 0.96$  cervical rings, and the access to the uterus was impossible in 100% of animals, semen was deposited on superficial cervical region in 90% of animals and 10% in the mean cervical region, average time of passage was 4' and 10", obtaining 10% of pregnancy rate. It was concluded that the studied technique requires adaptations as semi-flexible and smaller in diameter optics to provide better results.

**Keywords:** Endoscopes, transcervical, intrauterine.

**Palavras-chave:** Endoscópio, transcervical, intrauterino.

### Introdução

Para a inseminação artificial em ovinos, a deposição intrauterina do sêmen é de invariável importância quando se busca altas taxas de concepção, entretanto, em poucas fêmeas consegue-se essa penetração completa da cérvix (Gunduz et al., 2010). Além de garantir maior potencial do sêmen congelado ou refrigerado, a deposição no útero elimina os efeitos adversos de transporte e sobrevivência dos espermatozoides no trato genitourinário da ovelha. Pode-se utilizar a inseminação artificial transcervical que, ao contrário da laparoscópica, é um procedimento não cirúrgico, menos invasivo e de maior aplicabilidade (Salamon e Maxwell, 1995). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma nova técnica de passagem cervical de modo vídeo assistido para inseminação artificial em ovinos.

### Material e Métodos

O estudo foi realizado sob anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Protocolo nº 9.214/16). Foram utilizados 10 (dez) animais da raça Santa Inês, considerados hígidos após exames clínicos e ultrassonográficos do aparelho reprodutor. Todos os animais foram mantidos em baias coletivas com acesso *ad libitum* à água, sal mineral e silagem. Os animais foram sincronizados com protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), utilizando-se de dispositivo intravaginal impregnado com 33mg de progesterona em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), tendo a permanência de seis dias. No quinto dia (D5) foi administrado 37,5µg de cloprostenol sódico e 300UI de eCG ambos por via intramuscular. Após 48 a 55 horas realizou-se a IATF utilizando sêmen descongelado oriundo de uma Central de biotecnologia. Os animais foram contidos elevando os membros posteriores, seguindo uma limpeza da região perineal, com espéculo vaginal a cérvix foi visualizada e examinada, neste momento instilou-se 2 mL de lidocaína (2%), no fundo vaginal para então dar início aos procedimentos. Para a tentativa de histeroscopia foi utilizada uma pinça de Allis para fixar o óstio cervical, a fim de facilitar entrada do endoscópio. Foi utilizado um endoscópio rígido de 2,7 mm de diâmetro, 17,5cm de comprimento e ângulo de visão de 0°, inserido em uma bainha de proteção, acoplado a uma câmera e a um cabo de fibra ótica, fornecendo assim, luz para o interior do lúmen do trato genitourinário. A tentativa de passagem da cérvix ocorreu de maneira vídeoassistida, caso o interior útero fosse alcançado, o endoscópio era retirado e a inseminação realizada. Quando o interior do útero não foi alcançado em cinco minutos de manipulação cervical, o sêmen foi depositado no local de maior progressão. Em todos os animais cronometrou-se o tempo de passagem da cérvix (manipulação cervical), bem como o tipo do óstio cervical, número de anéis transpassado e local de deposição do sêmen.

### Resultados e Discussão

O tipo de óstio cervical mais frequentemente encontrado foi o tipo papila, apresentando 40% (4/10) de



prevalência, seguidas pelos tipos: lisa, flap e roseta com 30% (3/10), 20% (2/10) e 10% (1/10) respectivamente, não observando nenhum óstio cervical do tipo bico-de-pato, diferentemente do que foi encontrado por Franco et al. (2014), onde a maior prevalência (46%) foi do tipo bico-de-pato, igualmente aos achados de Cruz Júnior (2006) onde observou-se uma frequência de 51% deste tipo de óstio. Para realização da histeroscopia, o óstio cervical é a primeira barreira a ser vencida. As maiores dificuldades de transposição do óstio cervical foram encontradas na do tipo lisa, onde teve maior tempo de manipulação e menor taxa de penetração, corrobora Moura, et al. (2011). O acesso ao útero foi impossível em 100% dos animais, como penetração média de  $1,4 \pm 0,96$  de anéis cervicais, dados semelhantes obtidos por Gusmão, et al. (2009), onde utilizou-se ovelhas da raça Dorper para colheita transcervical de embriões, não conseguindo penetrar na cérvix dos animais do grupo controle. Em cabras a histeroscopia é um procedimento possível de ser realizado, como relatado por Colagross-Schouten, et al. (2014), onde o interior do útero foi alcançado por meio da endoscopia cervical para colocação de implantes contraceptivos. A opacidade e abundância de muco dificultou a realização da histeroscopia, no momento que entra na cérvix o muco fica em contato com a ótica inviabilizando a visualização. Com o decorrer do cio, o muco se torna cada vez mais opaco e pegajoso (Traldi, 1990). Com relação ao local de deposição do sêmen, 90% (9/10) foram realizadas na região cervical superficial e apenas 10% (1/10) na região cervical média com tempo médio de 4' e 10''. Não foi possível realizar nenhuma inseminação intrauterina, sendo o local de deposição relacionado diretamente com a taxa de prenhez (Taqueda, et al., 2011). A associação do local de deposição e o uso de sêmen congelado obteve 10% (1/10) de taxa de prenhez, resultado próximo ao encontrado por Cardoso, et al. (2009), onde utilizaram-se, sêmen congelado e deposição cervical perfazendo 14,7% de prenhez.

### Consideração Final

Os resultados obtidos demonstram que a técnica empregada não apresenta boa aplicabilidade, mostrando resultados pouco satisfatórios. Para que o objetivo seja cumprido, a técnica estudada necessita de adaptações, como por exemplo, óticas semi-flexíveis e de menor diâmetro que facilitem a completa passagem do óstio e anéis cervicais, além de desenvolver um mecanismo para que o muco cervical não inviabilize a realização da técnica. A inseminação transcervical mostra-se uma técnica menos invasiva, contudo ainda se tem baixos índices reprodutivos quando associado ao uso de sêmen congelado. Estudos sobre a criobiologia do espermatozoide ovino associado a estratégias de inseminação devem ser realizados visando ao aumento da eficiência reprodutiva da espécie.

### Agradecimentos

Às empresas Ouro Fino Saúde Animal e Top In Life Biotecnologia & Genética Animal que contribuíram com produtos indispensáveis para a executabilidade deste trabalho, ao CNPq pelo auxílio financeiro.

### Referências

- Cardoso E, da Cruz JF, Ferraz RCN, Neto MRT, dos Santos RS.** Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. *Rev Bras Ciênc Agr*, v.4, n.2, p.217-222, 2009.
- Colagross-Schouten A, Allison D, Brent L, Lissner E.** Successful Use of Endoscopy for Transcervical Cannulation Procedures in the Goat. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.909-912, 2014.
- Cruz Júnior CA.** Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês. 2006, 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Universidade de Brasília. Brasília, 2006.
- Franco MC, dos Santos JF, Maciel TA, Neto PJD, Oliveira D.** Morfologia da cérvix de ovelhas Santa Inês adultas nas fases luteínica e folicular. *Ciênc Anim Bras*, v.15, n.4, p.495-501, 2014.
- Gunduz MC, Turna O, Cirit U, Uçmak M, Tek Ç, Sabuncub A, Bacinoglu S.** Lambing rates and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. *Animl Reprod Sci*, v.118, p.32-36, 2010.
- Gusmão AL, Silva JC, Bittencourt TCC, Martins LEP, Gordiano HD, Barcosa LP.** Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, n.2, p.313-318, 2009.
- Moura DS, Lourenço TT, Moscardini MM, Scott C, Fonseca PO, Souza FF.** Aspectos morfológicos da cérvix de ovelhas. *Pesq Vet Bras*, v.31, n.1, p.33-38, 2011.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*, v.38, p.1-36, 1995.
- Taqueda GS, Azevedo HC, Santos EM, Matos JE, Bittencourt RF, Bicudo SD.** Influência de aspectos técnicos e anatômicos nos índices de fertilidade baseado no desempenho da inseminação artificial transcervical e ovinos. *Ars Veterinaria*, v. 27, 2011.
- Traldi AS.** Aspectos Reprodutivos dos Ovinos – Performance Reprodutiva dos Ovinos Deslanados no Brasil. In: *Produção de Ovinos, 1990, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal, FUNEP, 1990.*



## **Fertilidade do sêmen congelado/descongelado e, posteriormente, rediluído em acp-102 em ovinos de corte exploradas em sistema de criação semi-intensivo**

*Fertility of frozen / thawed semen and subsequently rediluted in ACP-102® sheep sectional operated in semi-intensive farming system*

**Jheyson Douglas Rodrigues de Sousa<sup>1,\*</sup>, Ana Lys Barradas Bezerra Mineiro<sup>2</sup>, Kenney de Paiva Porfírio<sup>3</sup>, Gustavo Henrique Chaves Martins<sup>4</sup>, Allana Karolyne Figueredo de Brito<sup>1</sup>, Estéfane Kelly Dias Araújo<sup>1</sup>, Marlene Sipaúba de Oliveira<sup>5</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI). Teresina, Piauí, Brasil. <sup>2</sup>Professor Dr. Adjunto da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Teresina, Piauí, Brasil; <sup>3</sup>Mestrando em ciência animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI). Teresina, Piauí, Brasil; <sup>4</sup>Residente do Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal – UFPI;

<sup>5</sup>Doutorando em ciências animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI). Teresina, Piauí, Brasil.

\*E-mail: jheyson\_douglas@hotmail.com

### **Abstract**

*The objective of this study was the evaluation of the frozen and thawed semen fertility in ACP-102®. For this, 37 ewes were used, previously evaluated and considered clinically and reproducibly fit according to CBRA standards. The semen used was also evaluated according to CBRA standards (2013). After being collected, the semen was frozen in a TK 3000® seminal freezing machine. After thawing, half of the samples were re-diluted in ACP-102®, each vial in a 1 ml aliquot of ACP, and then the animals were inseminated in different ways, laparoscopic and transcervical. The group of animals submitted to insemination with semen rediluted in ACP-102® demonstrated a fertility rate on the 60-day ultrasound examination greater than the group inseminated with Tris-Gem alone. No significant differences were found between insemination techniques regarding fertility.*

**Keywords:** ACP-102®, fertility, ovine.

**Palavras-chave:** ACP-102®, fertilidade, ovino.

### **Introdução**

Evidencia-se cada vez mais o crescimento na criação e na produção de ovelhas, bem como a ampliação no mercado de carne ovina, influenciados pelo investimento em pesquisas relacionadas ao melhoramento genético. Uma das maneiras de se intensificar o melhoramento é o uso de biotécnicas da reprodução, entre elas a inseminação artificial, a qual proporciona maior amplitude de resultados, já que poucos reprodutores selecionados produzem sêmen suficiente para a grande quantidade de fêmeas que reproduzem anualmente (Oliveira, 2009).

O uso de biotecnologias reprodutivas objetiva a obtenção do melhoramento genético dos animais de interesse econômico. A utilização dessas biotecnologias, como o uso de diluentes seminais associados a processos de preservação por refrigeração ou congelamento, seguidos de inseminação artificial, visa aumentar o número de animais disponíveis para seleção, diminuindo o intervalo entre gerações e obtendo-se ganho genético pelo aumento da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas caprinas. Dentre os diluentes seminais, estudos vêm sendo realizados com o uso da água de coco in natura desde a década de 80 e, mais recentemente, com a água de coco em pó desde 2002, apresentando resultados satisfatórios quanto à preservação espermática. (Salgueiro & Nunes, 2012)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fertilidade de ovelhas inseminadas com sêmen congelado e descongelado e posteriormente rediluído em ACP-102, verificando-se a taxa de prenhez aos 60 dias.

### **Material e Métodos**

Foi utilizado um reprodutor ovino da raça Dorper previamente atestado após a realização de exame andrológico completo de acordo com o manual do CBRA (2013). Foram utilizadas 37 matrizes ovinas sem padrão racial definido ou mestiças, com escore corporal entre 2,5 e 4, com alimentação a base de capim, ração e sal mineral *ad libitum*. As fêmeas foram submetidas ao exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação e identificação de patologias reprodutivas, onde as fêmeas portadoras de patologias reprodutivas foram excluídas do projeto. A coleta de sêmen para processamento foi realizada por meio de vagina artificial na presença de fêmea em estro. Imediatamente após a coleta foram realizadas as seguintes análises: determinação do volume do ejaculado (mL), concentração espermática ( $\times 10^9$  espermatozoides/mL), motilidade massal e motilidade individual progressiva (0-100%), vigor espermático (escala de 0-5) por microscopia. A morfologia espermática foi avaliada em esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina em microscópio ótico, onde 200 células foram classificadas, segundo critérios do CBRA (2013). O sêmen após a avaliação inicial foi diluído em diluente TRIS e congelado em Nitrogênio líquido. Para a sincronização do estro e da ovulação das ovelhas, foram utilizadas



esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de Acetato de Medroxiprogesterona (MAP), bem como aplicações via intra-muscular de 300 UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina). Quarenta e oito horas após a retirada das esponjas foi realizada a inseminação artificial por via cervical superficial. A taxa de fertilidade das fêmeas foi observada aos 60 dias após o estro, através da ultra-sonografia. Foi analisada a taxa de gestação, calculada com base no número de fêmeas gestantes dividido pelo número de fêmeas inseminadas.

### Resultados e Discussão

Os resultados apresentando taxa de prenhez aos 60 dias estão apresentados na tabela 1.

Segundo Salgueiro e Nunes (2012), a gema de ovo apresenta maior capacidade crioprotetora que o ACP na espécie ovina, baseado nisso o presente trabalho demonstra a viabilidade do sêmen em diluente TRIS-gema pós-descongelamento e corrobora a superioridade crioprotetora deste em relação ao ACP, porém demonstra também, a melhora das taxas de prenhez quando associado ao ACP como rediluidor pós-descongelamento.

Tabela 1. Fertilidade aos 60 dias.

	Laparoscopia	Cervical	Total
ACP	7/10 (70%) <sup>a</sup>	6/7 (85,71%) <sup>b</sup>	13/17 (76,47%)
Controle	5/9 (55,55%) <sup>a</sup>	6/11 (54,54%) <sup>a</sup>	11/20 (55%)
Total	12/19 (63,15%) <sup>a</sup>	12/18 (66,66%) <sup>a</sup>	24/37 (64,86%)

\*Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os valores.

Diferindo de Lima (2010), a inseminação artificial por via cervical atingiu, neste experimento, índices satisfatórios, tanto utilizando-se o diluidor a base de gema de ovo, quanto o ACP, merecendo destaque os altos índices encontrados na inseminação com sêmen rediluído em ACP.

Khalifa (2013), utilizando também um diluidor de origem vegetal, lecitina de soja, observou um máximo de 71% de taxa de prenhez, índice semelhante ao encontrado pelo presente trabalho, também utilizando inseminação cervical.

Nunes et al. (2006) não encontrou diferença entre os diluidores mas sim entre as técnicas. O presente trabalho não apresenta diferença entre as técnicas utilizadas, indicando uma ótima resposta dos animais tanto ao protocolo de sincronização de estro utilizado quanto à IA.

A diferença entre os resultados de Nunes et al. (2006), quanto à taxa de prenhez utilizando ACP, deve-se à modalidade de utilização do meio, baseado em sua capacidade superior de manutenção dos atributos seminais como motilidade e vigor, demonstrada por Nunes e Combarnous (1994) e Nunes (1997), os resultados demonstram que tal capacidade se estende às características fecundativas do sêmen descongelado e apontam ainda para uma capacidade de manutenção da viabilidade seminal no trato reprodutivo feminino maior que da gema de ovo, possibilitando que o espermatozoide chegue ao óvulo com melhores condições para que haja a fecundação.

### Conclusão

Segundo os dados obtidos neste trabalho, o ACP utilizado como rediluidor pós-descongelamento, demonstra não somente sua viabilidade como também índices de fertilidade superiores ao sêmen não rediluído.

Portanto, demonstra uma modalidade promissora de utilização em conjunto aos diluidores.

Contudo, mais estudos objetivando buscar a causa de tais resultados são necessários.

### Agradecimentos

Banco do Nordeste, Etene.

### Referências

**Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação seminal. Ed. 3, 2013.

**Khalifa T, Lymberopoulos A, Theodosiadou E.** Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*, Ed. 79, p. 517-527, 2013.

**Lima LF, Moura P, Passos PIB, Leal DR, Rumpf R, Neves JP.** Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ciênc Anim Bras*, v.11, p.835-844, 2010.

**Machado VP, Nunes JF, Araújo AA, Fernández DRP, Cordeiro MA, Medeiros CHN, Medeiros ALN, Monteiro AWU.** Fertilidade após a inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.43, suplemento, p.43-49, 2006.

**Nunes JF.** Utilização da água de coco como diluidor do sêmen caprino e ovino. *II Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução dos Animais Domésticos. Ciênc Anim*, v.7, n.2, p.62-69, 1997.



- Nunes JF, Combarous Y.** Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In 1º Simpósio de Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos. p.53-63, 1994.
- Oliveira MEF.** Técnicas de inseminação artificial em ovinos e caprinos. Acessado em 19 jun. 2009. Online. Disponível em: [http://www.farmpoint.com.br/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos\\_noticia\\_52391\\_3\\_30\\_.aspx](http://www.farmpoint.com.br/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos_noticia_52391_3_30_.aspx).
- Salgueiro CCM, Nunes JF.** Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. *Ciência Animal*, v.22, n.1, p.20-32, 2012.



## **Histometria dos túbulos seminíferos em testículos de ovinos Santa Inês e mestiços Santa Inês e Dorper**

*Histometry of seminiferous tubules in testes of ovine Santa Ines and mongrel Santa Inês and Dorper*

**Isac Gabriel Cunha dos Santos\*, Jean Rodrigues Carvalho, Paulo Gonçalves Mariano Filho, Azimiro Quirino de Oliveira Neto, Antônio Francisco Lisboa da Silva Neto, Morgana Santos Araújo, Felicianna Clara Fonseca Machado, Antônio Augusto Machado Nascimento Junior**

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: isacgabrielsc@gmail.com

### **Abstract**

*The morphometric measurements of the testicles is intended to measure the dimensions of constituent testis parenchyma quantitatively evaluating spermatogenesis. This study aimed to analyze the spermatogenesis of sheep Santa Ines and crossbred Santa Ines and Dorper watching the racial crossing alter testis function. We used eight sheep, four Santa Ines and four crossbreed of Santa Ines/Dorper. After castration the animals gave the Gonadosomatic index. Gauged to volume ratio of testis compartments using a reticle. The constituents of the tubular casing were evaluated: Lamina propria, seminiferous epithelium of the lumen and interstitial compartment constituents: Leydig cells, blood vessels and connective tissue. Only the tubular diameter and height of the seminiferous epithelium showed significant differences, being higher for sheep Santa Ines. It was concluded that there was little difference in testicular morphometry of animals studied and it was found that the racial cross does not induce significant changes in parameters between groups.*

**Keywords:** spermatogenesis, sheep, morphometry.

**Palavras-chave:** espermatogênese, ovinos, morfometria.

### **Introdução**

A produção de ovinos é de extrema importância econômica e social para o Nordeste brasileiro (Barros et al., 2003), pois além de representar uma atividade de grande importância cultural, é muito importante para o desenvolvimento econômico da região (Costa et al., 2008). Dessa forma, a reprodução deve ganhar atenção especial, pois corresponde a um dos fatores relacionados com a produção animal. A produção de gametas masculinos, denominada espermatogênese, ocorre nos túbulos seminíferos, sendo que na maioria das espécies já pesquisadas, o parênquima testicular mostra-se composto principalmente pelos túbulos seminífero (França e Russell, 1998). As medidas morfométricas dos testículos tem o objetivo de aferir as dimensões dos componentes que constituem o parênquima testicular, avaliando quantitativamente a produção espermática. As medidas do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero oferecem importante subsídio para a estimativa da qualidade espermatogênica e são de grande relevância para avaliação andrológica e escolha de reprodutores (Berndston, 1977; Russel et al., 1990; Oba 1993). Considerando estes fatores, e tendo em vista o valor econômico que a produção de ovinos representa, objetivou-se analisar a espermatogênese entre as raças ovinas Santa Inês (SI) e mestiços de Santa Inês e Dorper (MSID) procurando observar se o cruzamento racial produz alteração na função testicular.

### **Material e Métodos**

Foram utilizados oito ovinos da raça Santa Inês e oito mestiços de Santa Inês/Dorper. Foram confinados no aprisco da Universidade Federal do Piauí, do campus professora Cinobelina Elvas. Os animais foram pesados, castrados e após o procedimento cirúrgico se obteve o peso dos testículos para obtenção do Índice Gonadosomático (IGS), que corresponde ao peso do testículo dividido pelo peso corporal. Os testículos foram seccionados e os fragmentos fixados em solução de Bouin sob refrigeração de 8°C por um período de 24 horas. A estimativa das proporções volumétricas dos compartimentos testiculares foi obtida utilizando-se um retículo com 441 intersecções em aumento de 400x (Elias et al. 1971). Foram analisados 20 campos sequenciados por lâmina, totalizando 8820 pontos, sendo analisados os constituintes do compartimento tubular: Lâmina própria, epitélio seminífero e lúmen e os constituintes do compartimento intersticial: células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram obtidos por meio da análise de 30 secções transversais de túbulos seminíferos, com contorno o mais circular possível, em aumento de 400x, por lâmina. Após obtenção dos dados, estes foram submetidos à análise de variância para um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste Student- Newman-Keuls (SNK), a um nível de significância de 5%.

### **Resultados e Discussão**

Os resultados referentes à morfometria testicular em ovinos SI e MSID encontram-se expressos na tabela 1. Todos os parâmetros analisados não expressaram diferenças estatísticas entre os grupos, com exceção do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero que mostraram os maiores valores para o grupo de carneiros SI. O valor encontrado para o compartimento tubular encontra-se em conformidade com a literatura, que aponta como sendo desejável para mamíferos, valores em torno de 70 a 90 % do parênquima testicular em mamíferos (França e Russell, 1998). Entre os componentes tubulares, o que ocupava maior espaço foi o epitélio seminífero,



sendo os valores encontrados inferiores aos encontrados em ovinos por Santos et. al., (2015) (78,32% no período seco e 80,13% no período chuvoso). A temperatura e umidade do ambiente, podem em conjunto comprometer a estrutura testicular dos animais dependendo da magnitude da interação e amplitude de cada um desses fatores (Machado Júnior et al.2009). Nos componentes do compartimento intersticial, o de maior densidade foi o tecido conectivo, corroborando com os achados em ovinos SRD no período seco do ano (Santos et. al., 2015). Com relação ao diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero observou-se diferença entre as raças mostrando esses valores maiores para os SI em relação ao MSID. A literatura mostra que analisando a altura do epitélio seminífero podemos julgar a funcionalidade do epitélio (França; Russel, 1998). Este estudo mostra que os valores encontrados foram superiores aos citados para ovinos Santa Inês (McMANUS et al., 2010) e SRD (Santos et al., 2015). Com relação às diferenças no diâmetro tubular, Paula et. al. (2002), observaram que estas variações têm uma afinidade com o valor numérico de células mióides peritubulares, que circundam a túnica própria, e também a dimensão e a população das células da linhagem germinativas e células de Sertoli, tal como o fluido secretado por estas últimas no lúmen do túbulo seminífero.

Tabela 1. Média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros relacionados à morfometria testicular de carneiros da raça Santa Inês (SI) e mestiços de Santa Inês e Dorper (MSID).

	Mestiços SI/DO	Santa Inês
Peso corporal (Kg)	50,25 $\pm$ 2,06 <sup>a</sup>	48,50 $\pm$ 9,88 <sup>a</sup>
Peso testicular (g)	130,86 $\pm$ 39,60 <sup>a</sup>	142,83 $\pm$ 60,41 <sup>a</sup>
Índice Gonadossomático (%)	0,26 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
Volume dos compartimentos testiculares (%)		
Tubular	77,02 $\pm$ 17,58 <sup>a</sup>	76,61 $\pm$ 18,74 <sup>a</sup>
Lâmina própria	10,95 $\pm$ 5,33 <sup>a</sup>	10,90 $\pm$ 5,48 <sup>a</sup>
Epitélio Seminífero	53,65 $\pm$ 13,96 <sup>a</sup>	54,62 $\pm$ 14,05 <sup>a</sup>
Lúmen	17,96 $\pm$ 10,12 <sup>a</sup>	16,86 $\pm$ 9,44 <sup>a</sup>
Intersticial	25,88 $\pm$ 20,47 <sup>a</sup>	25,94 $\pm$ 21,08 <sup>a</sup>
Células de Leydig	4,61 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	4,61 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>
Tecido conectivo	24,16 $\pm$ 18,97 <sup>a</sup>	23,49 $\pm$ 19,17 <sup>a</sup>
Vasos Testiculares	4,98 $\pm$ 3,96 <sup>a</sup>	4,97 $\pm$ 4,33 <sup>a</sup>
Diâmetro Tubular ( $\mu$ m)	173,12 $\pm$ 29,09 <sup>b</sup>	185,71 $\pm$ 29,73 <sup>a</sup>
Altura do epitélio seminífero ( $\mu$ m)	52,29 $\pm$ 9,98 <sup>b</sup>	56,68 $\pm$ 11,25 <sup>a</sup>

\*<sup>a</sup>,<sup>b</sup> Letras diferentes P < 0,05 entre os ovinos da raça SI e MSID pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK).

## Conclusão

Conclui-se que mesmo havendo pouca diferença na morfometria testicular dos animais estudados, constatou-se que o cruzamento racial não induz expressivas alterações dos parâmetros testiculares entre os grupos estudados.

## Referências

- Barros NN, Vasconcelos VR, Araújo MRA, Martins EC.** Influência do grupo genético e da alimentação sobre o desempenho de cordeiros em confinamento. *Pesq Agropec Bras*, v.38, p.1111-1116, 2003.
- Berndston W.** Methods for Quantifying Mammalian Spermatogenesis: a Review. *J Anim Sci*, v.44, p.818-833. 1997.
- Costa RG, Almeida CC, Pimenta Filho EC, Holanda Junior EV, SANTOS NM.** Caracterização do Sistema de Produção Caprino e Ovino na região Semi-árida do Estado da Paraíba, Brasil. *Arch Zootec*, v.57, p.195-205, 2008.
- Elias H, Hennig A, Schwartz DE.** Stereology applications to biomedical research. *Physiological Rev*, v.51, p.158-200, 1971.
- França LR, Russel LD.** The testis of domestic animals. In: Regadera J e Martinez-Garcia (eds.). *Male reproducton. A multidisciplinar overview.* Churchill Livingstone, Madrid. pp.197-219.
- Machado Júnior AAN, Miglino MA, Meneses DJA, Assis Neto AC, Leiser, R, Silva RAB, Carvalho, MAM.** Influence of the bipartite scrotum on the testicular and scrotal temperatures in goats. *Pesq Vet Bras*, v.29, p.797-802, 2009.
- Mcmanus C, Bastos Sasak LC, Louvandin H, Dias LT, Teixeira RA, Alves JM, Lucci CM, Marsiaj PHP, Luci Sayori Murata LS.** Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. *Ciênc Rural*, v.40, p.396-402, 2010.
- OBA E.** Tópicos atualizados ligados a reprodução na espécie bubalina. In: Sanidade e produtividade em Búfalos. Ed. Por Juan Molero Filho e col. Jaboticabal, FUNEP, 202p. 1993. Paula TAR, Costa DS e Matta SLP. 2002. Avaliação Histológica Quantitativa dos Testículos de Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) Adultas *Biosc J*, v.18, p.121-136.
- Santos JDF, Eufrazio RO, Pinheiro GFM, Alves FR, Carvalho MAM, Machado Júnior AAN.** Influência da estação do ano do ano sobre a estrutura testicular em ovinos criados no sul do Estado do Piauí. *Pesq Vet Bras*, v.35, p.933-939.2015.



## Importância do período de parto de cabras dentro da estação de nascimentos

*Importance of the parturition period of goats inside birth season*

Dayse Andrade Barros<sup>1</sup>\*, Francisco Felipe Ferreira Soares<sup>3</sup>, Esequiel José Leal<sup>2</sup>, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1</sup>, Sávio Ruan Sampaio de Sousa<sup>1</sup>, Júlia Caroline Paz dos Santos<sup>4</sup>, Daniel Serefim de Andrade Rodrigues<sup>2</sup>, José Elivalto Guimarães Campelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), UFPI, Teresina, PI, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal (LFRA), UFPI, Teresina-PI; <sup>4</sup>Clínica de Grandes Animais (CGA), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: dyse\_andrad@hotmail.com

### Abstract

*In Northeast of Brazil the time of mating and calving of the matrices are determining factors in the herd productivity. This research analyzed in Anglonubiano breed the importance of birth order within the birth station in the herd, with the goat characteristics and the development of the offspring to weaning. The goats were divided into two groups, in a way that when a group of matrices were in breeding season, in the other group it has already occurred. A database containing information such as goats age, birth interval and the previous (month), OPG, body Score, FAMACHA and fortnightly creates weights (until weaning) was used to statistical analyzes, that were regression of these characteristics measured in mothers and creates development. It was concluded that older goats tend to calve early in the calving season and young goats tend to present better weight gain.*

**Keywords:** caprine, female, reproduction.

**Palavras chaves:** caprino, fêmea, reprodução.

### Introdução

A reprodução é complexa e dificulta a seleção direta, sendo mais eficiente buscar indicadores indiretos da atividade reprodutiva fáceis de mensurar (Bergman, 2008), como idade ao primeiro parto e intervalo de partos. A eficiência da produção animal é determinada por eventos produtivos e reprodutivos inerentes às fêmeas (Sarmiento et al., 2010). Segundo Rege e Famula (1993), fêmeas cujos partos ocorrem cedo dentro da estação de parição são mais eficientes biológica e economicamente. Em bovinos Nelore, os animais que nasceram mais cedo dentro da estação de parição obtiveram os melhores escores visuais de conformação, precocidade e musculatura (Jorge Júnior et al., 2001).

Em caprinos, a data do parto não tem recebido muita atenção. É definida por Ponzoni (1992) como o número de dias entre o início da estação de monta que ocorreu a concepção e a data do parto. Todavia, no Nordeste a cobrição das matrizes é fator determinante na produtividade, devendo coincidir a parição com disponibilidade de alimentos (Medeiros et al., 2004). Na perspectiva de que para otimizar a seleção deve se passar por índices de seleção incluindo a reprodução, o presente estudo objetivou analisar a influência da data do parto de cabras Anglonubiano dentro da estação de nascimento, sobre outras características da cabra e da cria.

### Metodologia

Na pesquisa utilizou-se informações do Banco de dados do rebanho caprino da raça Anglonubiano do Departamento de Zootecnia – CCA/UFPI localizado em Teresina (Latitude 5° 5' 20" sul e Longitude 42°48' 07" oeste), da estação de parição do ano de 2015.

O manejo reprodutivo ocorreu de forma integrada com o sanitário, com as cabras divididas em dois grupos, de forma que quando em um grupo as matrizes estavam em estação de monta, no outro grupo ocorriam os partos. No manejo sanitário adotou-se rotação de princípio ativo do vermífugo a cada ano e a aplicação de anti-helmíntico somente quando 10% do rebanho apresentava OPG superior a 1000, como recomenda Costa et al. (2011). Realizou-se também a sistematização de rotação de pastejo de acordo com o estágio fisiológico (matrizes lactantes pastando em piquetes separados das demais).

Do banco de dados do rebanho utilizou-se as seguintes características: idade da cabra (anos), Intervalo entre o parto de 2015 e o anterior (meses), OPG, Escore de condição corporal e Famacha da cabra (da gestação a desmama) realizada após 120 dias do parto, além da pesagem quinzenal da cria até a desmama.

Para avaliação estatística dos dados, procedeu-se uma análise de regressão dessas características mensuradas nas mães em função data que a cabra pariu na estação de nascimentos de 2015 (1ª a 5ª semana). O desenvolvimento da cria foi analisado pela regressão da ordem de nascimento na estação de monta (5 semanas) em função da idade da cria, para fêmeas separada dos machos.

### Resultados e Discussão

Observa-se na Figura 1 que as equações de regressão das características em função da data do parto (1ª a 5ª semana) dentro da estação de nascimentos do primeiro semestre de 2015, se ajustaram com R<sup>2</sup> elevado (próximo a 1) com polinômios de terceiro grau, com exceção do OPG na escala logarítmica, que apresentou valor de apenas 0,44.

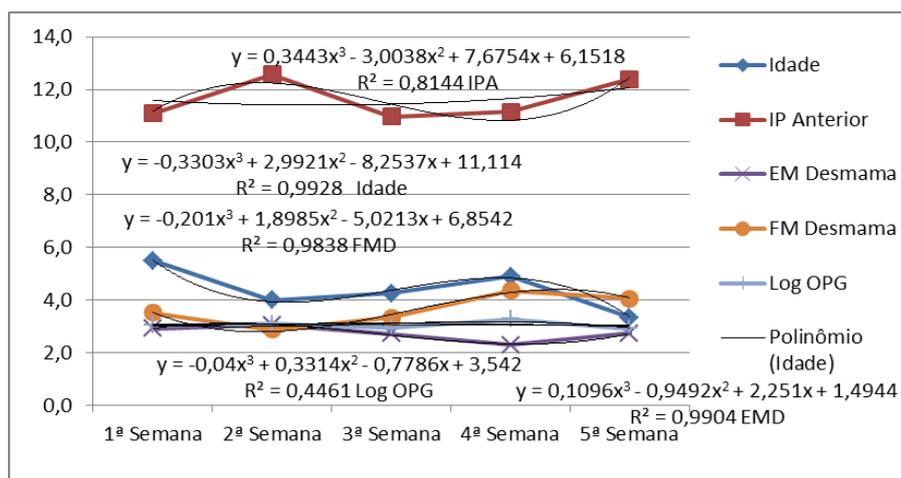


Figura 1. Curvas de regressão da idade, Intervalo do parto 2014 - 2015, Escore corporal e Famacha na desmama, Log OPG de cabras em função da data do parto (1ª a 5ª semana) na Estação de nascimentos do primeiro semestre de 2015, na raça Anglonubiana

O comportamento cúbico do intervalo do parto de 2014 ao de 2015 (IPA), em função da semana de ocorrência dos partos, apresentou picos opostos aos verificados na equação da idade da cabra, significando que alguns animais mais velhos tenderam a parir na primeira semana, mesmo aqueles que apresentaram menor intervalo do parto de 2014 ao de 2015. Na segunda semana, pariram cabras mais novas, porém apresentaram maior intervalo de parto, se comparada as cabras que pariram na terceira semana. Em síntese, observa-se uma tendência de a cabra mais velha ser fertilizada no início da estação de monta, independente do intervalo do parto de 2014 ao de 2015.

O valor baixo do  $R^2$  do OPG ajustado mostra que o parasitismo mensurado nas coletas, durante a gestação, não indica de forma clara se influenciou a data do parto da cabra (atraso ou antecipação). No entanto, a ocorrência de tolerância ao parasita é uma possibilidade, visto que é expressa somente por animais muito infectados (Bishop, 2012), fato este que foi verificado no rebanho, cujo valor médio de OPG foi superior a 1000.

A anemia na desmama, indicada pelo Famacha, tendeu a se relacionar com a idade da cabra, com maior anemia nas mais velhas, mas também nas que pariam na quarta semana da estação. Porém, a anemia pode ser consequência do efeito acumulativo da verminose do período chuvoso do ano.

Na Figura 02 estão apresentadas as equações de regressão do peso das crias fêmeas nascidas da primeira à quinta semana na estação de parto, do primeiro semestre de 2015.

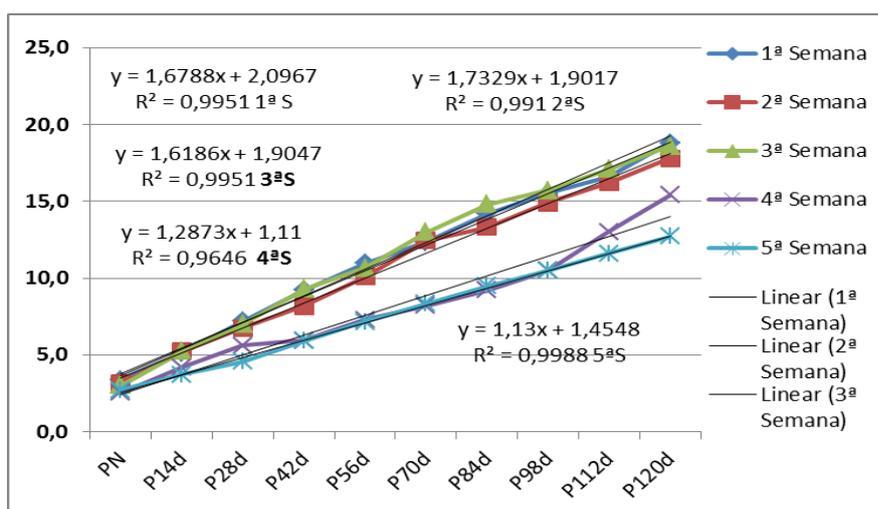


Figura 2. Equações da semana que a cria fêmea nasceu (1ª a 5ª) feita com a regressão do peso em função da idade da cria em dias (pesagem ao nascer-PN até na desmama - P120d).

Observa-se que as cinco semanas de nascimentos da cria dentro da estação de partos, se ajustaram com equações de primeiro grau com  $R^2$  superior a 0,95, sendo que as crias nascidas nas três primeiras semanas



tenderam a apresentar melhor desempenho ponderal até a desmama com quatro meses de idade. Portanto, uma vantagem da parição no início da estação é o maior número de crias na vida reprodutiva daquelas cabras que parem mais cedo (Bergman, 2008).

#### **Conclusões**

Cabras mais velhas tendem a parir no início da estação de partos e as crias tendem a apresentar melhor desempenho ponderal. O OPG não se relaciona de forma clara com a data do parto na estação. No Famacha observa-se essa relação, apresentando-se mais elevado nas cabras com partos no final da estação.

#### **Referência**

- Bergman JAG.** Índices zootécnicos para produção de bovinos de carne. Acesso em 20 de julho de 2016. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/2544331/Indices-zootecnicos-para-producao-de-bovinos-de-carne>, 2008.
- Bishop SC.** A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections. *Frontiers Livestock Genomics*, v.3, p.168, 2012.
- Jorge Júnior J, Pita FVC, Fries LA, Albuquerque LG.** Influência de Alguns Fatores de Ambiente sobre os Escores de Conformação, Precocidade e Musculatura à Desmama em um Rebanho da Raça Nelore. *Rev Bras Zootec*, v.30, p.1697-1703, 2001.
- Medeiros GR, Pimenta Filho EC, Sousa WH, Brito EA.** Peso à cobrição e ganho de peso durante a gestação de cabras nativas, exóticas e mestiças no semiárido. *Rev Bras Zootec*, v.33, n.6, p.1711-1720, 2004.
- Ponzoni RW.** Which trait for genetic improvement of beef cattle reproduction: calving rate or calving day. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v.10, n.2, p.119-128, 1992.
- Rege JEO, Famula TR.** Factors affecting calving date and its relationship with production traits of Hereford dams. *Animal Production*, v.57, n.3, p.385-395, 1993.
- Sarmento JLR, Pimenta Filho EC, Abreu UGP, Ribeiro MN, Sousa JER.** Prolificidade de caprinos mestiços leiteiros no semiárido nordestino. *Rev Bras Zootec*, v.39, n.7, p.1471-1476, 2010.



## Influência da concentração espermática sobre a Taxa de Fertilidade em Ovelhas Inseminadas com Sêmen congelado

*Influences of sperm concentration on Fertility Rate in Sheep inseminated with frozen semen*

Gustavo Henrique Chaves Martins<sup>1,\*</sup>, Allana Karolyne Figueiredo de Brito<sup>2</sup>, Kenney de Paiva Porfírio<sup>3</sup>, Misael das Virgens Santana<sup>2</sup>, Francisco Felipe Ferreira Soares<sup>2</sup>, Leticia Soares de Araujo Teixeira<sup>4</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>5</sup>, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Residente em reprodução animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>2</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>3</sup>Mestrando em ciência animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>4</sup>Médica veterinária, graduada pela Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>5</sup>Professor Dr. Adjunto da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: g.martins1330@gmail.com

### Abstract

*The experiment compared the pregnancy rates in sheep submitted to IA, to evaluate the influence of sperm concentration on fertility rate in sheep inseminated with frozen semen. In experiment run 37 females were used, subject to synchronization of estrus and divided into two groups: G1 (n = 19), using artificial insemination with a concentration of 200 million viable spermatozoa and G2 (n = 18), using artificial insemination is at a concentration of 100 million sperm. Pregnancy rates were 66.66% and 77.77% in sheep that were inseminated with the concentration 200 and 100 million sperm respectively transcervical and the sheep that have been inseminated by laparoscopy at the same concentrations as pregnancy rates were 50% and 77.77% respectively. The concentrations used have shown - is quite effective when compared pregnancy rates in each group. But needs more in vivo studies.*

**Keywords:** sperm concentration, pregnancy rates, inseminated sheep.

**Palavras-chave:** concentração espermática, taxas de prenhez, ovelhas inseminadas.

### Introdução

A inseminação artificial ovina em muitos países é realizada utilizando sêmen diluído fresco e resfriado a 4°C ou 15°C. Apesar dos bons índices de fertilidade alcançados tal método tem a desvantagem de não permitir que o sêmen seja utilizado em locais distantes devido ao reduzido tempo de conservação do sêmen (Chemineau et al., 1991). A utilização do sêmen congelado veio otimizar a inseminação artificial na espécie ovina possibilitando uma maior pressão de seleção e conseqüentemente aumentando a eficiência produtiva do rebanho superando as restrições impostas a sua utilização (Bicudo et al., 2005). O sucesso da congelação depende notavelmente da taxa de diluição do sêmen. D'Alessandro et al. (2001) observaram que a porcentagem de espermatozoides vivos após descongelação foi influenciada pela diluição espermática e a interação da concentração espermática e o diluidor. A determinação da concentração de espermatozoides móveis na palheta sem reduzir a fertilidade, influencia o número de inseminações cervicais e os índices de prenhez após inseminação artificial (Ritar e Ball, 1993). Nesse contexto procurou-se verificar a influencia da concentração de espermática sobre a taxa de prenhez de ovinos sem padrão racial definido após a inseminação artificial com sêmen ovino congelado.

### Material e Métodos

O projeto foi realizado na fazenda campina verde no município de Elesbão Veloso, localizado na mesorregião cento-norte do Piauí, que está situado na latitude: 06° 12' 07" S e longitude: 42° 08' 25" W, no período de 20/05/2016 a 04/06/2016. Foram utilizadas fêmeas sem padrão racial definido com escore corporal entre 2,5 a 3,0. Os animais foram avaliados clinicamente, vacinados, vermifugados e mantidas em pastagens cultivadas e nativas e recebendo sal mineral, para ovinos, à vontade.

O sêmen utilizado foi proveniente de dois reprodutores da raça Dorper, selecionado pelo padrão racial e características fenotípicas, avaliados por exame andrológico, conforme padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013) e pelo registro de fertilidade comprovada. O sêmen coletado com auxílio de vagina artificial, avaliado e diluído no diluidor e crioprotetor Tris gema glicerol na concentração de 100 e 200 milhões de espermatozoides/ml. Posteriormente, foram armazenadas em palhetas (0,25mL) e congeladas em máquina TK 3000<sup>(r)</sup> (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), 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 atingirem -120°C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). O transporte até a propriedade, feito no botijão de nitrogênio líquido, os quais as doses estavam congeladas.

Como protocolo de sincronização do estro: inseridas esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de medroxiprogesterona – MAP (Progespon®), por um período de 12 dias. No decimo segundo dia de tratamento



retirou-se as esponjas e imediatamente os animais receberam 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina - eCG (Novormon®). Após 56 horas da sincronização do cio, as 37 ovelhas, foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: G1 (n=19) inseminadas, cada animal, com uma concentração 200 milhões de espermatozoides viáveis, sendo que 9 ovelhas foram inseminadas por via transcervical e 10 por laparoscopia. E o grupo G2 (n=18) foram inseminadas, com uma concentração de 100 milhões de espermatozoides viáveis, utilizando 9 animais por inseminação transcervical com pistola Walmur® e 9 por laparoscopia.

Para o diagnóstico gestacional utilizou-se aparelho de ultra-sonografia (U.S.) equipado de transdutor linear rígido 7,5 MHz trans-retal, realizado sessenta e oito dias após a inseminação artificial em ambos os grupos.

### Resultados e Discussão

Os resultados das taxas de prenhez com as diferentes concentrações espermáticas utilizando duas técnicas de inseminação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de prenhez em diferentes concentrações de espermatozoides por dose, em diferentes métodos de inseminação em ovelhas mestiças, submetidas à IATF.

Concentração x (10 <sup>6</sup> )	Intra cervical	Laparoscopia
200	6/9 (66,66%)	5/10 (50%)
100	7/9 (77,77%)	7/9 (77,77%)
Total	13/18 (72,22)	12/19 (63,15%)

O grupo um (G1) que foram inseminadas com uma concentração de 200 milhões de espermatozoides, utilizando a técnica de inseminação artificial transcervical com pistola walmur® e via laparoscopia obteve-se uma taxa de prenhez de 66,6% e 50% respectivamente. No grupo dois (G2), as ovelhas que foram inseminadas com uma concentração de 100 milhões de espermatozoides, obteve-se uma taxa de prenhez de 77,77%. utilizando a técnica de inseminação artificial transcervical com pistola walmur® e via laparoscopia.

No trabalho realizado por D'Alessandro et al. (2001) onde criopreservaram semem ovino em diferentes concentrações espermáticas e avaliaram a fertilidade *in vivo* e após os nascimentos dos cordeiros derivados de um programa de IA laparoscópica. Doses com altíssimas concentrações de células espermáticas (200 milhões de espermatozoides/0,25 ml) afetaram negativamente a fertilidade *in vitro* do sêmen, e as concentrações 20, 40, e 80 espermatozoides/dose não diferiram estatisticamente nas taxas de prenhez.

As taxas de gestação encontradas no presente trabalho, foi de 66,66% das ovelhas que foram inseminadas com 200 milhões de espermatozoides e 77,77% das inseminadas com 100 milhões de espermatozoides, quando comparando a técnica de inseminação intra cervical, utilizando a pistola walmur®. As taxas de gestações por laparoscopia com concentração espermática de 100 milhões, obteve-se 77,77% de prenhes. Na concentração de 200 milhões de espermatozoides observou-se apenas 50% de prenhes, esses valores não diferiram muito dos encontrados por Silva (2013) que mostra em seu trabalho que a redução da concentração espermática de 80 para 40 e 20 milhões de espermatozoides totais por dose inseminante não altera a fertilidade das ovelhas. Assim os resultados encontrados por Silva (2013), corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho.

### Considerações Finais

As concentrações de 100 e 200 milhões de espermatozoides foram bastante efetivas quando comparadas as taxas de prenhez em cada grupo experimental. Porém ainda necessita de mais estudos *in vivo*.

### Referências

- Bicudo SD, Azevedo HC, Silva Maia MS, Sousa DB, Rodello L.** Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Veterinariae*, v.33, p.127-130, 2005.
- Chemineau P, Cagnié Y.** Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO. Animal Production and Health Paper 83, Roma, 1991.
- D'Alessandro AGD, Martemucci G, Colonna MA, Bellitti A.** Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, v.55, p.1159-1170, 2001.
- Ritar AJ, Ball PD.** The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Anim Reprod Sci*, v.31, p.249-262, 1993.



## Influência da mudança das fases da lua nos tipos de partos de ovelhas deslanadas

*Change the influence of the phases of the moon in the types of delivery woolless sheep*

Cássia Batista Silva<sup>1</sup>\*, Ingrid Vilmara Pereira de Sousa<sup>1</sup>, Idelfrâncio Cavalcante da Costa<sup>1</sup>, Glaucia Brandão Fagundes<sup>2</sup>, Marcela Ribeiro Santiago<sup>2</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>3</sup>, Mônica Arrivabene<sup>4</sup>, Tânia Vasconcelos Cavalcante<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduandos pela Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>2</sup>Mestranda em Zootecnia pela Universidade Federal do Piauí (UFPI);

<sup>3</sup>Docente do Colégio Técnico de Teresina (CTT); <sup>4</sup>Docente do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV).

\*E-mail: isacassia@hotmail.com

### Abstract

*The aim of this study was to evaluate the influence of lunar phases in Dorper sheep, according to the proportion of births (single: double). Twenty were used two sheep from a breeding season. For the evaluation of lunar phases sheep were grouped proportionally according to the type of delivery (single: double). The analysis of the types of delivery were obtained according to the moon phases in place by the Brazilian National Observatory, being considered corresponding to the lunar phase where the maximum headquarters was up to two days before and after the date of interest after being compared by the test chi-square test ( $P < 0.05$ ). It was found that there was a greater proportion of births in the crescent moon ( $P < 0.05$ ) compared to other lunar phases. The conclusion of this research that the crescent moon of the lunar phases, seems to affect the types of delivery of Dorper sheep.*

**Keywords:** moon, delivery, sheep.

**Palavras-chave:** lua, parto, ovelhas.

### Introdução

Embora os ritmos sazonais e circadianos tenham sido muito bem descritos, pouco se sabe sobre a influencia do ciclo lunar sobre os aspectos voltados á reprodução animal. No entanto, estudos que envolve essas mudanças lunares ainda são escassas para espécie ovina, bem como não foi verificado como esta poderia afetar no tipo de parto de ovelhas. Segundo Palacios et al. (2014), a lua pode afetar a produção de cordeiro após a IA em ovelhas através de mudanças nas taxas de fertilidade em todo suas diferentes fases. Dessa forma, o estudo relacionando as mudanças das fases lunares quanto ao tipo de parto seria considerada um método simples e efetivo para mercado pecuarista. Nesse contexto, objetivou-se, elucidar se há evidência de periodicidade lunar em ovinos e como esta poderia influencia quanto ao tipo de parto.

### Material e Métodos

Foram utilizadas vinte e duas ovelhas, proveniente de uma estação de monta. Os diferentes tipos de parto (simples e duplo) da raça Dorper foram observados em *duas localidades* no Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina, Piauí (n=10) e na Fazenda Rebanho Paraíso no município de Belo Jardim, Pernambuco com (n=12) animais. As análises da incidência do parto, de acordo com as fases da lua foram obtidos a partir de um observatório nacional brasileiro. Para a determinação das fases lunares (nova, crescente cheia e minguante), a cada dia de interesse do parto será considerada como correspondente à fase lunar cujo ponto máximo distava em até dois dias antes e após a data de interesse. Durante o período experimental foram feitas as observação e anotações considerando cada uma das quatro fases do ciclo lunar (nova, crescente, cheia e minguante), em que os animais eram distribuídos e agrupados proporcionalmente quanto ao tipo de parto (simples e duplo); para serem posteriormente comparados pelo teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Os valores obtidos foram submetidos a análise estatística pelo programa computacional SAS (Statistical Analysis System) para análise de variância.

### Resultados e Discussão

A Tabela 1, apresenta a comparação das incidências de tipos de parto (simples:duplo), segundo as diferentes fases do ciclo lunar. Ao se analisar o efeito da incidência dos tipos de parto verificou-se uma maior proporção de simples:duplo na lua crescente ( $P < 0,05$ ) em comparação as outras fases lunares. As proporções simples:duplo das fêmeas paridas nas outras fases foram semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1. Incidência dos tipos de nascimento (simples e duplo) em cordeiros, de acordo com as fases da lua (estações reprodutivas outubro-novembro-dezembro/2015, abril/2016).

Fases da lua	Simples:duplo
Nova	0,75 (3:4)a
Crescente	5 (10:2)b
Cheia	1,3 (3:4)a
Minguante	0 (0:2)a

Houve diferença entre tratamentos ( $P > 0,05$ ) pelo teste qui-quadrado.



Neste mesmo estudo Marinho et al. (2015) constataram que, não houve diferenças entre fases lunares ( $P > 0,05$ ) na incidência de partos de acordo com a fase da lua; discordando, com os resultados deste estudo. Sendo, portanto, necessária mais investigação para esclarecer tais diferenças.

Os resultados deste estudo, portanto, tem implicações importantes para a reprodução dos ovinos, que está em ascensão no semi-árido-nordestino como em todo o mundo.

### **Conclusão**

A lua crescente das fases lunares parece afetar os tipos de partos de ovelhas da raça Dorper.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Dona Odete e seu Pedro, bem como o Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina pela concessão dos animais e pela contribuição para a realização do trabalho.

### **Referências**

**Marinho EN, França FC, Santos GS, Barbosa DHF, Filho JS, Palhares EP, Lopes WS, Viana LMG, Esquarcio Valle GR.** O ciclo lunar influencia diferentemente o momento do parto de éguas de acordo com o sexo do potro. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, n.2, p.296-300, 2015.

**Palacios C, Abecia JA.** Does lunar cycle affect lamb production after artificial insemination in sheep?. *Biological Rhythm Research*, v.45, n.6, p.869-873, 2014.



## Influência do ciclo lunar na determinação do sexo de cordeiros

*Influence of lunar cycle in the parturition of the Dorper sheep breed*

Ingrid Vilmara Pereira de Sousa<sup>1,\*</sup>, Cássia Batista da Silva<sup>1</sup>, Idelfrâncio Cavalcante da Costa<sup>1</sup>,  
Gláucia Brandão Fagundes<sup>2</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>3</sup>, Mônica Arrivabene<sup>4</sup>, Willames Costa Neves<sup>5</sup>,  
Tânia Vasconcelos Cavalcante<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduandos pela Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>2</sup>Mestranda em Zootecnia pela Universidade Federal do Piauí (UFPI); <sup>3</sup>Docente do Colégio Técnico de Teresina (CTT); <sup>4</sup>Docente do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV); <sup>5</sup>Docente do Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV).

\*E-mail: ingridvilmara19@outlook.com

### Abstract

*The aim of this study was to evaluate the influence of lunar phases in Dorper sheep, according to the proportion of births (single: double). Twenty were used two sheep from a breeding season. For the evaluation of lunar phases sheep were grouped proportionally according to the type of delivery (single: double). The analysis of the types of delivery were obtained according to the moon phases in place by the Brazilian National Observatory, being considered corresponding to the lunar phase where the maximum headquarters was up to two days before and after the date of interest after being compared by the test chi-square test ( $P < 0.05$ ). It was found that there was a greater proportion of births in the crescent moon ( $P < 0.05$ ) compared to other lunar phases. The conclusion of this research that the crescent moon of the lunar phases, seems to affect the types of delivery of Dorper sheep.*

**Keywords:** lunar cycle; sex; lambs.

**Palavras-chave:** ciclo lunar; sexo; cordeiros.

### Introdução

Acredita-se que o ciclo lunar influencie nas atividades humanas e animais, bem como, em processos fisiológicos e de comportamento (Moretti, 2008); no entanto, não há nenhuma evidência convincente de que a fase lunar possa determinar o sexo de cordeiros. Portanto, a fase de lua, que afeta os níveis de luz no ambiente durante a noite, pode ter uma influência forte sobre a determinação do sexo de cordeiros. A adoção do ciclo lunar, visando identificar as proporções sexuais dos neonatos, pode ser uma alternativa interessante para o mercado pecuário. Assim, objetivou-se observar e identificar as fases da lua nesta espécie, para avaliação das proporções sexuais de cordeiros no período de parturição.

### Material e métodos

Foram utilizados vinte e três cordeiros recém-nascidos de duas localidades no Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina, Piauí (n=10) e na Fazenda Rebanho Paraíso no município de Belo Jardim, Pernambuco com (n=12) animais, proveniente de uma estação de monta. As análises da incidência do parto, de acordo com as fases da lua foram obtidas a partir de um observatório nacional brasileiro. Para a determinação das fases lunares (nova, crescente cheia e minguante), a cada dia de interesse do parto será considerada como correspondente à fase lunar cujo ponto máximo distava em até dois dias antes e após a data de interesse. Durante o período experimental foram feitas as observação e anotações considerando cada uma das quatro fases do ciclo lunar (nova, crescente, cheia e minguante), em que os animais eram distribuídos e agrupados proporcionalmente quanto ao sexo (macho:fêmea); para serem posteriormente comparados pelo teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Os valores obtidos foram submetidos a análise estatística pelo programa computacional SAS (Statistical Analysis System) para análise de variância.

### Resultados e Discussão

Na Tabela 1, encontra-se os valores referentes à comparação aos fatores sexuais (macho:fêmea) ao parto, em função das fases lunares. Observa-se que nos fatores sexuais (macho:fêmea) não foram detectadas diferenças entre as fases lunares ( $P > 0,05$ ). Entretanto, não foi encontrada na literatura estudos para a espécie ovina voltada a fase lunar que pudessem ser usados com fins de referência e comparação para este estudo. Marinho et al. (2015), estudando o ciclo lunar e, como esta influência nos fatores sexuais de éguas, observaram uma maior incidência de nascimento de machos na lua minguante em comparação com as luas nova e crescente; resultados, que são contraditórios aos observados neste estudo. Segundo Bueno (2010) os efeitos da lua sobre os fatores sexuais se deve a credices populares. Rotton; Kelly (1985) suspeitam que a crença popular nesses mitos seja em decorrência de quatro fatores: efeitos da mídia, folclore e tradição, concepções errôneas e vícios cognitivos.



Tabela 1. Proporção macho: fêmea de cordeiros ao nascer, de acordo com as fases da lua ao nascer (outubro-novembro-dezembro/2015, abril/2016). Teresina – PI e Belo Jardim – PE, 2016.

Fases da lua	Proporção macho: fêmea
Nova	0,0 (2:0) <sup>a</sup>
Crescente	1,1 (6:6) <sup>a</sup>
Cheia	0,4 (2:5) <sup>a</sup>
Minguante	1 (1:1) <sup>a</sup>

Não houve diferença entre tratamentos ( $P > 0,05$ ) pelo teste qui-quadrado.

### Conclusão

O ciclo lunar não influencia na determinação do sexo de cordeiros.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Dona Odete e seu Pedro, bem como o Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina pela concessão dos animais e pela contribuição para a realização do trabalho.

### Referências

- Bueno A, Iessi IL, Damasceno DC.** Influência do ciclo lunar no parto: mito ou constatação científica?. Revista Brasileira de Enfermagem, v.63, n.3, p.477-479, 2010.
- Marinho EN, França FC, Santos GS, Barbosa DHF, Filho JS, Palhares EP, Lopes WS, Viana LMG, Esquarcio VGRO.** Ciclo lunar influencia diferentemente o momento do parto de éguas de acordo com o sexo do potro. Rev Bras Reprod Anim, v.39, p.296-300, 2015.
- Moretti E.** Do lunar phases influence semen parameters. JAS, v.15, p.158-63, 2008.
- Rotton J, Kelly IW.** A scale for assessing belief in lunar effects: reliability and concurrent validity. Psychological Reports, v. 57, n. 1, p. 239-245, 1985.



## **Influência do nível de infestação parasitária da cabra sobre o desempenho da cria durante a fase de lactação**

*Parasitic infestation level of influence of goat on the performance of the offspring during lactation phase*

**Esequiel José Leal<sup>1</sup>\*, Dayse Andrade Barros<sup>2</sup>, Francisco Felipe Ferreira Soares<sup>3</sup>, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>2</sup>, Júlia Caroline Paz dos Santos<sup>4</sup>, Alcir Martins Pereira<sup>4</sup>, Maykon Martins dos Santos<sup>5</sup>, José Elivalto Guimarães Campelo<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Nutrição Animal (LANA), UFPI, Teresina, PI; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), UFPI, Teresina, PI; <sup>3</sup>Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal (LFRA), UFPI, Teresina, PI; <sup>4</sup>Clínica de Grandes Animais (CGA), UFPI, Teresina, PI; <sup>5</sup>Departamento de Zootecnia, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: esequieljleal@gmail.com

### **Abstract**

*In goat gastrointestinal parasitism is a major limitation of production. In this perspective analyzed to characterize the phenotypic variability of gastrointestinal parasitism resistance and associated with productive and reproductive performance of the arrays. The goats were divided into two groups, where in a goats were lactating and the other in the breeding season, which was made measurements according to the physiological stage of the goats. It was concluded that the herd is presented with continuous infestation by worms in the study period and no group stood out from the others in the analyzed characteristics.*

**Keywords:** goat breeding, matrixes, parasitism.

**Palavras-chave:** caprinocultura, matrizes, parasitismo.

### **Introdução**

Os caprinos localmente adaptados são capazes de apresentar habilidade de convivência com o ambiente, porém apresentam limitações de produção, principalmente em razão do alto nível de infecção por nematóides gastrintestinais (Molento et al., 2004).

De acordo com Cardellino (2003), os criadores devem incluir seleção de animais com resistência a infecção por nematóides gastrintestinais nos rebanhos. A suscetibilidade ao parasitismo é consequência da variabilidade genética entre os indivíduos, variando entre animais mais sensíveis e outros mais resistentes (Nunes et al., 2007). Com base no contexto, fica clara a importância de se conhecer bem os fatores que podem interferir na resposta dos animais e relação à expressão de resistência a verminose, na qual será possível avaliar geneticamente os animais envolvidos em programas de melhoramento genético com precisão.

Nessa perspectiva, objetivou-se caracterizar a variabilidade fenotípica de resistência a parasitismo gastrintestinal em caprinos e, associada a desempenho produtivo e reprodutivo das matrizes, desta forma, introduzindo critérios eficientes para incluir a resistência a nematoides gastrintestinais no processo de reposição de matrizes a níveis de rebanho.

### **Metodologia**

A pesquisa foi desenvolvida com coletas de informações de características de sanidade, produção e reprodução para incorporação ao Banco de dados do rebanho caprino da raça Anglonubiana do Departamento de Zootecnia - CCA/UFPI, localizado em Teresina (Latitude 5° 5' 20" sul e Longitude 42°48' 07" oeste). No qual vem sendo monitorado quanto a resposta das matrizes a verminose, através do exame de OPG (ovos por grama de fezes), escore da condição corporal, Grau de anemia (Método Famacha©) e características de desempenho ponderal, desde 2009. O manejo reprodutivo foi feito de forma integrada com o sanitário, as cabras foram divididas em dois grupos, de forma em que um ocorria lactação, e em outro as cabras estavam em estação de monta, resultando, portanto, em repetição de grupos de animais contemporâneos em relação a estágio fisiológico dentro do mesmo ano e da mesma época (seca ou chuvosa).

As informações de peso corporal foram coletadas sistematicamente como prática de manejo reprodutivo, com mensurações segundo o estágio fisiológica da cabra, ou seja, uma vez na gestação, na lactação e quando está vazia. Também se editou no Excel, o banco de dados do rebanho mantendo cinco grupos de cabras meias-irmãs paterna, nas quais se analisou por regressão o OPG transformado na escala Log na base 10, o grau de anemia da cabra indicado pelo Famacha e o peso da cria ao nascer, no período de 2009 a 2015.

### **Resultados e Discussão**

Na Figura 1 observa-se que polinômios de terceiro grau foram os de melhor ajuste para o  $\text{Log}_{10}\text{OPG}$ , mas com  $R^2$  apenas entre 0,32 a 0,35. Pela análise visual do comportamento senoidal dessa característica ao longo do período observa-se que as cristas superiores parecem não coincidir com o período chuvoso do ano, portanto não se verificando benefício do período seco do ano na região como forma de controle de verminose, como preconizado na literatura. O uso de pastagens irrigadas no período seco do ano se apresenta como explicação para essa infestação contínua do rebanho durante o ano (Silva, 2012).

Observou-se na Figura 2 também que o escore das cabras no período avaliado tendeu a aumentar paralelamente à redução do grau de anemia, com o grupo de meias-irmãs filhas do reprodutor 2 apresentando

escore mais baixo. Esse comportamento se justifica como decorrente de infecção por *Haemonchus contortus*.

Similarmente ao que ocorreu com o comportamento do OPG, observado na Fig.3, onde os polinômios de terceiro grau foram os de melhor ajuste para o  $\text{Log}_{10}\text{OPG}$ , mas com  $R^2$  baixo entre 0,19 a 0,57. Pela análise visual do comportamento senoidal dessa característica ao longo do período observa-se as filhas do reprodutor 2 tenderam a se destacar, mesmo sendo as que apresentaram valores do Famacha mais elevados.

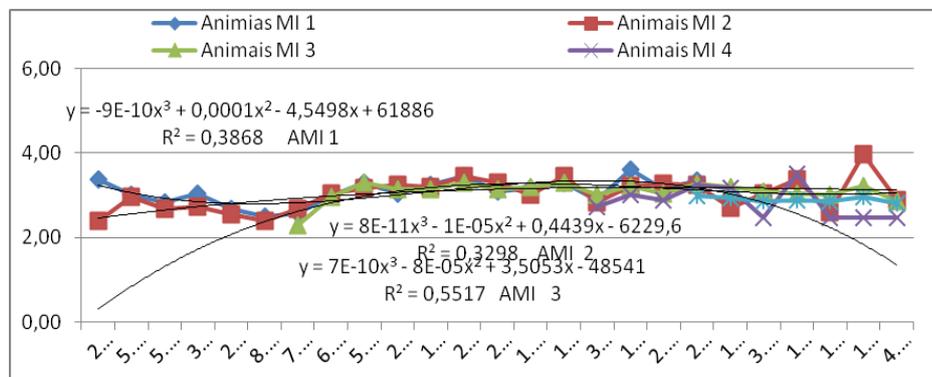


Figura 1. Equações de regressão do  $\text{Log}_{10}\text{OPG}$  de cinco grupos de cabras da raça Anglonubiana meias-irmãs paterna, em função de coletas trimestrais no período de 2009 a 2015.

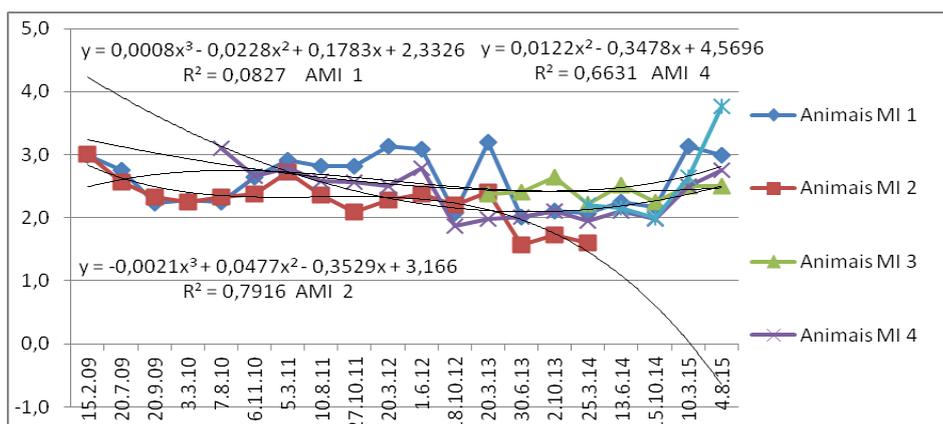


Figura 2. Equações de regressão do Escore corporal de cinco grupos de cabras da raça Anglonubiana meias-irmãs paterna, em função de coletas trimestrais no período de 2009 a 2015.

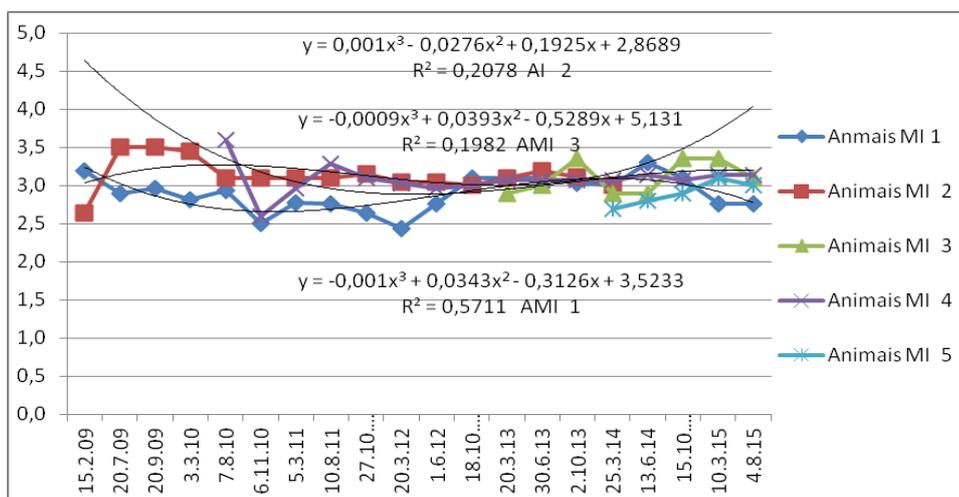


Figura 3. Equações de regressão do Peso da cria ao nascer, de cinco grupos de cabras da raça Anglonubiana meias-irmãs paterna, em função de coletas trimestrais no período de 2009 a 2015.



### **Conclusão**

O rebanho se apresenta com infestação contínua por verminose no período avaliado e que há tendência de comportamento similar entre o grau de anemia indicada pelo Famacha e o OPG. No rebanho analisado não há um grupo de meias-irmãs paterna que tenha se destacado dos demais nas características analisadas.

### **Referências**

**Cardellino R.** La inclusión de la resistencia genética a parásitos gastrointestinales en programas de mejoramiento genético. In: Castells DM. (Ed.) Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos. Buenos Aires: FAO, 2003. p. 97-100.

**Molento MB, Tasca C, GALLO A, Ferreira M, Bononi R, Stecca E.** Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por "*Haemonchus contortus*" em pequenos ruminantes. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1139-1145, 2004.

**Nunes AP, Oliveira AC, Berne MEA, Borba MFS, Echevarria F, Vaz CM, Carvalho FIF.** Estudo da variabilidade genética de resistência a nematódeos gastrintestinais em ovinos da raça Corriedale com marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.13, n.1, p.25-33, 2007.

**Silva PO.** Caracterização de matrizes Anglonubiana com potencial para resistência a nematóides gastrintestinais. 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.



## Influência do suplemento *Reproductive*<sup>®</sup> sobre os parâmetros do sêmen fresco e descongelado de ovinos deslanados

*Influence of reproductive<sup>®</sup> supplement on the parameters of fresh semen and thawed hair sheep*

**Kenney de Paiva Porfírio<sup>1\*</sup>, Apoxena Reis Soares Marafon<sup>4</sup>, Tuanny Creuza Medeiros Damasceno<sup>1</sup>, Marlene Sipaúba de Oliveira<sup>3</sup>, Raphael Briseno Frota<sup>5</sup>, Willams Costa Neves<sup>2</sup>, Janaína de Fátima Saraiva Cardoso<sup>2</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>2</sup>Professor Doutor da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>3</sup>Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>4</sup>Mestre em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Bom Jesus, Piauí, Brasil;

<sup>5</sup>Médico Veterinário, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil

\*E-mail: kenneymv@hotmail.com

### Abstract

*Aimed to test the *Reproductive*<sup>®</sup> nutricional on the quality of fresh semen and thawed sheep. Eight sheep were used, with proven fertility after conducting breeding soundness examination CBRA (2013). They were divided into two groups, group 1 (*Reproductive*<sup>®</sup>), animals supplemented with Nutritional, and group 2 (control), compounds by animals without supplementation, both groups were subjected to the same management system and food. Seminal samples were taken once a week, through artificial vagina. After the collection was performed semen analysis. Subsequently, semen was diluted, bottled and cryopreserved in automated apparatus TK-3000<sup>®</sup>. After thawing, the samples were analyzed. When compared by fortnight, there was an improvement in the group supplemented for the parameters motility and vigor in thawed semen and morphology in fresh semen. We conclude that the *Reproductive*<sup>®</sup> supplement had beneficial effects on semen parameters from the third week of use.*

**Keywords:** *nutraceutical, small ruminants, animal reproduction.*

**Palavras-chave:** *nutricêutico, pequenos ruminantes, reprodução animal.*

### Introdução

A nutrição e reprodução são aspectos que possuem laços estreitos, em qualquer sistema de produção animal. Nesse sentido, a nutrição é responsável pela expressão e funcionamento de rotas metabólicas que permitirão ao animal expressar todo o seu potencial produtivo e reprodutivo (Lock e Garsnworthy, 2002).

Os nutracêuticos geralmente são constituídos por vitaminas, minerais e ácidos graxos, sendo a vitamina A um nutriente essencial e sua necessidade na reprodução dos animais está bem estabelecida, atuando na função celular imune (National academy of sciences, 2002). Todavia, quando se trata de nutrição e reprodução pouca atenção é dada quando nos referimos à suplementação em machos reprodutores, de modo que estes são de grande importância, pois são os propagadores de material genético.

Devido à grande influência de vitaminas e minerais na qualidade espermática e eficiência reprodutiva dos humanos e animais, o laboratório Vetnil<sup>®</sup> desenvolveu um suplemento para reprodutores contendo uma gama de substâncias capazes de melhorar de forma significativa a qualidade, e eficiência reprodutiva de equinos, caprinos, ovinos e asininos.

Devido à escassez de dados existentes na literatura sobre a eficácia deste suplemento na espécie ovina, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do suplemento nutricional *Reproductive*<sup>®</sup> sobre a qualidade do sêmen fresco e descongelado de ovinos deslanados.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Santa Teresa, localizada no Município de Matões, Maranhão- Brasil. Os animais da propriedade inicialmente foram submetidos a avaliação clínica e andrológica completa de acordo com o CBRA (2013). No final da avaliação foram selecionados um total de 08 (oito) reprodutores ovinos com idades variando de dois a quatro anos.

Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em dois grupos experimentais: Grupo 1, compostos por reprodutores suplementados com o nutricional *Reproductive*<sup>®</sup>, na dose de 10 mL por via oral ao dia, por animal e Grupo 2 ou grupo controle, compostos pelos animais que não foram suplementados. Ambos os grupos foram mantidos em manejo intensivo, alimentados com 400g/dia de concentrado comercial, além de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, sal mineral Ovinofós (Tortuga<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

As coletas de sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial, na presença de uma fêmea em cio como manequim, uma vez por semana, totalizando seis ejaculados por reprodutor durante o período experimental. As amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria, à temperatura de 37,5 °C, até o momento da avaliação microscópica. As análises foram realizadas de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

Após avaliação do sêmen, foi realizado a diluição em Tris-gema-glicerol. ( $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL), para posterior criopreservação. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, identificadas de acordo com o grupo experimental, criopreservadas em sistema automatizado (modelo TK 3000<sup>®</sup> Modular SE) e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após o período de no mínimo uma semana as amostras foram descongeladas a 37°C por 45 segundos, para posterior avaliação quanto à motilidade, vigor e morfologia.

Para análise dos dados foi utilizado o software SYSTAT 7.0 for Windows e analisados por modelos lineares gerais, análise de univariância (ANOVA) para medições repetidas. Para fins de comparação das médias dos parâmetros, foi aplicado o teste de Tukey, sendo os resultados considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

Os achados de média por quinzena dos grupos quanto aos parâmetros motilidade, vigor e morfologia estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Médias por quinzena para os parâmetros motilidade, vigor e morfologia de sêmen fresco e criopreservado.

Parâmetros	Tipo	Grupos	1º quinzena	2º quinzena	3º quinzena
Motilidade	Fresco	Reproductive <sup>®</sup>	58,7 ± 36,4 <sup>b</sup>	58,75 ± 39,7 <sup>b</sup>	81,6 ± 18,8 <sup>a</sup>
		Controle	71,8 ± 22,5 <sup>b</sup>	67,5 ± 35,6 <sup>b</sup>	62,5 ± 34,0 <sup>a</sup>
	Descongelado	Reproductive <sup>®</sup>	17,5 ± 12,2 <sup>b</sup>	33,7 ± 8,34 <sup>b</sup>	45 ± 8,0 <sup>a</sup>
		Controle	29,3 ± 15,6 <sup>b</sup>	23,5 ± 13,8 <sup>b</sup>	26,8 ± 19,6 <sup>b</sup>
Vigor	Fresco	Reproductive <sup>®</sup>	2,81 ± 1,56 <sup>b</sup>	2,87 ± 1,48 <sup>b</sup>	3,87 ± 0,79 <sup>a</sup>
		Controle	3,31 ± 0,80 <sup>b</sup>	3,18 ± 1,33 <sup>b</sup>	3 ± 1,16 <sup>a</sup>
	Descongelado	Reproductive <sup>®</sup>	1 ± 0,53 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,70 <sup>b</sup>	2,87 ± 0,35 <sup>a</sup>
		Controle	1,50 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,75 ± 0,89 <sup>b</sup>	1,81 ± 0,92 <sup>b</sup>
Morfologia Normais (%)	Fresco	Reproductive <sup>®</sup>	84,1 ± 7,62 <sup>b</sup>	90,5 ± 4,81 <sup>b</sup>	93,5 ± 2,67 <sup>a</sup>
		Controle	90,1 ± 4,97 <sup>b</sup>	88 ± 4,14 <sup>b</sup>	88,1 ± 3,72 <sup>b</sup>
	Descongelado	Reproductive <sup>®</sup>	95,2 ± 1,67 <sup>b</sup>	94,6 ± 3,70 <sup>b</sup>	94,7 ± 2,37 <sup>a</sup>
		Controle	95,7 ± 2,37 <sup>b</sup>	94,3 ± 6,14 <sup>b</sup>	92,8 ± 6,44 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando comparados por quinzena, o grupo suplementado apresentou melhores resultados nos parâmetros motilidade e vigor no sêmen fresco e descongelados a partir da terceira quinzena. Essa melhora ocorreu também quanto à característica espermatozoides normais no sêmen descongelado. Isso pode ter ocorrido por que nas primeiras quinzenas os espermatozoides armazenados, ou que já estavam formados no epidídimo durante a espermatogênese, não recebiam influência dos constituintes do suplemento durante a sua formação, entretanto a partir do início do novo ciclo (na terceira quinzena), estes já sofriam influência dos constituintes.

Atualmente existem vários estudos que comprovam a influência da inclusão lipídica sobre a qualidade espermática em diferentes espécies, seja com inclusão na ração dos animais, como já descrito para suínos (Oliveira et al., 2006), ou com adição no ejaculado, de bovinos (Moraes et al., 2010). Entretanto são raros os trabalhos que tenham avaliado tais efeitos na espermatogênese de ruminantes.

De acordo com Ferrari Junior (2013), a nutrição apresenta uma correlação positiva sobre a reprodução, onde os nutrientes possuem mecanismos de atuação sobre a eficiência reprodutiva. Os níveis nutricionais devem ser mantidos de acordo com a exigência do animal uma vez que podem influenciar no desenvolvimento e função dos órgãos reprodutivos e sistema endócrino envolvidos com a reprodução.

Em um trabalho realizado por Strzezek et al. (2004) onde os autores avaliaram o efeito do fornecimento de um suplemento contendo ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes sobre a qualidade do sêmen de suínos observaram uma melhora nas características bioquímicas e na qualidade espermática do sêmen in natura.

### Conclusão

O uso do suplemento nutricional Reproductive<sup>®</sup> eleva os parâmetros de Motilidade e Vigor espermáticos do sêmen congelado/descongelado, bem como eleva o percentual de espermatozoides morfologicamente normais de sêmen após a terceira quinzena de utilização.

### Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro, através do ETENE/FUNDECI.

### Referências

**Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen



de Animal, 3a. ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.

**Lock AL, And PC.** Garnsworthy. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Anim Sci*, v.74, p.163-176, 2002.

Moraes EHBK, Paulino MF, Valadares Filho SC, Moraes KAK, E Detmann MG Souza. Avaliação nutricional de estratégias de suplementação para bovinos de corte durante a estação da seca. *Rev Bras de Zootec*, v.39, n.3, 608-616, 2010.

**National Academy Of Science.** Vitamin A. In: Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. cap. 4, p. 82-161, 2002. Disponível em: <[www.nap.edu/openbook/0309072794/110.html](http://www.nap.edu/openbook/0309072794/110.html)> Acesso em: 10 de junho 2016.

**Oliveira V, Fialho ET, Lima JAF, Freitas RTF, Sousa RV, Bertechini AG.** Desempenho e composição corporal de suínos alimentados com dietas com baixos teores de proteína bruta. *Pesq Agropec Bras*, v.41, p.1775-1780, 2006.

**Strzezek J, Fraser L, Kuklinska M, Dziekonska A, Lecewicz M.** Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod Biol*, v.4, p.271-287, 2004.

**Ferrari Junior WF.** Adição de lipídios na ração e no sêmen sobre o consumo, digestibilidade e qualidade espermática de caprinos. 2013, 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2013.



## Influência do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino após a descongelação

*Influence of balance time on quality of buck semen after thawing*

Layanne de Macedo Praça<sup>1,\*</sup>, Janaína de Fátima Saraiva Cardoso<sup>2</sup>, Ney Romulo de Oliveira Paula<sup>2</sup>, Danilo de Sousa Lima<sup>3</sup>, Tuanny Creusa Medeiros Damasceno<sup>4</sup>, Alberto Pereira de Araujo Neto<sup>5</sup>, Kenney de Paiva Porfirio<sup>6</sup>, Marlene Sipaúba De Oliveira<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Piauí; <sup>2</sup>Professor no departamento de clínica e cirurgia veterinária na Universidade Federal do Piauí; <sup>3</sup>Mestranda em Ciência Animal na Universidade Federal do Piauí

<sup>4</sup>Mestre em zootecnia e Médico Veterinário da ouro fino, Picos, PI; <sup>5</sup>Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Piauí; <sup>6</sup>Mestrando em Ciência Animal na Universidade Federal do Piauí; <sup>7</sup>Doutoranda em Ciência Animal na Universidade Federal do Piauí; Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: layannepraca@yahoo.com.br

### Abstract

*The animals were divided into three groups G1, G2, G3. Semen collected was diluted in Tris-yolk base and packaged in 0.25 ml straws, a dose of 100 x 10<sup>6</sup> sperm. Semen samples were distributed in different equilibrium time protocols. The group 1 (1h), group 2 (2 h), group 3 (3 h). Mean values for motility were 19.37%, 16.87% and 16.25% respectively for G1, G2 and G3. To analyze (TTR) which consisted of placing a semen, and incubated at 37°C for a period of 120 minutes. The force sperm motility and sperm were evaluated by TTR in different time: 0, 60, 120, 180 minutes. The indices obtained from motility and sperm vigor were evaluated by PROC GLM (SAS, 2001) and proceeded to the 5% Tukey test. This study demonstrated effect the equilibration period, on the viability of goat semen after the freeze-thaw process, in which the semen exposed to less cooling time has a higher sperm viability*

**Keywords:** goats, freezing, equilibration time.

**Palavras-chave:** caprino, congelação, tempo de equilíbrio.

### Introdução

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para aprimorar o processo de criopreservação seminal na espécie caprina e assim alavancar a utilização desses animais nos programas de inseminação artificial (IA), fecundação *in vitro* (FIV), entre outros (Küçük, 2014).

A inseminação artificial (I.A.) em caprinos é praticada em muitos países. No entanto, seu uso se restringe a poucos rebanhos, e por isto não é amplamente utilizada. Um dos principais problemas mundiais que reduzem o uso da I.A. nessa espécie se deve aos processos de conservação espermática, que favorecem a redução da viabilidade das células, devido aos danos ocorridos durante o processo de criopreservação reduzindo assim a capacidade de fertilização dos espermatozoides (Watson, 2008)

Muitas pesquisas vêm demonstrado a importância do período de equilíbrio ao qual o sêmen caprino deve ser submetido após o resfriamento, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar o período ideal para a prevenção de alterações morfológicas durante o processo de congelação do sêmen caprino (Oettlé, 1986). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tempo de equilíbrio sobre a congelabilidade do sêmen caprino.

### Material e Métodos

Foi utilizado quatro reprodutores adultos, da raça Pardo- alpino. Os animais foram submetidos a avaliação clínica, exame físico do sistema reprodutivo e exame andrológico do ejaculado.

Para o cálculo da concentração espermática, utilizou-se a câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 5µL para 2mL (1:400) de solução de formol-salina tamponada (Hancock, 1957). O diluidor de congelação teve concentração final de 7% de glicerol, 20% de gema de ovo e 1% de gentamicina.

Feito o envase, estas foram encaminhadas para o resfriamento conforme Barbosa (1999), no qual as palhetas foram colocadas horizontalmente sobre plataformas de isopor, dentro de uma geladeira de 280L, com temperatura interna estabilizada entre 4 a 5°C. Dessa forma, as amostras foram submetidas a uma curva de resfriamento de - 1,07°C/min, na qual após, aproximadamente, 30 min as amostras chegavam a temperatura de 5°C. Depois desse período as amostras foram submetidas aos diferentes tempos de equilíbrio (TE).

Quando o sêmen diluído atingia a temperatura de 5°C, foram formados três grupos experimentais, de acordo com o Tempo de equilíbrio (TE) ao qual o sêmen seria mantido a temperatura estabilizada de 5°C. Foram eles: Grupo G1: Mantido por 1h de TE; G2: Mantido por 2h de TE e G3: Mantido por 3h de TE. Em seguida as palhetas foram colocadas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido a 5cm da lâmina líquida, por 20min, dentro de uma caixa de isopor. Após os 20min em vapor, as palhetas foram colocadas em raques devidamente identificadas e armazenadas em botijão criogênico até o momento da descongelação.

No tocante a análise estatística, os índices obtidos na realização deste trabalho foram avaliados pelo



PROC GLM (Software Statistical Analysis System for Windows SAS®) (SAS, 2001) e procedeu-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### Resultados e Discussão

As médias encontradas para volume e motilidade espermática (0,70 mL e 74,68%), tabela 1. foram abaixo dos valores médios preconizados pelo CBRA (2013) para a espécie caprina, que são de 0,8 e 80%, para volume e motilidade, respectivamente. Resultados superiores também foram citados por SANTOS (2001), ao utilizar caprinos adultos da mesma raça (Pardo-Alpina) obteve 84,8% de motilidade espermática.

Comparando com esse estudo, Ferrari (1993) em seu trabalho também encontrou valores inferiores para a motilidade espermática (77,00%), ao utilizar caprinos adultos da raça Saanen corroborando portanto, com os dados desse experimento.

Bittencourt et al. (2004), utilizando protocolo semelhante ao descrito para o grupo 1 (1 h de tempo de equilíbrio, em geladeira estabilizada a 5°C), obtiveram um resultado superior ao encontrado nesse estudo, de 51,0% de células com motilidade após a descongelação. Enquanto Santos (2001), com o um protocolo semelhante utilizado para o grupo 2 (2 h de tempo de equilíbrio à temperatura de 5°C), observou 31,9% e 2,8 respectivamente, para motilidade e vigor espermático. Valores superiores aos observados com o referido grupo do presente experimento.

Dados semelhantes foram reportados por Azevedo et al., (2005) ao trabalharem com carneiros compararam a utilização de dois protocolos de tempo de equilíbrio, onde pós a descongelação os autores não verificaram a influência do tempo de equilíbrio, sobre a viabilidade do sêmen ovino descongelado.

Tabela 1. Valores médios encontrados para as características microscópicas (motilidade, vigor, concentração e volume) do o sêmen a fresco.

Amostras	Mot (%)	Vig (0-5)	Turb (0-5)	Conc.10 <sup>6</sup> spztz / (mL)	Vol (mL)
Média ± S	74,68 ± 2,26	3,46 ± 0,44	3,31 ± 4,37	12,80	0,70

Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão encontrados para motilidade, vigor e morfologia para os três grupos logo após a descongelação.

Grupo	Motilidade (%)	Vigor (0- 5)	Espermatozoides morfologicamente normais (%)
1h	19,375 ± 12,366 <sup>A</sup>	1,875 ± 0,645 <sup>A</sup>	94,938 ± 3,316 <sup>A</sup>
2h	16,875 ± 12,230 <sup>A</sup>	1,844 ± 0,676 <sup>A</sup>	93,063 ± 2,744 <sup>A</sup>
3h	16,250 ± 14,08 <sup>A</sup>	31,84 4 ± 0,724 <sup>A</sup>	95,750 ± 2,295 <sup>A</sup>

Medias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si (P > 0,05) pelo teste de tukey 5%.

### Conclusão

O presente estudo permite concluir que períodos mais breves de resfriamento usados durante o pré-congelamento diminuem as lesões causadas pelo processo de criopreservação do sêmen caprino.

### Referências

- Azevedo HC, Bicudo SD, Sousa DB,; Rodello L. Efeito da adição do equex-STM ao diluente TRIS-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, supl.1, p.311-311, 2005.
- Barbosa LP. Avaliação de diferentes diluidores e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina. 1999. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa-MG.
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho A de L, Santos ADF, Furst R, Teixeira RBS, Chalhoub M, Portela AP, Alves SGG. Utilização de glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores na congelamento de sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, v.5, p.27-32, 2004.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 3a. ed., Belo Horizonte, 2013.
- Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, v.68, n.3, p.327-331, 2014.
- Oettlé EE. Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci*, v.12, p.145-150, 1986.
- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Santos ADF. Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo. 2001, 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.



## Influência do tipo de parto na determinação sérica de glicose em cordeiros

*Delivery type of influence on serum glucose determination in lambs*

Cássia Batista da Silva<sup>1\*</sup>, Ingrid Vilmara Pereira de Sousa<sup>1</sup>, Gláucia Brandão Fagundes<sup>2</sup>, Antônio de Sousa Júnior<sup>3</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>3</sup>, Mônica Arrivabene<sup>4</sup>, Francisca Elda Ferreira Dias<sup>5</sup>, Tânia Vasconcelos Cavalcante<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduandos pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI; <sup>2</sup>Mestranda em Zootecnia pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI; <sup>3</sup>Docente do Colégio Técnico de Teresina (CTT); <sup>4</sup>Docente do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV); <sup>5</sup>Universidade Federal do Tocantins, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Araguaína, TO, Brasil.

\*E-mail: isacassia@hotmail.com

### Abstract

*This study aimed to evaluate the effect of turn and type of birth on the behavior of the concentration of glucose in Dorper lambs grazing in Piauí semiarid. 18 lambs were used in the Dorper, born aged twenty four hours. For the evaluation of plasma concentrations of glucose, the animals were randomly distributed in shifts (day and night) and the type of birth (single and double). Blood samples were collected at 24 hours of elapsed time after birth, soon after placed in tubes with sodium fluoride and taken to the Clinical Pathology Laboratory of the University Veterinary Hospital - HVU, UFPI. Analysis of variance revealed a significant effect of the interaction shift in the types of twin births ( $116.64 \pm 6.28$ ) on the concentration of plasma glucose. The conclusion of this research was that the performance of twin lambs, is due to the amount of ingested colostrum does not depend directly on the amount of offspring or due to their own birth order.*

**Keywords:** lambs, twins, glucose.

**Palavras-chave:** cordeiros, gemelares, glicose.

### Introdução

A glicose sanguínea constitui-se um substrato energético primário para animais ruminantes recém-nascido, apresentando-se em baixas concentrações até o momento da primeira ingestão do colostro, sendo este uma fonte natural de energia disponível. Salienta-se que em ruminantes neonatos, a concentração plasmática de glicose é dependente diretamente da quantidade ingerida e do teor de lactose contido no leite (Yanaka et al., 2012). O sistema de homeostase da glicose em ovelhas com gestação simples é significativamente menos susceptível a hipoglicemia por estresse do que ovelhas gestando gêmeos devido a maior dificuldade destas em aumentar a demanda de glicose para a unidade útero-placentária (Schlumbohm; Harmeyer, 2003), assim a avaliação da glicemia torna-se uma importante ferramenta na adaptação do neonato (Braga et al., 2014), tornando-se possível detectar precocemente crias carentes que requerem cuidados especializados para suprir as deficiências nas primeiras horas após o nascimento. Sabendo-se que, o nascimento é o processo de transição mais dramático que o indivíduo enfrenta em toda a sua vida, objetivou-se avaliar a influência do tipo de parto (simples e gemelares), nos níveis plasmáticos de glicose em cordeiros deslanados ingerindo colostro, até as 24 horas de vida.

### Material e Métodos

A condução do experimento foi no Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI), localizada no Centro-Norte Piauiense. O local apresenta as seguintes coordenadas geográficas; latitude 5°05'21'' S, longitude 42°48'07'' W e altitude 74,4 m. Foram utilizados 18 cordeiros recém-nascidos deslanados oriundos de 25 ovelhas da raça Dorper primíparas, sadias, com escore corporal médio, vermifugadas e vacinadas contra enterotoxemia. Submetidas ao manejo reprodutivo de monta controlada. O diagnóstico de gestação realizou-se através do exame ultrassonográfico (DP 2200 Vet, Mindray) para confirmação de prenhez entre 44 e 60 dias após a última data de cobertura e foram separadas as ovelhas prenhes.

As amostras de sangue foram colhidas no tempo transcorrido de 24h após o nascimento, logo depois colocadas nos tubos com fluoreto de sódio e levadas até o laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Universitário – HVU, UFPI.

Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística pelo programa computacional SAS (Statistical Analysis System) para a análise de variância (ANOVA). Os dados de glicose foram analisados pelo procedimento GLM do programa estatístico do SAS para verificar o efeito de sexo (fêmea e macho). As comparações entre médias obtidas para as diferentes variáveis estudadas nos grupos experimentais foram realizadas pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ ).



### Resultados e Discussão

Para os animais nascido de parto simples e gemelar, observa-se que a maior média ( $P < 0,05$ ) foi obtida durante o período noturno ( $116,64 \pm 6,28$  mg/dL nos gêmeares), havendo portanto diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os turnos de nascimento gemelar e simples ( $116,64 \pm 6,28$  mg/dL e  $105,91 \pm 6,28$  mg/dL, respectivamente).

Resultados que são contraditórios aos observados por Camargo (2010) que trabalhando com cordeiros verificaram maior concentração de glicose nos animais nascidos de parto simples ( $119,7 \pm 19,96$ ) em relação àqueles nascidos de parto gêmeares ( $97,2 \pm 32,85$ ) em que reportou que tal comportamento deveu-se a quantidade de colostro ingerido por gêmeares ter sido menor do que os nascidos de parto simples.

Tabela 1. Médias da concentração de glicose (mg/dL) em função do turno (diurno e noturno) e do TDN (simples e gemelar) de cordeiros Dorper nascidos às 24 horas do pós-parto. Teresina, PI, 2016.

Efeito	Turno	
	Diurno	Noturno
TDN		
Simples	$107,43 \pm 6,28$ Aa	$89,19 \pm 6,28$ Aa
Gemelar	$105,91 \pm 6,28$ Aa	$116,64 \pm 6,28$ Ba
DMS	18.34	

DMS: Diferença Mínima Significativa; a, b e A,B – médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas apresentam diferença entre si (Tukey,  $P < 0,05$ ).

### Conclusão

Conclui-se que a quantidade de colostro ingerido não depende diretamente da quantidade de crias ou devido à própria ordem de nascimento.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Setor de Pesquisa de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Teresina (CTT), pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) na cidade de Teresina pela concessão dos animais e pela contribuição para a realização do trabalho.

### Referências

- Braga GI, Alcindo JF, Souza NC, Vacari J, Camargo DG, Trein TA, Deschk M, Mendes LCN, Feitosa FLF.** Avaliação do lactato e da glicemia de cabritos nascidos por cesariana eletiva. *Anais 41º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Gramado, RS, agosto, 2014.
- Camargo DG.** Avaliação do sistema APGAR (modificado por BORN, 1981) e dos níveis de cortisolemia, glicemia e de gases sanguíneos em cabritos nascidos de partos eutócicos e de cesariana. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, p.102, 2010.*
- Schlumbohm C, Harmeyer J.** Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J Dairy Sci*, v.86, p.1953-1962, 2003.
- Yanaka R, Camargo DG, Santos WA, Cavassano BS, Bovino F, Mendes LCN, Peiro JR; Feitosa FLF.** Glicemia, proteinograma e perfil de alguns componentes bioquímicos séricos de cabritos da raça Bôer. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.49, n.1, p.30-38, 2012.



## Inseminação artificial por laparoscopia em ovinos: proposição de uma técnica anestésica

*Artificial insemination by laparoscopy in sheep: proposition of an anesthetic technique*

**Celiz de Sousa Pedrosa<sup>1\*</sup>, Marcella Matos Pereira Coelho<sup>1</sup>, Jéssica Lobo Albuquerque<sup>2</sup>, Dglan Firmo Dourado<sup>3</sup>, Antônio de Sousa Junior<sup>4</sup>, Felipe de Jesus Moraes Júnior<sup>5</sup>, Ricardo de Macêdo Chaves<sup>6</sup>, José Ribamar da Silva Júnior<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, CCA/UEMA; <sup>2</sup>Médica Veterinária Residente da Clínica e Cirurgia de Grandes Animais, HOVET/CCA/UEMA; <sup>3</sup>Mestrando em Ciência Animal, CCA/UEMA; <sup>4</sup>Colégio Técnico Teresina CCT/UFPI; <sup>5</sup>Bolsista de Pós-Doutorado - Mestrado em Ciência Animal/CAPES-UEMA; <sup>6</sup>Professor Ajunto IV, Departamento das Clínicas Veterinárias, CCA/UEMA, São Luís, MA, Brasil.

\*E-mail: celiz.pedrosa@hotmail.com

### Abstract

*The objective of this study demonstrates that intravenous anesthesia (TIVA) total can be practical at the field level with safety and practicality. 8 ewes were inseminated by laparoscopy under TIVA Glyceryl Ether Guaiaccol (EGG) (50mg/ml), ketamine (1mg/ml) and xylazine (0.05mg / ml) in 5% glucose solution after premedication with xylazine and morphine and induction with ketamine and midazolam. physiological variables were evaluated (HR, FR, T and SpO<sub>2</sub>) and electrocardiographic and qualitative parameters of anesthesia. Changes in variables HR, FR, T and some electrocardiographic variables were recorded, with no clinical repercussion, it is concluded that TIVA proposal gives anesthetic sufficient quality to perform the insemination by laparoscopy safely, but intubation and oxygenation of patients are essential factors for the success of the technique.*

**Keywords:** Artificial insemination, anesthetic technique, laparoscopy, Sheep.

**Palavras-chave:** Inseminação Artificial, Laparoscopia, Ovinos, Técnica Anestésica.

### Introdução

O uso de biotecnologias aplicadas à reprodução animal intensifica o melhoramento genético dos animais ampliando o crescimento da criação e produção de ovinos. Dentre estas biotecnologias, a inseminação artificial, proporciona maior amplitude de resultados, já que poucos reprodutores selecionados produzem sêmen suficiente para a grande quantidade de fêmeas que reproduzem anualmente (Feranti et al., 2013). Neste contexto a laparoscopia ou a videolaparoscopia vem sendo cada vez mais empregada para inseminação desta espécie por diversas particularidades ligadas a anatomia dos animais e características fisiológicas reprodutivas. Por ser um procedimento cirúrgico e muitas vezes realizadas a campo a busca por técnicas anestésicas cada vez mais seguras passou a ser uma preocupação. Com este foco alguns autores relataram a utilização de agentes anestésicos dissociativos (Zhang et al., 2015) ou técnicas de anestesia venosa total (TIVA) (Cordeiro et al., 2014). De forma geral todos os autores relataram aspectos positivos e negativos da técnica, porém sem definir ou sem caracterizar ser esta uma técnica adequada ou não ao procedimento em questão, desta forma este trabalho objetiva apresentar uma técnica anestésica de fácil realização e segura para o procedimento e a espécie em questão.

### Material e Métodos

O estudo foi conduzido com 08 ovinos da raça Santa Inês submetidos à inseminação artificial de rotina por videolaparoscopia. Jejum hídrico e sólido de 6 e 12 horas respectivamente foram obedecidos. Como medicação pré-anestésica (MPA) foi usada xilazina (0,05mg/kg) e morfina (0,5mg/kg) ambas na mesma seringa por via intramuscular. Em seguida os animais foram induzidos com cetamina (2mg/kg) e midazolam (0,2mg/kg) na mesma seringa por via venosa e em ato contínuo os animais foram intubados e mantidos sob oxigênio a 100% em circuito sem reinalação de gases. A manutenção foi feita com a associação do Éter Gliceril Guaiaccol (EGG) (50mg/ml), Cetamina (1mg/ml) e xilazina (0,05mg/ml) em solução glicosada a 5%. A solução foi injetada na velocidade de 2ml/kg/hora. Foram mensurados os valores de frequência respiratória (FR), Temperatura (T) saturação de oxigênio nas hemácias (S<sub>a</sub>tO<sub>2</sub>) e as variáveis eletrocardiográficas (DII a 25mm/s): Frequência cardíaca (FC), amplitude (PmV) e duração (Ps) da onda P; intervalo PR (PR), duração do complexo QRS (QRS), amplitude da onda R (RmV) e alterações qualitativas da onda T. Os dados foram analisados nos tempos: antes da MPA (T0), após a MPA (T1), 5 minutos após a indução (T5), durante manipulação do corno uterino (TMANI) e ao término do procedimento (TTER). Ainda foram avaliadas as qualidades de: sedação (Qsed), indução (Qind), intubação (Qint) e recuperação (Qrec) da anestesia (Jud et al., 2010). Os dados foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, e depois de constatadas a não significância das pressuposições da análise de variância (normalidade dos erros e homocedasticidade) foram submetidos à análise de variância e as médias, entre os tempos de avaliação, comparadas entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

## Resultados e Discussão

O tempo cirúrgico foi de  $30 \pm 7$  minutos. Não foram registrados intercorrências graves durante estudo. Os pesos e idade dos animais utilizados foram respectivamente  $34 \pm 7$  kg e  $46 \pm 5$  meses. Os valores de FR, FC e T diminuíram significativamente ( $P < 0,05$ ) logo após a aplicação da MPA (Fig.1), porém ficaram dentro dos limites fisiológicos descritos para a espécie. A diminuição da FR pode ter sido influenciada, tanto pela depressão causada pelos agentes anestésicos, quanto pelo decúbito (Gouveia et al., 2016), porém a suplementação com oxigênio a 100% foi capaz de prevenir possíveis alterações na oxigenação, já que a variável  $S_aO_2$  se mostrou constante em todos os momentos (Fig.1). Lima et al. (2016) relataram em seus estudos diminuição da FC e da T, porém sem grandes repercussões e atribuíram este efeito a xilazina. Alterações eletrocardiográficas nas variáveis Ps e PR foram observadas entre os tempos T0 e T1 ( $P < 0,05$ ) porém estas foram estabilizadas e voltaram aos valores basais após a indução. Bloqueio átrio ventricular (BAV) de 2º grau foi observado em 3/8 animais durante registro. Tanto as alterações na onda Ps, intervalo PR e o aparecimento de BAVs estão relacionados aos efeitos da xilazina em diminuir os impulsos simpáticos e aumentar os parassimpáticos (Lemke, 2014). A (Fig.2) apresenta o escore final dos parâmetros qualitativos avaliados, sendo todos considerados satisfatórios. Sinais de sedação como: abaixamento de cabeça e ptose de pálpebras e decúbito esternal foram observados e também são descritos por Lima et al. (2016) em ovinos que receberam um agonista alfa-2 associado a morfina. Apenas 1/8 animal precisou receber mais uma dose complementar de cetamina e midazolam para a intubação que foi realizada com auxílio de laringoscópio e relativamente feita de forma tranquila em todos os animais. A recuperação também ocorreu sem transtornos com o tempo médio de extubação de  $4,5 \pm 0,5$  minutos e com os animais assumindo decúbito esternal em tempo médio de  $14 \pm 5$  minutos e em estação em  $35 \pm 12$  minutos. Os tempos anteriormente descritos se assemelham aos descritos por outros autores que também usaram técnicas de TIVA em ovinos (Barros et al., 2015). Salivação e refluxo foram observados em 2/8 animais, porém sem alterações durante a anestesia e nos tempos pós-operatórios imediatos e tardios, sendo estes efeitos também relatados por Lima et al. (2016) que atribuíram este efeito a diminuição do reflexo de deglutição e acúmulo de saliva na cavidade bucal. Nenhum animal apresentou resposta dolorosa durante manipulação ou no pós-cirúrgico imediato. Hill et al. (1998) afirmam que o uso de analgesia preemptiva colabora na melhoria dos índices reprodutivo, já que está comprovado que o estímulo doloroso e o estresse causam aumento de cortisol plasmático, que pode interferir diretamente nestes índices.

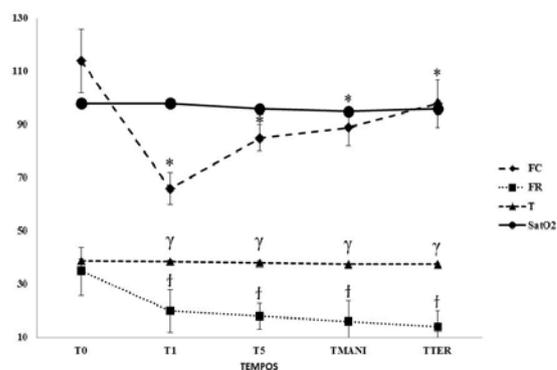


Figura 1. Evolução das médias de: Frequências Cardíaca (FC), Respiratória (FR), Temperatura (T) e Saturação do oxigênio na hemácia ( $S_aO_2$ ) no decorrer dos tempos avaliados em ovinos submetidos a medicação pré-anestésica com xilazina e morfina, induzidos com a associação de cetamina e midazolam e mantidos sob TIVA com EGG, cetamina e xilazina para realização de inseminação artificial por videolaparoscopia. Diferem para FC\*, FR<sup>†</sup>, T<sup>‡</sup> em relação ao tempo T0 pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ .

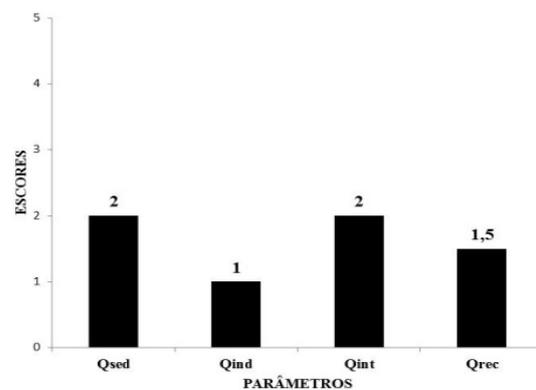


Figura 2. Resultados da avaliação das qualidades de sedação (Qsed), Indução (Qind), intubação (Qint) e recuperação (Qrec) de ovinos submetidos a medicação pré-anestésica com xilazina e morfina, induzidos com a associação de cetamina e midazolam e mantidos sob TIVA com EGG, Cetamina e xilazina para realização de inseminação artificial por videolaparoscopia.

## Conclusão

Pelos resultados expostos a TIVA com EGG, cetamina e xilazina e a pré-medicação com xilazina e morfina conferem qualidade anestésica suficiente para realização das inseminações por videolaparoscopia com segurança, porém a intubação e a oxigenação dos pacientes são fatores indispensáveis para o sucesso da técnica proposta.

## Referências

- Barros FFPC, Teixeira PPM, Silva MAM, Coelho CMM, Lopes MCS, Chung AEK, Chung DG, Coutinho LNC, Ribeiro RB, Padilha LC, Vicente WRR. Single-port laparoscopic ovariectomy using a pre-tied loop ligature in Santa Ines ewes. *Ciência Rural*, v.45, n.11, p.2033-2038, nov, 2015.
- Cordeiro MF, Teixeira PPM, Oliveira MEF, DI Filippo PA, Dias DPM, Beretta CAG, Dória RGS, Feliciano MAR, Coutinho LN, Vicente WRR. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration, *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.66, n.1, p.137-144, 2014



**Feranti JPS, Brun MV, Zanella E, Messina SA, Schuh R, Santos FR, Brambatti G.** Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.65, n.3, p.687-693, 2013.

**Gouveia LV, Palermo JGC, Borges JRJ, Almeida RM, Ximenes FHB, Godoy RF.** Parâmetros cardiopulmonares e hemogasométricos em ovinos sob anestesia inalatória durante alternância de decúbito. *Ciênc AnimBras*, v.17, n.2, p.1-6, 2016.

**Hill JR, Thompson JA, Perkins NR.** Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology*, v.49, p.697-709, 1998.

**Jud R, Picek S, Makara M.A, Steininger K, Hassig M, Bettschart-Wolfensberger R.** Comparison of racemic ketamine and S-ketamine as agents for the induction of anaesthesia in goats. *Vet Anaesth Analg*, v.37, p.511-518, 2010.

**Lima MPA, Dallabrida AL, Moraes AN, Hehrcke MI, Regalin BDC, Regalin D, Comassetto F, Oleskovicz N.** Anestesia geral inalatória ou total intravenosa associada à anestesia subaracnoidea, em ovinos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.68, n.2, p.369-378, 2016

**Lemke KA.** Anticolinérgicos e sedativos. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. *Anestesiologia e Analgesia Veterinária*. 4a. ed. São Paulo: Roca, 2014. P. 230-269.

**Zhang SX, Fu K, Chi XY, Zhang JT, Gao L, Wang HB.** Laparoscopic abomasal cannulation in sheep. *Veterinari Medicina*, v.60, n.6, p.314-322, 2015.



## Meio de preservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) é eficaz na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados

*Preservation medium based on powdered coconut water (ACP-102c) is effective in the maintenance of mitochondrial activity of cryopreserved ram sperm*

Bárbara Kelly Lima de Castro<sup>1,\*</sup>, Leonardo Alves Rodrigues Cabral<sup>1</sup>, Bárbara Mara Bandeira Santos<sup>2</sup>, Bruna Farias Brito<sup>1</sup>, Maressa Holanda dos Santos<sup>1</sup>, David Baruc Cruvinel Lima<sup>3</sup>, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro<sup>4</sup>, José Ferreira Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia do Sêmen de Caprinos e Ovinos, Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará (LTSCO/NIB/UECE); <sup>2</sup>Faculdade Cisne de Quixadá/RENORBIO, CE; <sup>3</sup>Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC/NIB/UECE); <sup>4</sup>ACP Biotecnologia, UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

\*E-mail: barbaracastro2013@hotmail.com.br

### Abstract

The study aimed to evaluate the mitochondrial activity of cryopreserved ram sperm preserved in medium based on powdered coconut water (ACP-102c). Five sperm collections of two rams were held. Each ejaculate was divided into two treatments: T1 (ACP-102c+egg yolk+glycerol) and T2 (TRIS+egg yolk+glycerol). After dilution, the samples were filled into 0.5 ml straws, chilled to 4 °C and stabilized for 2 h. They were then frozen and stored in liquid nitrogen at -196°C. The activity mitochondrial of treatments were evaluated in time 0h and post-thawing. Data were expressed as mean ± standard deviation and submitted to the Shapiro-Wilk normality test and subsequently suffered angular transformation into arcsine of percentages. The results were considered significant when  $P < 0.05$ . There was no significant difference between treatments. It was concluded that ACP-102c was able to maintain mitochondrial activity post-thawing.

**Key words:** sperm, ram, thawing.

**Palavras-chave:** sêmen, carneiro, descongelção.

### Introdução

A criopreservação seminal permite o transporte e armazenamento seguro de sêmen por longos períodos. Para o uso desta biotécnica faz-se necessário o uso de meios de preservação. A utilização de diluentes alternativos pode ser uma solução para pequenos produtores, barateando as doses de sêmen, além de tornar mais acessível à confecção dos meios, buscando alternativas com matéria prima de fácil obtenção. Nesse contexto, destaca-se o diluente à base água de coco, que é econômico e encontrado em abundância por todo o Nordeste do Brasil (Salgueiro et al., 2002).

Para analisar o sêmen são usadas técnicas que buscam a avaliação do *status* funcional das organelas espermáticas (acrossoma e mitocôndrias). Um modo utilizado para avaliar a atividade das mitocôndrias, organelas presentes na peça intermediária da célula espermática, é através de uma técnica desenvolvida por Hrudka (1987), que usa a reação da 3,3-diaminobenzidina (DAB). Baseado nisto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos frescos (0h) e criopreservados em meio de preservação à base de ACP-102c e TRIS.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Ceará (UECE). O experimento foi submetido à Comissão de Ética para o Uso de Animais da UECE com o número de protocolo: 1845940/2016. A água de coco em pó (ACP-102c) usada no experimento foi cedida pela empresa ACP Biotecnologia, incubada na UECE. Em todos os diluentes foram adicionados 40 mg de gentamicina (Gentatec<sup>®</sup>, Agro Veterinária). O ACP-102c foi diluído de acordo com recomendações do fabricante. O diluente à base de TRIS foi constituído de: 1,893 g de Tris; 0,5 g de frutose; e 1,055 g de ácido cítrico, em 50 ml de água destilada (Singh et al., 1995). Em ambos o diluente foi adicionado 20% de gema de ovo e 7% de glicerol, obtendo-se os seguintes tratamentos: T1 – ACP 102c+ 20% gema de ovo+7% glicerol; T2 – TRIS+20% gema de ovo+7% glicerol.

A atividade citotóxica das mitocôndrias foi avaliada pelo método descrito por Hrudka (1987), em meio contendo 3,3 diaminobenzidina (DAB) diluído em solução fosfato salina (PBS).

Foram utilizados dois reprodutores ovinos, com cinco coletas de cada. O sêmen foi coletado com auxílio de vagina artificial. Os ejaculados foram divididos em duas alíquotas iguais e diluídos nos tratamentos acima mencionados com concentração final de  $400 \times 10^6$  spz/ml.

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e refrigeradas numa curva de refrigeração de 0,35 °C/min., obtendo-se ao final uma temperatura de 4°C e estabilizadas por 2h. Em seguida, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido (-80 °C) por 15 min. e imersas em nitrogênio líquido a -196°C para armazenamento.

Para avaliação da atividade mitocondrial, em cada tubo Eppendorf foram depositados 25 µl de sêmen diluído e



incubado por 40 min. em ausência de luz. Após incubação, 10  $\mu$ l da solução foram depositados sobre lâmina para confecção de esfregaço e armazenado em formol salina 10% por 10 min. Após a fixação, a lâmina foi lavada com água destilada e posta para secar no ambiente. Foram contadas 200 espermatozoides por lâmina, avaliando em dois grupos, espermatozoides com atividade mitocondrial (reagentes) e sem atividade mitocondrial (não reagentes).

Para avaliação do sêmen criopreservado, a amostra foi descongelada em banho Maria a 37 °C por 30 segundos, sendo avaliado após cinco min. Todas as avaliações foram realizadas de forma subjetiva, por microscopia óptica convencional (Microscópio Óptico Binocular, Coleman®) pelo mesmo técnico.

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prisma, versão 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados não paramétricos foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os dados com distribuição normal foram avaliados por meio da ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média e desvio padrão.

### Resultados e discussão

A atividade mitocondrial foi reduzida após o processo de criopreservação em ambos os tratamentos. No ACP-102c de 94,65% de células reagentes para 89,25% (Tab. 1). Enquanto que no TRIS a queda foi de 95,05% para 85,55% (Tab. 1).

Tabela 1. Comparação das medias com desvios da atividade mitocondrial (DAB) do sêmen fresco e descongelado nos tratamentos ACP-102c e TRIS.

Parâmetros	Fresco		Descongelado	
	ACP-102	TRIS	ACP-102	TRIS
DAB (%)	94,65 $\pm$ 4,16 <sup>aA</sup>	95,05 $\pm$ 2,24 <sup>aA</sup>	89,25 $\pm$ 2,93 <sup>aB</sup>	85,50 $\pm$ 11,42 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas distintas, na mesma linha, indicam diferença entre meios de preservação e tempo de avaliação (fresco vs. descongelado) pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas, na mesma linha, indicam diferença entre tempo de avaliação (fresco vs. descongelado) para cada meio de preservação pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O sêmen criopreservado reduziu a porcentagem de espermatozoides com reação mitocondrial (DAB), o que demonstra que o processo de congelamento do sêmen afeta a atividade das mitocôndrias. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos no sêmen descongelado, demonstrando que o ACP-102c é um eficiente crioprotetor para a atividade mitocondrial na pós-descongelação. De acordo com Schober et al. (2007) o dano mitocondrial durante a criopreservação pode ser a maior razão para redução da qualidade do sêmen pós-descongelação. Em estudo com caprinos Cavalcante et al. (2005) também observaram diferença significativa na atividade mitocondrial entre o sêmen fresco e criopreservado.

Estudos relacionam as disfunções mitocondriais causadas pela criopreservação espermática ao estresse oxidativo e à diminuição da atividade mitocondrial (O'Connell et al., 2002). Troiano et al. (1998) observaram que pacientes com infertilidade, possuíam baixa atividade mitocondrial; em adição a isso, Kasai et al. (2002) realizaram experimento com fecundação *in vitro*, e observaram que amostras com maior poder fecundante possuíam células espermáticas com alto potencial de membrana mitocondrial.

### Conclusão

O meio de preservação ACP-102c é eficiente na manutenção da atividade mitocondrial no sêmen ovino criopreservado.

### Agradecimentos

À empresa ACP Biotecnologia pelo fornecimento do diluidor ACP-102.

### Referências

- Cavalcante TV, Esper CR, Ferreira JL, Dias FEF, Azevedo HC3, Cordeiro MF, Souza JAT. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelação de caprinos das raças Boer e Alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva. *Archives of Veterinary Science*, v.10, p.89-93, 2005.
- Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome e oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl*, v.19, p.809-28, 1987.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl*, v.4, p.97-104, 2002.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, v.17, n.3, p.704-9, 2002.
- Salgueiro CCM, Nunes JF, Oliveira KPL, Vieira VE, Gondim JM, Mateos-Rex E. Utilização de diluentes à



base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, supl, p. 96-98, 2002.

**Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L.** Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.68, p.745-54, 2007.

**Singh MP, Sinha AK, Singh BK.** Effect of cyoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1047-53, 1995.

**Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C.** Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Ex Cell Res*, v.241, p.384-93, 1998.



## Meios de preservação de sêmen ovino à base de água de coco em pó e extrato liofilizado de *Aloe vera* em protocolo de refrigeração a 4°C por 48 horas

*Preservation medium based of lyophilized extract of Aloe vera and powdered coconut water (ACP 102®) refrigerated ram semen at 4°C for 48h*

Karmilee dos Santos Pontes<sup>1\*</sup>, Bruna Farias Brito<sup>1</sup>, Erika Bezerra de Menezes<sup>2</sup>, Bárbara Mara Bandeira Santos<sup>3</sup>, Lucas dos Santos Fonseca<sup>4</sup>, Fábio Ranyeri Nunes Rodrigues<sup>1</sup>, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro<sup>5</sup>, José Ferreira Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, UECE; <sup>2</sup>Mississippi State University, <sup>3</sup>Faculdade Cisne de Quixadá; <sup>4</sup>Instituto para o Desenvolvimento da Economia familiar, IDEF; <sup>5</sup>ACP Biotecnologia.

\*E-mail: karmileesl@gmail.com

### Abstract

*The additives of animal origin including egg yolk, widely used for sperm preservation. In order to minimize the impact on the use of animal products, the objective of this study was to evaluate the effect of lyophilized extract of Aloe vera and ACP 102® in ram semen refrigerated at 4°C for 48h. Ejaculates from three ram were split into three aliquots and diluted in ACP®, ACP®/ALV and ALV. Motility and viability was evaluated after sperm dilution, 2h, 24h and 48h of storage at 4°C. Results showed that there was a reduction in total and progressive motility of fresh as compared to other storage time. No differences were observed in viability of fresh and 2h as well as there was no difference of semen at for 24h and 48h storage. In conclusion, study showed that the addition of lyophilized Aloe vera extract was able to maintain semen viability similar to ACP.*

**Key-words:** ram, diluents, cooling.

**Palavras-Chaves:** carneiro, diluentes, refrigeração.

### Introdução

A sobrevivência dos espermatozoides no plasma seminal é limitada somente a alguns minutos. Para manter a qualidade seminal por um período prolongado e submetê-lo ao processo de criopreservação, faz-se necessária a diluição com uma solução protetora (Hafez e Hafez, 2004).

Apesar do uso de diluentes à base de Tris-frutose-gema de ovo-glicerol ser amplamente difundido, novos diluentes têm sido desenvolvidos visando uma melhor proteção aos espermatozoides. Uma vez que os aditivos de origem animal como a gema de ovo e leite, representam um potencial risco à contaminação do sêmen, caso alguns contaminantes como agentes microbianos encontrem-se no produto in natura (Bittencourt, 2013).

A busca por diluentes alternativos tem se intensificado. Nesse contexto, destacamos o uso do diluente à base de água de coco. Este diluente além de ser benéfico às células espermáticas é econômico e possui praticidade devido à disponibilidade de cocos no Nordeste durante todo o ano (Salgueiro et al., 2002). Outro produto de origem vegetal que vem proporcionando resultados satisfatórios é o extrato da *Aloe vera sp.* (ALV) (Gutiérrez et al., 2006). Diante disto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato liofilizado de *Aloe vera* e da água de coco em pó (ACP-102®) em sêmen ovino refrigerado a 4°C por 48h.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). O sêmen foi obtido por meio de vagina artificial, de três reprodutores ovinos das raças Santa Inês (n=2) e Dorper (n=1), obtendo um total de 15 ejaculados. Os ejaculados foram fracionados em 3 amostras e diluídos nos seguintes tratamentos: T1 (ACP®), T2 (ACP®/ALV) e T3 (ALV). Após a diluição as amostras foram submetidas a uma curva de refrigeração (0,25°C/min) no tempo de 2 horas em caixa térmica, obtendo-se ao final uma temperatura de 4°C e posteriormente acondicionadas em geladeira previamente estabilizada a 4°C por 48 horas.

As amostras foram avaliadas após a diluição nos tratamentos (fresco), ao término da refrigeração (2h) e após 24h e 48h de armazenamento a 4°C. Os parâmetros de motilidade do sêmen foram avaliados em sistema de análise de sêmen auxiliada por computador (CASA) (*Sperm Class Analyzer*<sup>TM</sup>, Microoptics, S.L. Version 3.2.0, Barcelona, Spain). Para as análises da viabilidade espermática foram confeccionados esfregaços corados com eosina nigrosina. Na análise da viabilidade, um total de 200 espermatozoides foi avaliado, sendo identificados como corados (inviáveis) ou não corados (viáveis).

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prisma, versão 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados não paramétricos foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os dados com distribuição normal foram avaliados por meio da ANOVA seguida pelo teste de Tukey (p<0.05). Os resultados são apresentados como média e desvio padrão.

### Resultados e Discussão

Nosso estudo observou que os parâmetros de motilidade total e progressiva foram semelhantes entre os



tratamentos quando comparados dentro do mesmo período de armazenamento (fresco, 2h, 24h e 48h após a refrigeração). Na avaliação entre os diferentes tempos de armazenamento a 4°C nossos dados demonstraram que a motilidade total, avaliada no sêmen fresco, foram estatisticamente semelhantes aos dados obtidos ao término da curva de refrigeração (2h). Como esperado, houve queda nos parâmetros de motilidade total após 24h e 48h de refrigeração do sêmen ovino. No entanto, observou-se que não teve diferença estatística significativa quando comparado o sêmen ovino avaliado após as 24h e 48h de armazenamento a 4°C (Tab. 1).

Tabela 1. Médias e desvios padrões da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e da viabilidade espermática em sêmen ovino refrigerado a 4°C nos tratamentos ACP, ACP/ALV e ALV no sêmen fresco e nos tempos de 2, 24 e 48 horas de armazenamento.

Tempo	Diluyente	MT	MP	Viabilidade
Fresco	ACP	78,3 ± 4,50 <sup>A</sup>	75,7 ± 5,14 <sup>A</sup>	170,9 ± 8,30 <sup>A</sup>
	ACP/ALV	78,3 ± 4,50 <sup>A</sup>	75,7 ± 5,14 <sup>A</sup>	158,2 ± 13,69 <sup>A</sup>
	ALV	78,3 ± 4,50 <sup>A</sup>	75,7 ± 5,14 <sup>A</sup>	161,8 ± 13,12 <sup>A</sup>
2h	ACP	70,2 ± 17,16 <sup>A</sup>	55,7 ± 16,80 <sup>B</sup>	152,2 ± 13,30 <sup>AC</sup>
	ACP/ALV	63,2 ± 17,19 <sup>A</sup>	48,6 ± 17,57 <sup>B</sup>	149,5 ± 18,02 <sup>AC</sup>
	ALV	73,6 ± 13,69 <sup>A</sup>	58,1 ± 15,14 <sup>B</sup>	151,3 ± 20,90 <sup>A</sup>
24h	ACP	45,3 ± 23,74 <sup>B</sup>	31,0 ± 18,31 <sup>C</sup>	116,4 ± 30,00 <sup>B</sup>
	ACP/ALV	43,4 ± 14,39 <sup>B</sup>	30,3 ± 11,96 <sup>C</sup>	117,3 ± 33,68 <sup>B</sup>
	ALV	53,1 ± 15,55 <sup>B</sup>	39,4 ± 13,80 <sup>C</sup>	115,8 ± 30,41 <sup>B</sup>
48h	ACP	40,0 ± 20,33 <sup>B</sup>	26,4 ± 15,64 <sup>C</sup>	136,4 ± 19,98 <sup>BC</sup>
	ACP/ALV	39,3 ± 17,79 <sup>B</sup>	25,0 ± 13,55 <sup>C</sup>	126,5 ± 16,59 <sup>BC</sup>
	ALV	49,0 ± 16,41 <sup>B</sup>	35,4 ± 14,32 <sup>C</sup>	112,2 ± 27,28 <sup>B</sup>

Valores (média ± SD) com diferentes letras sobrescritas (A-C) em mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre diluentes nos diferentes intervalos de tempo.

No tocante a motilidade progressiva (Tab. 1), quando avaliado o tratamento entre os diferentes intervalos de tempo, observou-se que os diluentes no sêmen fresco foram superiores, sendo diferentes estatisticamente de todos os outros períodos de armazenamento (2h, 24h, e 48h). Observou-se também que não houve diferença estatística entre as amostras avaliadas as 24 e 48 horas. Em nossos resultados, observou-se que a motilidade progressiva não teve influência dos tratamentos, independente do tempo de avaliação.

Verificou-se nos nossos dados um declínio das motilidades no decorrer do tempo de armazenamento, o qual também foi observado por outros autores (Campos *et al.*, 2003) e coincidem com a premissa de que, menor será a sobrevivência das células espermáticas *in vitro* e a capacidade fecundante das mesmas *in vivo*, quanto maior for o tempo de armazenamento do sêmen (Leboeuf *et al.*, 2000).

Em relação à viabilidade (Tab. 1), não houve diferença na análise do sêmen fresco/diluído e após a curva de refrigeração bem como não houve diferença do sêmen refrigerado por 24h e 48h. Os dados desse estudo não corroboram com dados os obtidos por Gutiérrez *et al.* (2006), no qual a adição de mais de 50% de *Aloe vera* demonstrou um efeito nocivo ao sêmen ovino criopreservado.

## Conclusão

Em conclusão, esse estudo demonstrou que a adição do extrato liofilizado de *Aloe vera* ao diluyente ACP manteve a qualidade do sêmen semelhante ao diluyente ACP<sup>®</sup>. Adicionalmente, o uso do extrato de *Aloe vera* na refrigeração do sêmen ovino manteve a cinética espermática, os parâmetros de motilidade e a viabilidade semelhantes ao ACP<sup>®</sup> durante o período de armazenamento.

## Agradecimentos

À ACP Biotecnologia pelo fornecimento do diluidor ACP-102<sup>®</sup> e ao Horto de Plantas Medicinais Prof. Abreu Matos, “Campus” do Pici/UFC.

## Referências

- Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. *Ciênc Anim Bras*, v.14, n.4, p.522-536, 2013.
- Campos ACN, Nunes JF, Monteiro AWU, Pinheiro JHT, Ferreira MAL, Araújo AA, Cruz JF. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, n.4, p.620-624, 2003.
- Gutiérrez AJ, Cosme RW, Jiménez CJA, Ramírez GJA. Agua de coco, suero fetal bovino, *Aloe vera* y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *Revista Archivos de Zootecnia*, v.55, n.209, p.101-104, 2006.
- Hafez B, Hafez ESE. Reprodução Animal. 7ª Edição. São Paulo: Manole, 2004.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.
- Salgueiro, C.C.M. *et al.* Utilização de diluentes a base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Rev Bras Reprod Anim*, Supl 5, p.96-98, 2002.



## Otimização do sistema de maturação *in vitro* de oócitos caprinos utilizando retinóides

*Optimization of maturity system in vitro oocytes goats using retinoids*

Adriana da Silva Costa\*, Thayze Araujo Alves, Talyta Luiza Miranda Lima, Lukas Kelvin da Silva Costa, Ricardo de Macedo Chaves, Felipe de Jesus Moraes Júnior, Madson Atila Vidal Silva, Hallef Mithchel Pereira Trovão

Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

\*E-mail: drikk\_coosta@hotmail.com

### Abstract

*The study purpose was to establish culture conditions of goat oocytes that provide achievement of structures of oocytes qualitatively similar to those produced in vivo. The ovaries were obtained in slaughter houses in the metropolitan region of São Luis - MA and Recife-PE. It was tested, on 10 replicates, the efficiency of retinol (RT) and retinoic acid (RA) on the in vitro maturation of oocytes goats, using as parameters the nuclear maturation stage. A significant difference was observed ( $P < 0.05$ ) in the percentage of matured oocytes when the MBM method was used (53%) compared to other means, demonstrating an increase in the number of expanded oocytes. There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) when compared to percentage of goat oocytes matured in medium that used the RT and RA. It is possible to suggest that this is an effective strategy that should be adopted to increase in vitro maturation.*

**Keywords:** acid, retinol, in vitro.

**Palavras-chave:** ácido, retinol, in vitro.

### Introdução

Normalmente, menos do que 1% dos oócitos são ovulados durante a vida reprodutiva de uma fêmea, e a utilização de biotécnicas visando maximizar o número de seus descendentes é uma busca constante dos grupos de pesquisa, especialmente depois do nascimento dos primeiros produtos resultantes do processo de fecundação *in vitro*. O sucesso do sistema de cultura de embriões está na habilidade de se imitar as condições *in vivo* do micro ambiente do sistema reprodutivo materno, que são necessárias para o desenvolvimento embrionário.

A Vitamina A é um termo genérico para um grupo de compostos. Existem evidências que a competência para o desenvolvimento do oócito pode ser aumentada, por meio do suporte com retinóide durante seu crescimento intrafolicular. Desta forma, o efeito benéfico da vitamina A durante o crescimento de oócitos *in vivo* pode ser reproduzido pelos derivados do retinol, adicionados ao sistema de cultivo *in vitro* onde os oócitos estavam meioticamente parados.

Duque et al. (2002) quando utilizaram AR na pré-maturação *in vitro* aumentou o número de embriões no cultivo subsequente, na maturação apresentou um efeito significativo na diferenciação precoce e melhorou o desenvolvimento e a qualidade dos blastocistos. O mesmo foi demonstrado por Lima (2004) e Bortoloto (2000), que aumentaram a formação de blastocistos bovinos, ao adicionar RE e AR ao meio quimicamente definido. Por sua vez, Cavalcanti Neto (2004), não observou alteração nos índices de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos caprinos quando adicionados RE ou AR ao meio de maturação.

### Material e Métodos

Na primeira etapa foi feita a *Colheita, seleção e maturação in vitro de oócitos*. Estes foram aspirados com auxílio de seringa de 5 mL e agulha 18 G. Em seguida, o conteúdo folicular foi depositado em cálice com o meio de lavagem. Para sedimentação e obtenção do complexo *cumulus*/oócito, este foi depositado em placa de Petri para recuperação e seleção dos oócitos. Sob lupa, os oócitos foram recolhidos com Tomcat e colocados em placa de cultura descartável de 35 x 10 mm, contendo o meio de colheita (MC), lavados três vezes e classificados e selecionados de acordo com a quantidade de células do *cumulus* e integridade do *ooplasma* com base na classificação morfológica descrita por Gonçalves et al. (2002). Após as lavagens, foram colocados, 25 oócitos em gotas de 100  $\mu$ L sob óleo de parafina estéril. Posteriormente, estes foram incubados a 39° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Então foi feita a avaliação da maturação nuclear em que parte dos oócitos foram desnudados no agitador mecânico Vortex<sup>®</sup>, por três minutos a velocidade "7", colocados entre lâmina e lamínula e fixados em etanol e ácido acético (3:1) por 12 horas e, depois corados com orceína acética a 1%, observando-se sob microscopia óptica de imersão (1000x). Depois, foram classificados como não definido (N.D.), degenerado (Deg.) vesícula germinativa (V.G.) metáfase I (MI), anáfase I (AI) telófase I (TI), metáfase II (MII). Então, foram testadas, em 10 repetições, as eficiências do retinol (RT) e do ácido retinóico (AR) utilizando como parâmetros o estágio de maturação nuclear, conforme as técnicas utilizadas por Izadyar et al. (1998).

Por fim, foi feita a análise estatísticas, em que se fez primeiro uma comparação de variâncias, teste *F* para variâncias ao nível de significância 5% ( $P < 0,05$ ). Depois um teste *t* para comparação de médias, no nível de significância 5%, para variâncias equivalentes ou variâncias distintas, conforme o que foi verificado no teste

*F* para variâncias.

### Resultados e Discussões

Ao analisar e comparar os meios MBM+RT e MBM+AR, observou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de oócitos maturados quando se utilizou o meio MBM (controle), demonstrando um acréscimo no número de oócitos expandidos. Caso contrário à porcentagem de oócitos caprinos maturados em meio que utilizaram o RT e AR, justamente por não apresentar diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Após a maturação, há diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na maioria dos estádios de maturação dos oócitos. Podemos observar nas Figura 1, fotos de oócitos após a coleta e classificação e Figura 2, oócitos na fase de Vesícula Germinativa (VG).



Figura 1. Oócitos caprinos após aspiração com seringa e agulha 18G e classificação segundo Gonçalves et al. (2002) em lupa estereoscópica.



Figura 2. Oócito na fase de Vesícula Germinativa (VG) da maturação *in vitro* após avaliação segundo técnica de Izadyar et al. (1998).

Quando se compara o estágio de maturação nuclear alcançada pelos oócitos nos três tratamentos utilizados, foi observada diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Sendo que, apenas as porcentagens dos oócitos degenerados (oócitos que se apresentam vacuolizados) e VGBD, não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) quando se utilizou o meio MBM em comparação os meios MBM+RT e MBM+AR com retinóides (Tab. 1).

Tabela 1. Estádio da maturação nuclear de oócitos de fêmeas caprinas abatidas, maturados *in vitro* em meios suplementados ou não com retinóides.

Estádio de maturação nuclear	Meios de Maturação <i>in vitro</i>		
	MBM	MBM+RE	MBM+AR
	%	%	%
Degenerados (Deg)	7 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
Não Definido (ND)	7 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Vesícula Germinativa (VG) <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
Rompimento da VG (GVBD)	11 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
Metáfase I (MI)	8 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>
Anáfase I (AI)	5 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
Telófase I (TI)	4 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>
Metáfase II (MII)	53 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>	62 <sup>b</sup>
Total	100	100	100

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) pelo teste *F*. % = porcentagem, MBM = meio básico maturação, RE = retinol, AR = ácido retinóico.

O ácido retinóico e o retinol, utilizados durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, foram acrescentados para aumentar a competência de desenvolvimento destes oócitos, o que ocorreu neste estudo com a maturação dos oócitos caprinos quando se utilizou RT (61%) e AR (62%). O resultado adverso obtido por Cavalcanti Neto (2004) ao trabalhar com o RT e o AR durante a MIV de oócitos caprinos foi explicado devido este autor ter adicionado soro sanguíneo ao meio de maturação que deve ter mascarado o efeito potencial desses retinóides.

Os resultados obtidos na análise da maturação nuclear *in vitro* dos oócitos que utilizaram retinóides no meio de cultivo estão próximos aos obtidos por Paula et al. (2008) e Carneiro (2008). As porcentagens observadas na metáfase II obtidas neste estudo no grupo MBM (controle), explicam-se pelo fato de que, em cultivo *in vitro* de oócitos e embriões caprinos ocorre uma menor proporção de oócitos que completam a maturação nuclear devido à fatores intrínsecos das células e a pouca quantidade ou ausência de células do *cumulus*.

### Conclusão

Apesar da necessidade da realização de mais estudos, é possível sugerir tratar-se de uma estratégia eficiente e que deve ser adotada para aumentar a maturação *in vitro*, com consequente aumento a produção *in vitro* de embriões caprinos.



### Referências

- Carneiro GF.** Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Tecnologias e Ciência Agropecuária*, v.2, p.23-28, 2008.
- Gonçalves PBD, Visintin JA; Oliveira MAL, Montagner MM, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002, p. 195-226.
- Paula NRO, Cardoso JFS, Oliveira MAL, Freitas VJF.** Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, n.1, p.21-35, 2008.
- Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM.** Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.339-345, 1998.
- Duque P, Gómez E, Hidalgo C, Facal N, Fernández I, Díez C.** Retinoic acid during *in vitro* maturation of bovine oocytes promotes embryonic development and early differentiation. *Theriogenology*, v.57, p.364, 2002.
- Bortoloto EB.** PDGF, Retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear maturation and their consequent effect in the embryonic development. 2000. 55p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2000.
- Cavalcanti Neto CC.** Uso do retinol na produção *in vitro* de embriões caprinos. 113p. 2004. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.
- LIMA PF.** Utilização de retinóides e fator de crescimento na produção *in vitro* de embriões bovinos. 123p. 2004. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2004.



## Parâmetros reprodutivos de caprinos da raça Canindé e Alpina Britânica nos Estados do Piauí e Ceará

*Reproductive parameters of goats of the breed Canindé and British Alpine in the States of Piauí and Ceará*

Talita Soares Câmara\*, Marcimar Silva Sousa, Karmilee dos Santos Pontes, Lucas Silva Melo, Natanael Aguiar Braga Negreiros, Bárbara Kelly Lima de Castro, David Baruc Cruvinel Lima, José Ferreira Nunes

Universidade Estadual do Ceará-UECE, Campus Itaperi, Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino – LTSCO/NIB, Fortaleza, CE, Brasil.

\*E-mail: talitavet2003@gmail.com

### Abstract

*The objective of this study was to evaluate reproductive parameters of Canindé and British Alpine goats in the states of Piauí and Ceará by measuring scrotal circumference (CE) and seminal parameters of eight animals (Canindé (4) and British Alpine (4)). Four samples were collected from each animal with the aid of an artificial vagina, after which each ejaculate was evaluated for volume, sperm concentration, total and progressive mass motility, percentage of motile spermatozoa and vigor. Data were expressed as mean and standard deviation and analyzed using the statistical program Graphpad Prism®. Although the values of progressive motility, scrotal circumference and volume were significantly higher in the British Alpine breed, the two races of the present study presented values regarding total motility and vigor within the one recommended by the CBRA. Thus, the semen of the two breeds can be used for artificial insemination, germplasm bank formation and genetic breeding.*

**Keywords:** ACP, goat, seminal quality.

**Palavras-chave:** ACP, bode, qualidade seminal.

### Introdução

A preservação de raças caprinas tem sido defendida, não só devido à importante variabilidade genética destes animais como também devido a sua contribuição para o desenvolvimento rural, principalmente junto ao homem do campo, prestando-se para a produção de carne, pele e leite. Assim, a tecnologia do sêmen possibilita a conservação e manutenção da capacidade fertilizante dos espermatozoides por longos períodos. Desta forma, este resumo teve como objetivo avaliar os parâmetros reprodutivos de caprinos da raça Canindé e Alpina Britânica, nos estados do Piauí e Ceará.

### Material e Métodos

Este trabalho foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética para uso de animais da UECE com o número: 6305558/2014. Inicialmente foi feita a mensuração da circunferência escrotal de quatro caprinos da raça Canindé e quatro da raça Alpina Britânica, utilizando uma fita métrica. Foram utilizados animais com idade entre três a cinco anos, criados nos Estados do Piauí e Ceará. O sêmen desses animais foi coletado quatro vezes, com auxílio de vagina artificial, duas vezes por semana, totalizando 24 ejaculados. Após a coleta, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (mL), concentração espermática (sptz/mL), motilidade massal (1-5), motilidade total e progressiva (0-100%), percentual de espermatozoides móveis (0-100%) e vigor (1-5) (Chemineau et al., 1991). Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e analisados através do programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados referentes à motilidade total, progressiva e massal, viabilidade e concentração espermática, volume e circunferência escrotal foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente sofreram transformação angular em Arcoseno das porcentagens e submetidos ao teste T para comparação entre as raças. Os dados referentes ao vigor espermático foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney, com resultados considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

Na Tabela 1 é possível constatar que a motilidade progressiva ( $79,81 \pm 7,00$ ), o volume ( $0,61 \pm 0,39$ ) e a circunferência escrotal ( $27,36 \pm 1,98$ ), foram significativamente superiores em caprinos da raça Alpina Britânica. Os parâmetros referentes à motilidade total, massal e vigor não apresentaram diferença significativa entre as raças. Entretanto, os valores de motilidade, concentração e vigor encontraram-se dentro do recomendado para caprinos, pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (2013), para as duas raças em estudo. Para a raça Canindé os valores de volume ( $0,38 \pm 0,14$ ) e circunferência escrotal ( $23,25 \pm 0,84$ ) encontraram-se abaixo do recomendado pelo CBRA, já para a raça Alpina Britânica, somente o de CE ( $27,36 \pm 1,98$ ). O volume médio obtido par aos ejaculados ( $0,38\text{mL}$ ) foi inferior aos  $0,7$  mL obtidos por Marinho e Nunes (1991), ao estudarem raças localmente adaptadas como Marota, Repartida e Moxotó. Chagas da Silva *et al.* (2010), ao avaliarem as



características seminais de caprinos da raça Canindé, no município de Sobral, em diferentes condições de temperatura e umidade, observaram resultados superiores quanto ao volume seminal (0,73 mL). Da mesma forma, Azevedo *et al.* (2004), ao analisarem sêmen de caprinos da raça Marota (raça localmente adaptada), no estado do Piauí, utilizando vagina artificial, obtiveram volume seminal superior ao presente estudo (0,5mL). Isso pode ser devido ao manejo alimentar dos animais desses estudos, realizado com ração e capim elefante, enquanto no presente estudo, os animais eram criados em regime extensivo. Este sistema de criação da raça Canindé pode ter refletido negativamente sobre o desenvolvimento corporal, e consequentemente, sobre o desenvolvimento testicular (CE) e volume seminal dos animais, uma vez que essas características tem correlação positiva. Esse fato também explica os valores de volume seminal significativamente superior da Alpina Britânica em relação a Canindé, uma vez que os Alpinos eram mantidos em sistema de criação intensivo. Isso também pode ser explicado devido ao fato da raça Canindé ser composta por animais de pequeno porte e de produção abaixo da obtida pelas raças exóticas, embora seja adaptada as condições climáticas do Nordeste Brasileiro.

Tabela 1. Média e erro padrão de circunferência escrotal (CE), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), concentração, viabilidade, vigor e volume (ml) do sêmen de caprinos da raça Canindé e Alpina Britânica, avaliados subjetivamente.

Parâmetros	Raça	
	Canindé	Alpina Britânica
espermáticos		
Motilidade Total (%)	84,50 ± 5,16 <sup>a</sup>	84,81 ± 7,27 <sup>a</sup>
Motilidade Progressiva (%)	75,00 ± 5,19 <sup>b</sup>	79,81 ± 7,00 <sup>a</sup>
Motilidade Massal (1-5)	3,86 ± 0,62 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,84 <sup>a</sup>
Viabilidade (%)	82,16 ± 5,91 <sup>a</sup>	74,26 ± 13,35 <sup>b</sup>
Vigor (1-5)	3,33 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,52 <sup>a</sup>
Volume (ml)	0,38 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,39 <sup>a</sup>
Circunferência escrotal (cm)	23,25 ± 0,84 <sup>b</sup>	27,36 ± 1,98 <sup>a</sup>
Concentração espermática (sptz/ml)	3,96 ± 1,26 <sup>a</sup>	3,40 ± 1,07 <sup>b</sup>

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha significa que houve diferença estatística entre as raças (P < 0,05).

### Conclusão

Embora a raça Canindé tenha apresentado valores menores quando comparada a Alpina Britânica, seus parâmetros estão dentro do padrão recomendado para a espécie caprina, podendo promover a conservação do recurso genético de raças autóctones do Nordeste Brasileiro.

### Agradecimentos

À Universidade Federal do Piauí -UFPI e Colégio Técnico de Teresina - CTT, pelo apoio técnico e laboratorial.

Aos proprietários de caprinos de Elesbão Veloso-PI e Quixadá-CE, por disponibilizarem os animais utilizados nesse experimento.

### Referências

- Azevedo DMMR, Tonioli R, Nunes JF, Villarroel ABS. Características Seminais de Caprinos Marota no Nordeste do Brasil. *Rev Cient Anim*, v.6, n.2, 2004.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame, andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.
- Chagas da Silva M, Brito IF, Barbosa Filho JAD, Andrioli A, Brasil DF, Sales FAL. Influência das variáveis ambientais sobre as características quantitativas do sêmen de caprinos das raças Canindé e Moxotó. In: *Anais... VI Congresso Nordestino de Produção Animal*. Mossoró, RN. 2010.
- Chemineau P, Cognié Y, Guérin Y, Orgeur P, Vallet JC. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome, FAO, 1991. 222 p.
- Marinho A, Nunes JF. Produção Quanti-qualitativa do sêmen de caprinos das raças nativas do Nordeste do Brasil. *Ciência Animal*, v.1, n.1, p.19-32, 1991.



## Perda gestacional em cabra transgênica para o hG-CSF

*Pregnancy loss in transgenic goat for hG-CSF*

Yara Pereira Diógenes<sup>1</sup>, \*, Maria Eduarda Monteiro Temporal Agostinho<sup>1</sup>, Aniele dos Santos Bezerra<sup>1</sup>, Samara Silva de Souza<sup>1</sup>, Francisco Carlos de Sousa<sup>2</sup>, Maurício Francisco Vieira Neto<sup>1</sup>, Vicente José Figueiredo Freitas<sup>1</sup>, Dárcio Ítalo Alves Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará - Faculdade de Veterinária, Fortaleza, CE, Brasil; <sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Crateús, CE, Brasil.

### Abstract

*The aim of this study was to report the occurrence of pregnancy loss in transgenic goat submitted to prenatal ultrasonography monitoring. We used on goat transgenic for human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF). The animal was submitted to mating after estrous synchronization. Ultrasound examinations were carried out until D60 of pregnancy by transrectal via and after D60 by transabdominal via. Some parameters were observed such as morphology, organogenesis and formation of skeletal fetuses, viability with cardiac activity and fetus movements. During all sonographic evaluations, the conceptus showed normal development of their morphology and viability. Goat had fetal development completed by D150, however, there were problems at birth and the fetus has died. In conclusion, the transgenic fetus remained viable and showed normal development during pregnancy, although still birth.*

**Keywords:** goats, pregnancy, ultrasound, transgenic.

**Palavras-chave:** caprinos, gestação, ultrassom, transgênese.

### Introdução

Durante a gestação, má formações estruturais e funcionais de tecidos, órgãos e/ou sistemas podem ocorrer nas fases de desenvolvimento embrionário ou fetal em diferentes espécies animais, podendo ser de causa infecciosa ou não (Radostitis et al., 2007). Além disso, perdas fetais têm sido relatadas com frequência em animais transgênicos (Baldassarre et al., 2004).

O acompanhamento da gestação de caprinos transgênicos por ultrassonografia mostra-se uma importante ferramenta no diagnóstico precoce de possíveis patologias. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi relatar a ocorrência de perda gestacional em cabra transgênica submetida a monitoramento ultrassonográfico pré-natal.

### Material e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (no. 10244447-1/24). Adicionalmente, desde 2006, o LFCR recebeu da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) de nº 0228/06.

Foi utilizada uma fêmea caprina transgênica para o hG-CSF (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano) da raça Canindé, com aproximadamente 6 anos de idade. O animal foi gerado a partir da inseminação artificial de fêmea não transgênica com sêmen fresco de macho transgênico fundador (Linhagem 10M, Freitas et al., 2012).

A cabra foi mantida em sistema semi-intensivo de produção. Para sincronização do estro, a fêmea foi submetida a protocolo utilizando esponja intravaginal contendo 60mg de acetato de medroxiprogesterona, D-cloprostenol e eCG, por 11 dias. O dia da monta natural foi considerado D0. Para o acompanhamento embrionário/fetal foi utilizado o equipamento de ultrassom Doppler (CTS-8800V®, SIUI, Jiangsu, China), acoplado a sonda linear transretal (até o D60) e convexa transabdominal (após D60).

No D25 e D30 foram feitas análises em modo B para mensuração do tamanho da vesícula e tamanho do feto. Do D45 ao D75 foram realizadas mensurações do tórax, abdômen e cabeça, bem como avaliação da frequência cardíaca. A partir do D90 foi determinado o diâmetro biparietal.

### Resultados e Discussão

Foi verificada a prenhez da cabra do experimento aos 20 dias após a inseminação artificial e a mesma permaneceu saudável durante o experimento. Nas avaliações ultrassonográficas o conceito mostrou desenvolvimento normal até o fim da gestação.

Aos 30 dias, o embrião apresentava forma arredondada, sem diferenciação das regiões cranial e caudal. O início da diferenciação destas regiões ocorreu após 40 dias de gestação. Na cavidade abdominal foram identificados os compartimentos gástricos aos 60 dias, apresentando-se como uma câmara anecoica na porção cranial do abdômen. No mesmo período, o fígado apresentou-se como uma área entre o tórax e abdômen com homogênea ecogenicidade. Os rins foram identificados. A bexiga foi visualizada na parte caudal do abdômen. Todos os órgãos fetais mostraram ecogenicidade e desenvolvimento considerados normais para a espécie caprina (Léga et al., 2003).



Aos 50 dias de gestação, foi possível observar claramente as órbitas, costelas e ossos longos. As duas órbitas foram identificadas como áreas hipocogênicas circulares na região superior do crânio. Aos 60 dias, todas as estruturas ósseas foram visualizadas.

No D150, foi feito um novo exame ultrassonográfico, a fim de avaliar se havia sofrimento fetal. Foi observado diminuição de líquido amniótico e redução da frequência cardíaca. Nesse mesmo dia foi feita uma indução ao parto usando 0,5 mL de ciprionato de estradiol (ECP) por via intramuscular (IM). A cabra foi monitorada durante as 24 horas subsequentes à aplicação de ECP para avaliar a evolução do parto. Também foram administrados 2,5 mL de dexametasona por via IM e 15 mL via subcutânea de cálcio. O animal entrou em trabalho de parto. No entanto, devido ao mal posicionamento fetal (flexão ventral da cabeça) e à pouca dilatação da cérvix, optou-se pela cesariana. O produto foi um feto macho, anatomicamente normal, natimorto.

### **Conclusão**

O feto transgênico em estudo manteve-se viável e mostrou desenvolvimento normal durante a gestação, embora tenha apresentado natimortalidade. Portanto, como nas demais fêmeas, é interessante que se faça o acompanhamento pré e trans natal para que se intervenha em tempo hábil nos casos de distorcias de origem materna ou fetal.

### **Referências**

- Baldassarre H, Wang B, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN.** State of the art in the production of transgenic goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, n.4, p.465-470, 2004.
- Freitas VJF, Serova IA, Moura RR, Andreeva LE, Melo LM, Teixeira DÍA, Pereira AF, LOPES Júnior ES, Dias LPB, Nunes-Pinheiro DCS, Sousa FC, Alcântara-Neto AS, Albuquerque ES, Melo CHS, Rodrigues VHV, Batista R ITP, Dvoryanchikov GA, Serov OL.** The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*, v.105, n.1-3, p.105-113, 2012.
- Léga E, Toniollo GH, Resende KT.** Acompanhamento ultra-sonográfico transabdominal em modo-B dos primeiros 60 dias de gestação na cabra doméstica. *Ars Veterinária*, v.19, p.156-165, 2003.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD.** *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, p.132-137, 2007.



## **Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* em caprinos da cidade de Bom Jesus -PI**

*Research of anti-Brucella abortus antibodies in goats of Bom Jesus - PI*

**Janara Laís Xavier Bispo Mendes<sup>1</sup>\*, Fernando Maciel de Carvalho<sup>1</sup>, André Nogueira dos Santos<sup>1</sup>, Azimiro Quirino de Oliveira Neto<sup>1</sup>, Dianna Soares do Bomfim<sup>1</sup>, Fernando Lucas da Silva Pereira<sup>1</sup>, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>2</sup>, Larissa Maria Feitosa Gonçalves<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Curso de Medicina Veterinária; <sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: janara\_lais@hotmail.com

### **Abstract**

*Brucellosis is a disease of zoonotic character, of great global importance, caused by bacteria of the genus Brucella that affects several animal species. In goats is caused by Brucella abortus and Brucella mellitensis, having as main implications abortion in females and epididymitis in males. The aim of this work was research anti-Brucella abortus antibodies in the herd goats in the city of Bom Jesus, Piauí. Blood samples were collected from 74 animals without defined breed. Obtaining the serum was accomplished at the Clinical Pathology Laboratory in Campus Professora Cinobelina Elvas - UFPI, the material was sent to the Physiopathology of Animal reproduction of Campus Ministro Petrônio Portela in Teresina- PI, where was held the serological diagnostic through Serum Agglutination test with Buffered Acid Antigen (AAT). The animals were not reactive to the test, possibly because of some factors such as hygiene, lack of flooded areas and animals have no contact with cattle.*

**Keywords:** brucellosis, abortion, diagnostic.

**Palavras-chave:** brucelose, aborto, diagnóstico.

### **Introdução**

O Brasil busca aumentar cada vez mais seu percentual na produção animal, percebendo a necessidade de melhorar a qualidade de seus produtos principalmente no que diz respeito à sanidade. Os requisitos para que o país mantenha-se exportando e expandindo sua competitividade no mercado estão voltados para os programas direcionados à sanidade animal, erradicação e controle de doenças através da vacinação, profilaxia e tratamento (Ufla, 2012).

A caprinocultura é uma atividade explorada em vários continentes, estando presente em locais que apresentam diferentes características climáticas. No Nordeste esta atividade é muito importante e representa um impacto na economia, na sociedade e na cultura. Considerando esses fatores, os cuidados com a sanidade são relevantes (Silva, 2015). O rebanho nacional de caprinos em 2014 alcançou 8.851.879 cabeças, sendo 8.109.672 cabeças na Região Nordeste 91,6% (Magalhães et. al., 2014).

A brucelose é uma doença crônica que acomete os animais e seres humanos, sendo uma zoonose muito difundida no mundo com uma estimativa de 500.000 casos por ano, representando um problema no âmbito econômico e de saúde pública (Xavier et. al., 2010).

Em humanos o grupo de risco engloba pessoas que tem contato direto com os animais infectados, dentre eles, veterinários, tratadores e pessoas que trabalham em laboratório (Bevilacqua, 2008).

Visto a importância da enfermidade, não só para a produção animal mais também a saúde pública, objetivou-se com este trabalho pesquisar a presença de anticorpos anti-*Brucella abortus* em caprinos da cidade de Bom Jesus-PI.

### **Material e Métodos**

Foram colhidas 74 amostras sanguíneas de caprinos na cidade de Bom Jesus- PI em Junho de 2016 onde os animais eram criados em sistema semi-intensivo, sendo estes sem raça definida, de ambos os sexos, e de diferentes idades. A coleta foi feita pelo método de venopunção da jugular, em tubos para a coleta a vácuo utilizando agulhas descartáveis sendo coletados 38 animais da zona rural e 36 animais da zona urbana. Na ocasião da coleta, cada animal foi cadastrado em um formulário contendo o nome da fazenda e dados com informações sobre sexo, pelagem, colar e tatuagem. Posteriormente os tubos contendo as amostras de sangue, foram mantidos sob refrigeração em isopor contendo gelo.

Após a colheita as amostras foram levadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Piauí, Campus Prof.<sup>a</sup> Cinobelina Elvas, e então centrifugadas a 2500rpm durante 10 minutos para obtenção do soro que foram armazenados em microtubos tipo “ependorf”, identificados e mantidos em freezer -20°.

O diagnóstico para detecção dos anticorpos anti-*Brucella abortus* foi realizado pelo Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela em



Teresina-Piauí, por meio do Teste de Soro Aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado. Colocou-se 30 µL de cada soro sobre uma placa de vidro (placa de Huddlesson), sequencialmente foi adicionado 30 µL do antígeno ao lado do soro e então os dois foram misturados com movimentos circulatorios de modo a obter um pequeno círculo. A placa foi agitada em movimentos oscilatórios por quatro minutos e a leitura do resultado feita em caixa com luz indireta. Na interpretação dos resultados considera-se o soro reagente quando há formação de grumos. Na ausência destes o soro é não reagente.

### Resultados e Discussão

Das 74 amostras de soro avaliadas, nenhuma (0%) foi reagente ao Teste de Soro Aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para *B. abortus*.

Algumas medidas sanitárias são de extrema importância para evitar novos casos entre os animais, dentre elas, o tratamento de esterco, uso de produtos de desinfecção como a formalina e o cloreto de cal, que causam destruição rápida e segura das *Brucellas* (Poester et al., 2002; Schuring et al., 2002). Nos locais pesquisados averiguou-se que é realizado a limpeza, bem como, uso da cal no esterco para evitar proliferação e aparecimento de bactérias.

De acordo com Alves et al. (2009), propriedades onde há áreas alagadas favorecem a manutenção da bactéria, sendo uma variável associada à presença da mesma. Nos locais pesquisados, essa característica não foi encontrada, bem como, nenhum outro fator ambiental que fosse favorável ao aparecimento e manutenção do agente.

A aquisição de novos animais, feita de modo descontrolado, sem o uso de quarentena e métodos sorológicos de triagem constitui um fator de risco para a introdução da doença no rebanho (Fernandes, 2012). Nas criações analisadas, a introdução de animais não acontece por no mínimo dois anos, ação esta que pode ter contribuído para não instalação da enfermidade.

O resultado do presente trabalho divergiu do encontrado por Júnior et al. (2008) em Pernambuco, onde foi observado uma prevalência de 0,6% de caprinos soropositivos para brucelose, de um total de 340 caprinos examinados, onde o tamanho amostral foi consideravelmente maior do que o da nossa pesquisa, que, no entanto, buscou ter conhecimento das propriedades pesquisadas e não de uma região maior.

O manejo quando realizado por poucos ou por um único funcionário, de acordo com Leite et al. (2014), serve como fator de proteção contra a doença. A conclusão disso seria o papel do homem como possível propagador do agente etiológico, ajudando então na transmissão e propagação da doença. Assemelha-se que o manejo em ambas aconteça com um número mínimo de funcionários na zona rural, porém na zona urbana devido a fazenda ser utilizada para experimentação ocorre movimentação de várias pessoas.

### Conclusão

Não foram encontrados anticorpos anti-*Brucella* abortos, na espécie caprina na cidade de Bom Jesus.

### Referências

- Alves AJS, Gonçalves VSP, Figueiredo VCF, Lôbo JR, Bahiense L, Amaku M, Ferreira F, Neto JSF, Dias RA. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, supl.1, p.6-13, 2009.
- Fernandes MOL. Brucelose dos pequenos ruminantes: estudo de focos na área administrativa da divisão de intervenção veterinária de Vila Real. 2012. Tese (Doutorado). Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal, 2012.
- Júnior JWP, Souza MMA, Guerra NR, Santana VLA, Mota RA. Frequência de aglutininas Anti-*Brucella abortus* em caprinos e ovinos do sertão do estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc Anim Bras*, v.9, n.4, p. 1096-1101, 2008.
- 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, n.6, p.537-541, 2014.
- Bevilacqua MR. Brucelose em Bovinos. (Monografia). Especialização em Defesa e Vigilância Sanitária. Campo Grande, MS: Universidade Castelo Branco 2008. 28p.
- Magalhães KA, Martins EC, Sousa JDF, Barbosa CMP, Guimarães VP. Paranoma e perspectiva nacional da Ovinocultura e Caprinocultura, 2014.
- Poester FP, Gonçalves VS, Lage AP. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*, v.90, n.1-4, p. 55-62, 2002.
- Silva GCP. Caracterização epidemiológica de Brucelose e Leptospirose de pequenos ruminantes dos estados de Sergipe, Bahia, Ceará e Paraíba. 112f. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2015.
- Schuring GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future *Vet Microbiol*, v.90, n.1-4, p. 479-496, 2002.
- Xavier MN, Paixão TA, Den Hartigh AB, Tsolis RM, Santos RL. Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J*, v.4, p.109-118, 2010.



## Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* em ovinos do Colégio Técnico da cidade de Bom Jesus-PI

*Research of anti-Brucella abortus in sheep Technical College of Bom Jesus-PI*

Janara Laís Xavier Bispo Mendes<sup>1</sup>\*, Fernando Maciel de Carvalho<sup>1</sup>, Dianna Soares do Bomfim<sup>1</sup>, André Nogueira dos Santos<sup>1</sup>, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>2</sup>, Larissa Maria Feitosa Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Curso de Medicina Veterinária; <sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: janara\_lais@hotmail.com

### Abstract

*Brucellosis is an infectious disease of the zoonotic character, caused by bacteria of Brucella genus which affects several species. In sheep is caused by Brucella ovis, Brucella melitensis and Brucella abortus, resulting in economic losses, causing reproductive disorders such as epididymitis, orchitis and miscarriages. The objective of this work was research of agglutinins anti-Brucella abortus in sheeps of Colégio Técnico de Bom Jesus-PI. It was collected 55 blood samples from animals of different ages to obtain the serum by centrifugation, held in the laboratory of clinical pathology, Campus Professora Cinobelina Elvas - UFPI, the material was sent to the Animal Reproduction Pathophysiology Laboratory, Campus Ministro Petrônio Portela - UFPI, where conducted serological diagnosis through serum agglutination test Antigen with Buffered Acidified (AAT). The animals were negative to the test, possibly due to the absence of some risk factors for the occurrence of the disease.*

**Keywords:** epididymitis, brucellosis, serum.

**Palavras-chave:** epididimite, brucelose, soro.

### Introdução

A Brucelose é uma doença causada por membros do gênero *Brucella*. É uma enfermidade infectocontagiosa, sendo a zoonose mais frequente no mundo. Trata-se de uma doença de importância universal que acomete várias espécies animais (Pires, 2010). As diferentes espécies de *Brucella* apresentam preferência por hospedeiros, e diferem quanto à gravidade da infecção. Existem seis espécies de *Brucella* sendo: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. suis*. As espécies de *Brucella* se diferenciam pelas características coloniais, testes bioquímicos, requerimentos culturais específicos e pela inibição do crescimento por corantes (Quinn et al., 2005).

São parasitas obrigatórios que necessitam de um animal hospedeiro para sua manutenção, a infecção tem predileção a se localizar no sistema retículo endotelial e sistema genital, tendo como sinais clínicos mais frequentes em fêmeas o aborto, e em machos orquite e epididimite, infecções crônicas também são muito comuns (Hirsh e Zee, 2003).

O grupo com maior risco de contaminação pela *Brucella* é composto por veterinários, tratadores, laboratoristas e pessoas que trabalham diretamente com produtos ou subprodutos de origem animal, devido ao fato de terem contato direto com os animais infectados (Cal et al., 2014). Diante desses fatos, é necessária a conscientização da importância dos cuidados sanitários (Pires, 2010).

A doença foi descrita em praticamente todos os países onde se explora a ovinocultura, sendo considerada uma das principais causas de perdas reprodutivas desta espécie animal (Pires, 2010). A brucelose ovina é uma doença infecciosa crônica dos ovinos causada pela *Brucella ovis*, *Brucella melitensis* e *Brucella abortus*, é caracterizada clinicamente pela presença de vários graus de epididimite e orquite em carneiros, placentite e aborto em ovelhas e alta mortalidade de cordeiros (Radostits et al., 2002).

Desta forma, objetivou-se com este trabalho pesquisar aglutininas anti-*Brucella abortus*, em ovinos do Colégio Técnico da Cidade de Bom Jesus- PI, visto que tal enfermidade é de grande importância para a atividade pecuarista e na Saúde Pública.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Federal do Piauí, *Campus* Professora Cinobelina Elvas da cidade de Bom Jesus-PI, o município está situado ao Sul do estado do Piauí, na microrregião do Alto-Médio Gurguéia sob as coordenadas: 08°30' de latitude sul, 43°46' de longitude oeste e altitude de 230m (Vasconcelos et al., 2013). Para realização do presente trabalho foram colhidas amostras sanguíneas de 55 ovinos de diferentes idades e sexo, sem qualquer sintoma clínico da enfermidade.

As coletas foram realizadas em Junho de 2016, de modo asséptico, utilizando-se algodão, álcool e luvas para obtenção do material. Empregou-se o método de punção da veia jugular, em tubos para coleta de sangue a vácuo (vacutainer) sem anticoagulante, utilizando-se agulhas descartáveis estéreis. A identificação dos tubos foi de acordo com a identificação do número no colar dos animais. Em seguida os tubos contendo as amostras de sangue, foram mantidos sob refrigeração em uma caixa de isopor contendo gelo.



Após a coleta o material foi levado ao laboratório de patologia clínica da Universidade Federal do Piauí *Campus* Professora Cinobelina Elvas e centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro. As amostras de soro foram armazenadas em microtubos tipo “ependorf” identificados e mantidos a -20°C em freezer.

O diagnóstico para detecção dos anticorpos anti-*Brucella abortus* foi realizado pelo Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Petrônio Portela em Teresina-Piauí, por meio do Teste de Soro Aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Foram colocados 30 µL de cada soro sobre uma placa de vidro (placa de Huddleson), feito isto foi adicionado 30 µL do antígeno ao lado do soro e então os dois foram misturados em movimentos circulatorios de modo a obter um pequeno círculo. A placa foi agitada em movimentos oscilatórios por quatro minutos e a leitura do resultado feita em caixa com luz indireta. Na interpretação dos resultados considera-se o soro reagente quando há formação de grumos, na ausência destes o soro é não reagente.

### Resultados e Discussão

Das 55 amostras analisadas, nenhuma (0%) foi reagente ao Teste de Soro Aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).

Sugere-se que a ausência de casos positivos no presente trabalho, seja pelo fato de não haver criação consorciada com bovinos, onde esses animais quando contaminados, propagam a bactéria ao meio ambiente, podendo assim servir de fonte de infecção aos ovinos causando problemas reprodutivos, o resultado foi semelhante ao encontrado por Salaberry et al. (2011) no município de Uberlândia, MG onde não foram detectados ovinos reagentes a *Brucella abortus*, onde utilizou-se o mesmo teste de Soro Aglutinação em Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).

A propriedade em questão não possui áreas alagadiças ou qualquer outro tipo de ambiente que seja capaz de tornar favorável à manutenção da bactéria, no que diz respeito a baixa temperatura ou umidade. A assistência técnica de Médicos Veterinários e Zootecnista esta presente proporcionando assim boas condições de manejo e higienização das instalações corroborando com os resultados de Carneiro Junior (2005) em Feira de Santana e Jaguarari na Bahia, onde as condições sanitárias e higiênicas não eram favoráveis e os animais recebiam poucos cuidados com manejo, o que mostrou uma relação direta com a soropositividade dos animais estudados.

O presente trabalho não divergiu do trabalho de Silva, Silva e Hansen (1982), que coletaram 1057 ovinos de ambos os sexos, as fêmeas já em reprodução, e machos com idade superior a 1,5. Onde utilizou-se o mesmo teste de diagnóstico e todas as amostras foram negativas.

Outro fator crucial é o fato da não realização de compra, visto que os animais foram adquiridos há cerca de 4 anos. A ausência de fatores considerados de risco para a ocorrência da doença pode ajudar a explicar o resultado negativo do presente trabalho.

Assim embora a Brucelose não seja um problema que acometa este rebanho ovino, deve-se ressaltar a necessidade de adoção de medidas sanitárias para impedir a introdução da zoonose, neste Colégio Técnico da cidade de Bom Jesus, PI.

### Conclusão

Não foram encontrados anticorpos anti-*Brucella abortus* nos ovinos, confirmando que a doença não está presente no Colégio Técnico da cidade de Bom Jesus-PI.

### Referências

- Cal CAMF, Valente LC, Pereira MLC, Mota MA, Silva VYNE, Kashiwabara TGB. Brucelose: Uma Revisão de Literatura. v.6, n.3, p.53-56, 2014.
- Hirsh DC, Zee YC. Microbiologia Veterinária. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, cap.37, p.185-191, 2003.
- Júnior C, Zacharias F, Pacheco ST, Limaf WM. Investigação da soropositividade para Brucelose em rebanhos caprinos produtores de leite para consumo humano. Rev Bras Saúde Prod Anim, v.6, n.2, p.53-58, 2005.
- Pires AV. Bovinocultura de Corte. Piracicaba: FEALQ, V. II, p. 959-970, 2010.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porta Alegre: Artmed. Cap.28, p.166-171, 2005.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 18, p.778-800, 2002.
- Salaberry SRS, Paulin LM, Santana RL, Castro JR, Castro JR, Ribeiro AMCL. Pesquisa de Anticorpos Anti-*Brucella abortus* e Anti-*Brucella ovis* em Ovinos no Município de Uberlândia, MG. Arq Bras Med Vet Zootec, v.63, n.4, p.1022-1024, 2011.
- Silva AED, Silva MUD, Hansen D. Brucelose (*Brucella abortus*) como possível causa de aborto, epidimiteorquite em caprinos e ovinos no Ceará. Rev Bras Reprod Anim, v.6, p.25-29, 1982.
- Vasconcelos DV, Sousa VF, Viana TVA, Azevedo BM, Sousa GG, Cavalcante Júnior JAH. Interação entre níveis de irrigação e fertilização potássica na cultura do maracujazeiro. Irrigação, Botucatu, v.18, n.1, p.160-170, 2013.



## Protocolos de sincronização do estro e ovulação seguidos de inseminação artificial em tempo fixo em ovelhas deslanadas: Resultados preliminares

*Synchronization protocols of oestrus and ovulation followed artificial insemination in fixed time in woolless sheep: Preliminary results*

Marcimar Silva Sousa<sup>1,\*</sup>, José Ferreira Nunes<sup>1</sup>, Cristiane Clemente Mello Salgueiro<sup>2</sup>, Talita Soares Câmara<sup>1</sup>, Alex Altair Costa Machado<sup>1</sup>, Renata Holanda de Paula Pessoa<sup>1</sup>, Natanael Aguiar Braga Negreiros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia do Sêmen, Núcleo Integrado de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (LTSCO/NIB/PPGCV/UECE); <sup>2</sup>ACP Biotecnologia/UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

\*E-mail: marcimarmv@hotmail.com

### Abstract

*The objective of this study was to evaluate the oestrus and pregnancy using seven and 14 days synchronization protocol followed by fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep, 50 ewes were selected and divided into two groups: G-14 (n = 25) and G-07 (n = 25). Were inserted vaginal sponges that remained for seven and 14 days, time when were applied e.G.C. and Cloroprostenol, this only in the G-07. Oestrus and FTAI were 55 hours after. It was used sperm diluted in ACP-102 with 5% egg yolk, and refrigerated at 4 °C for four hours. The results were: oestrus rates of 60% and 84%; pregnancy rates of 56% and 72%; lambing of 48% and 68%, for G-07 and G-14, respectively (P > 0.05). In conclusion, the short protocol was effective in synchronizing estrus woolless sheep, as well as long-term protocol.*

**Key words:** Fixed-time artificial insemination, sheep, synchronization.

**Palavras-chave:** Inseminação artificial em tempo fixo, ovelhas, sincronização.

### Introdução

A sincronização do estro é uma biotécnica reprodutiva que permite a concentração de estro em um determinado período, possibilitando o emprego até mesmo na inseminação artificial em tempo fixo - IATF (Moraes et al., 2008). Para a aplicação desta biotécnica, faz-se, necessário um tratamento com progestágenos ou progesterona durante 12 a 14 dias (Abacia et al., 2011; Viñoles et al., 2001) associado a uma aplicação de e.C.G. Tratamentos alternativos, de curta duração (5 a 7 dias), de progesterona para sincronização de estro de ovelhas estão sendo sugeridos por Martemucci e D'Alessandro (2011a) e Fleisch et al. (2012); no entanto, há uma necessidade de melhor esclarecimento quanto do uso de acetato de medroxiprogesterona (MAP) por esse período. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a taxa de estro e gestação utilizando protocolo de sincronização de 7 e 14 dias de progestágeno MAP e seguido de IATF em ovelhas deslanadas.

### Material e Métodos

O estudo foi executado em propriedade particular no município de Trairí-CE, onde foram selecionadas 50 ovelhas sem raça definida, com idade entre dois e cinco anos e escore de condição corporal (ECC) de 2,5. As ovelhas foram distribuídas em dois grupos homogêneos (idade e ECC) com 25 animais cada: Grupo de 14 dias (G-14) e Grupo de 07 dias (G-07). Os protocolos hormonais iniciaram com o G-14, no qual foi colocado esponjas vaginais impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona – MAP (Progespon<sup>®</sup>, Zoets) na porção cranial da vagina, onde permaneceram por 14 dias e retiradas. Após sete dias do início do G-14, iniciou-se o tratamento do G-07 onde foram colocadas as esponjas de MAP que permaneceram por 07 dias e foram retiradas ao mesmo tempo nos dois grupos. No momento da retirada das esponjas, foram aplicados 200 UI/IM de Gonadotrofina Coriônica equina – e.G.C. (NOVORMON<sup>®</sup> Schering-Plough) e uma dose de 125 µg/IM de Cloroprostenol (Ciosin<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal) no G-07. Após 55 horas da retirada da esponja, foi realizada a IATF, juntamente com a avaliação de estro através da presença de muco vaginal. O sêmen utilizado foi coletado com um vagina artificial de um carneiro da raça Santa Inês e outro da raça Doper. Após a coleta, o sêmen foi avaliado de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), em seguida diluído em ACP-102 (ACP Biotecnologia) acrescido de 5% de gema de ovo, na concentração de 1 x 10<sup>9</sup> spz/ml e refrigerado a 4 °C, por quatro horas. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 ml no momento da inseminação artificial. A IATF foi realizada por via cervical superficial, empregando-se um espelho vaginal com foco de luz e pipeta aplicador de sêmen do modelo francês. O diagnóstico de gestação foi realizado 50 dias após a IATF por meio de ultrassonografia transabdominal (Mindray, DP-20 Vet. Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System), utilizando um transdutor convexo de 5 MHz. A taxa de gestação, estro e parição foram agrupadas em tabelas de contingência e comparadas pelo Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) 5% de probabilidade.



### Resultados e Discussão

As características de estro no momento da IA foram de 60% (15/25) e 84% (21/25) para o G-07 e G-14 ( $p > 0,05$ ), respectivamente. Fleisch et al. (2012) testando dois protocolos de sincronização do estro de seis dias em ovelha, apresentaram taxas de estro de 95,9 e 93,2%, sendo estas com tendência a ser superiores a apresentada no protocolo de curta duração deste estudo. No entanto, Castilho et al. (2012) descrevem taxas de estro em ovelhas Sulffolk de 57,7 e 69,6% para os protocolos utilizando MAP por seis e nove dias, respectivamente. No mesmo estudo, apresentam 80% de estro em ovelhas tratadas por 14 dias. Com relação à taxa de prenhez, o G-07 apresentou 56% (14/25), e o G-14 72% (18/25) ( $p > 0,05$ ). Castilho et al. (2012) descrevem taxas de 34,8 e 44,0% em estudo que comparou protocolos de nove e 14 dia, sendo que, estes resultados tende a ser inferior aos apresentados no presente estudo. Comparando CIDR e MAP por 14 dia, Padilha et al. (2011) mostraram taxas de estro de 100 e 95% e taxas de gestação de 25 e 80%, respectivamente. A taxa de parição foi de 48% (12/25) para o G-07 e 68% (17/25) para o G-14 ( $p > 0,05$ ). Fleisch et al. (2012), utilizando Chronogest e CIDR por seis dias, descrevem taxas de parição de 48,3% e 51,4%, respectivamente no primeiro período de monta após a sincronização. Embora esses resultados de Fleisch et al. (2012) foram obtidos por meio de monta natural, eles apresentam de forma semelhantes aos encontrados no presente estudo. Vale ressaltar que, uma ovelha do G-14 abortou no 3º mês após a IATF e duas ovelhas do G-07 morreram, sendo uma no momento do parto, apresentando sintomatologia de toxemia da gestação.

### Conclusão e Perspectivas

O protocolo de sincronização do estro utilizando MAP por sete ou 14 dias pode ser utilizado em ovelhas deslanadas. Mais estudos devem ser executados para que seja capaz de prever qual a eficiência do protocolo de curta duração e grandes rebanhos.

### Referências

- Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A.** Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.27, p.67-79, 2011.
- Castilho C, Almeida MF, Costa MZ, Cesare ÂG, Gabriel Filho LRA.** A. Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas. *Ciênc Anim Bras*, v. 14, n. 1, p. 91-7, 2013.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 3a. ed. 2013.
- Fleisch A, Werne S, Heckendorn F, Hartnack S, Piechotta M, Bollwein H, Thun R, Janett F.** Comparison of 6-day progestagen treatment with Chronogest® CR and Eazi-breed™ CIDR® G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. *Small Ruminant Research*, v. 107, p. 141-6, 2012.
- Martemucci G, D'Alessandro AG.** Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF<sub>2α</sub>, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim Reprod Sci*, v.123, p.32-9, 2011.
- Moraes JCF, Souza CJH, Gonçalves PBD, Freitas VJF, Lopes Júnior ES.** Controle do estro e ovulação em ruminantes. In: Gonçalves, PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca, 2a. ed. 2008. p.83.
- Padilha RT, Magalhães D, A Maia-Junior, A Brasil, A Araújo.** Efeito de diferentes dispositivos intravaginais na sincronização estral e taxa de gestação em ovelhas deslanadas submetida a IATF via cervical superficial com sêmen resfriado. *Rev Bras Ciênc Agrár*, v.6, p.538-43, 2011.
- Viñoles C, Forsberg M, Banchemo G, Rubianes E.** Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.



## Qualidade do sêmen caprino diluído em tris contendo diferentes formulações do extrato bruto de *mauritia flexuosa*

*Sperm quality goat diluted in three different formulations containing extract of crude mauritia flexuosa*

Alberto Pereira de Araujo Neto<sup>1, \*</sup>, Tuanny Creusa Medeiros Damasceno<sup>2</sup>, Kenney de Paiva Porfirio<sup>3</sup>, Marlene Sipauva de Oliveira<sup>4</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>5</sup>, Janaina de Fatima Saraiva Cardoso<sup>5</sup>, Danilo de Sousa Lima<sup>6</sup>, Caio Barbosa Brasileiro<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Piauí; <sup>2</sup>Mestranda em Ciência Animal na Universidade Federal do Piauí; <sup>3</sup>Mestrando em Ciência Animal na Universidade Federal do Piauí; <sup>4</sup>Doutoranda em Ciência Animal na Universidade Federal do Piauí; <sup>5</sup>Professor no departamento de clínica e cirurgia veterinária na Universidade Federal do Piauí; <sup>6</sup>Mestre em zootecnia e Médico Veterinário da ouro fino, Picos, PI; <sup>7</sup>Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: alberto14bnj@gmail.com

### Abstract

*The need for scientific development in goat became larger in order to subsidize farmers with biotechnology to animal breeding. The advent of frozen semen increased by male progeny, possible manipulation and genetic material storage. It seeks to diluents free of animal substances, to ensure food safety in biological processes. The objective of this research was seminal diluent develop using Mauritia flexuosa extract as an additive. Obtaining the extract was from dehydrated raw materials, semen collection was performed with artificial vagina and in vitro spermatoc evaluation through full force and motility. The extract prepared in TRIS diluent is included at different concentrations. Semen was diluted and evaluated the heat resistance at 37°C. We evaluated the membrane integrity after 5, 10, 15, 30, 60 and 120 minutes of incubation at 37°C. It was concluded that significant differences were observed using Mauritia flexuosa extract.*

**Keywords:** buriti, dilution, sêmen.

**Palavras chave:** buriti, diluição, sêmem.

### Introdução

A caprinocultura é uma das práticas pecuárias mais antigas do Brasil. Ocorre em todas as cinco grandes regiões do país, mas é mais presente no Nordeste (IBGE, 2012). Diante disto vem a necessidade do desenvolvimento científico de novas tecnologias aplicáveis deixando a atividade mais produtiva e rentável, como as biotecnologias aplicadas à reprodução animal (Bergstein et al., 2014). O advento do sêmen congelado trouxe uma nova dimensão para a inseminação artificial, possibilitando o melhoramento genético dos rebanhos pela capacidade de aumentar a progênie por macho em diversos lugares simultaneamente (Bittencourt et al., 2013).

Diversos países, diante do risco de introdução de doenças exóticas, têm buscado por diluentes que não contenham substâncias de origem animal, demonstrado a necessidade de garantir elevada segurança sanitária nos processos biológicos (Bousseau et al., 1998). Desse modo, a busca de produtos naturais e/ou aditivos alternativos atendem bem a demanda por produtos seguros do ponto de vista sanitário podendo gerar bioprodutos com tecnologia nacional para atender o mercado interno com um custo inferior ao dos bioprodutos importados, gerando renda e empregos no estado do Piauí, neste contexto o objetivo desta pesquisa foi desenvolver diluente seminal utilizando extrato de *Mauritia flexuosa* como aditivo para o sêmen de caprinos.

### Material e Métodos

A obtenção do extrato bruto de *Mauritia flexuosa* foi obtido a partir de matéria prima desidratada.

A coleta do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor de vidro e graduado. As coletas foram realizadas ao final da tarde, buscando causar o mínimo de estresse nos animais. O sêmen é avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, massa, percentual de espermatozoides móveis e vigor, de acordo com a metodologia empregada por CBRA (1988). Somente os ejaculados com motilidade total  $\geq 80\%$ , vigor  $\geq 3$  e motilidade massa  $l \geq 3$  foram utilizados no estudo. Foram utilizados 15 ejaculados (n=15).

Para avaliação espermática in vitro foi avaliado a motilidade espermática total e vigor, em escala de 0 (sem movimento) a 5 (com movimento progressivo rápido), é subjetivamente avaliada através de microscópio ótico em aumento de 100x e 400x, respectivamente. Esfregaços corados com Rosa Bengala são preparados para avaliação da morfologia espermática (200 células/lâmina) através de microscópio ótico (1000x) com óleo de imersão. Para avaliar a integridade funcional da membrana espermática, as amostras foram submetidas ao teste hiposmótico (Lopes et al., 2009). Uma alíquota de 0,01 mL de sêmen foi diluída em 0,09 ml da solução hiposmótica e incubada em banho Maria a 37°C por 45 minutos. As análises foram realizadas através de microscópio ótico (400x), avaliando 100 espermatozoides por amostra. Espermatozoides com cauda enrolada foram considerados com membrana funcional. O extrato bruto foi preparado utilizando os seguintes métodos e/ou soluções:

1. Extrato bruto preparado a frio em citrato de sódio a 5%: a matéria prima foi triturada; 20g do produto será homogeneizado em 100 mL de solução de citrato de sódio a 5% mantido resfriado.



2. Extrato bruto preparado a frio em salina fisiológica: a matéria prima foi triturada; 20g do produto será homogeneizado em 100 mL de solução salina fisiológica mantido resfriado.

3. Extrato bruto preparado a quente em água destilada a matéria prima foi triturada; 20g do produto será homogeneizado em 100 mL de água destilada fervente.

4. Extrato bruto preparado a quente em salina fisiológica: a matéria prima foi triturada; 20g do produto será homogeneizado em 100 mL de solução salina fisiológica aquecida a 50°C.

5. Extrato bruto preparado a frio em citrato de sódio a 5%: a matéria prima foi triturada; 20g do produto será homogeneizado em 100 mL de solução de citrato de sódio a 5% aquecida a 50°C. O extrato preparado foi incluído em diluente TRIS nas concentrações de 1%, 2,5%, 5 % e 10%. O sêmen foi diluído e avaliado a termorresistência a 37°C. Neste teste, é realizada a avaliação dos parâmetros de motilidade, vigor e avaliação da morfologia espermática, integridade funcional de membrana após 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C em banho-maria.

Outra alíquota de cada grupo experimental foi resfriada a 4°C e conservada por 24 horas. Após o período de resfriamento, as alíquotas foram reaquecidas a 37°C e avaliados os parâmetros espermáticos. Como grupo controle será utilizado o diluente TRIS sem aditivos para avaliação da termorresistência e foi utilizado o diluente TRIS com gema de ovo como grupo controle para o sêmen resfriado (Salamon e Maxwell, 2000). Os resultados obtidos nas duas etapas foram analisados quanto à distribuição normal para posterior escolha do teste estatístico adequado à 5% de significância. Os resultados do trabalho darão subsídio para o desenvolvimento de diluentes seminais com potencial de utilização em substituição de produtos importados, gerando emprego e renda para o Piauí. Esse produto se destina ao uso na pecuária nacional barateando os custos com a reprodução.

## Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 1, não foi observada diferença significativa, ou seja, todos os parâmetros estão dentro da normalidade para a espécie caprina (CBRA, 2013). Os valores de motilidade e vigor (87e 3,85) espermáticos deste trabalho corroboram com os estudos realizados por Azevêdo et al. (2001), Bittencourt et al. (2005) e Palhão (2006) e indicam que os animais utilizados foram excelentes e homogêneos quanto aos aspectos físicos do sêmen.

Tabela 1. Valores médios do parâmetro motilidade total do sêmen diluído em *Mauritia flexuosa* por um período de 24 h.

	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	120 min	24h
E1	0,971 <sup>a</sup>	0,998 <sup>a</sup>	0,994 <sup>a</sup>	0,735 <sup>a</sup>	0,964 <sup>a</sup>	0,992 <sup>a</sup>	0,142 <sup>a</sup>
E2	0,859 <sup>a</sup>	0,325 <sup>a</sup>	0,798 <sup>a</sup>	0,965 <sup>a</sup>	0,017 <sup>b</sup>	0,558 <sup>a</sup>	0,675 <sup>a</sup>
E3	0,401 <sup>a</sup>	0,764 <sup>a</sup>	0,870 <sup>a</sup>	0,962 <sup>a</sup>	0,898 <sup>a</sup>	0,982 <sup>a</sup>	0,962 <sup>a</sup>
E4	0,519 <sup>a</sup>	0,415 <sup>a</sup>	0,142 <sup>a</sup>	0,403 <sup>a</sup>	0,180 <sup>a</sup>	0,275 <sup>a</sup>	0,929 <sup>a</sup>
E5	0,999 <sup>a</sup>	0,999 <sup>a</sup>	0,980 <sup>a</sup>	1,080 <sup>a</sup>			

E= Experimento.

## Conclusão

Com base nos resultados obtidos conclui-se que em relação aos parâmetros espermáticos não foram observadas diferenças consideráveis ao utilizar o extrato de buriti (*Mauritia flexuosa*), porem com pesquisas mais aprofundadas possivelmente se possa obter bons resultados dessa matéria prima de origem vegetal.

## Referências

- Azevedo HC, Machado R, Simplicio AA, Soares AT. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Revista Científica Rural*, v.5, p.148- 157, 2000.
- Bergstein TG, Weiss RR, Bicudo SD. Técnicas de análise de sêmen. *Rev Bras Reprod Anim*, v.38, n.4, p.189-194, 2014.
- Bittencourt RF, E Oba, AL Ribeiro Filho, M Chalhoub, HC Azevedo, SD Bicudo. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. *Cienc Anim Bras*, v.14, n.4, p.522-536, 2013.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquan-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v.50, p. 699-706, 1998.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3a.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em 21 de agosto de 2016.
- Lopes G, Simões A, Ferreira P, Martins-Bessa A, Rocha A. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim Reprod Sci*, v.112, p.158-163, 2009.
- Palhão MP, Bispo CAS, Furst R, Rovay H, Carvalho GR, Bispo MS. Efeito de diferentes curvas de resfriamento e diluentes na conservação do sêmen caprino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 571-571, 2006.
- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.



## Qualidade e Quantidade de Oócitos Caprinos e Ovinos Recuperados por Aspiração e Fatiamento

*Quality and Quantity of Goats and Sheep Oocytes Recovered by Bspiration and Slicing*

Erika Susane de Castro Lima<sup>1,\*</sup>, Rafaely Lima Galvão<sup>1</sup>, Luciana Veloso Melo<sup>1</sup>, Matheus Moreira Ribeiro<sup>1</sup>, Caio Fernando Sousa Moraes<sup>1</sup>, Hallef Mithchel Pereira Trovão<sup>1</sup>, Ricardo Macedo Chaves<sup>2</sup>, Felipe de Jesus Moraes Junior<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão, UEMA; <sup>2</sup>Departamento das Clínicas Veterinárias, UEMA; Departamento do Mestrado em Ciência Animal, UEMA, São Luís, MA, Brasil.

\*E-mail: e.sdecastro@hotmail.com

### Abstract

*This study aimed to compare the aspiration techniques and slicing ovaries in order to obtain oocytes, by assessing the quantity and quality of oocytes recovered from goat and sheep females slaughtered in São Luís - MA. The ovaries were collected after slaughtering and kept in saline solution at 0.9%, containing 30 µg / mL of gentamicin sulfate. In the laboratory the ovaries were randomly divided into two groups with subsequent process of aspiration and slicing. The average rate of oocyte retrieval by aspiration technique were 4,53 oocytes/ovary in sheeps and 4,11 oocytes/ovary in goats, and by the slicing technique 5,26 oocytes/ovary in sheeps and 5,06 oocytes/ovary in goats. It was not observed a significant difference between the recovery rate between species, however there was statistical difference between the techniques on goats, therefore demonstrating that the two techniques can be used for oocyte retrieval.*

**Keywords:** Oocysts, goats, sheep.

**Palavras-chave:** Oócitos, caprinos, ovinos.

### Introdução

O contingente populacional e qualidade genética dos caprinos e ovinos têm aumentado substancialmente, devido à grande competição entre os mercados produtivos. Neste âmbito, as biotecnologias reprodutivas ganham grande destaque, visto que são as ferramentas de interesse para tais fins. Estas biotecnologias permitem uma maior produção no número de descendentes frente ao que seria possível pela reprodução natural (Feitosa, 2010; Corteel *et al.*, 1988).

A PIV (produção de embriões *in vitro*) inicia com a colheita de oócitos ou complexos *cumulus*-oócito (CCOs), necessitando de métodos eficientes para obter maiores taxas de recuperação. Estes podem ser obtidos a partir de punção folicular de ovários provenientes de abatedouros (*in vitro*) ou de animais vivos por OPU (OVUM PICK-UP), aspiração folicular guiada por ultrassom (Baril, 2006). Morfologicamente, a qualidade do oócito é avaliada basicamente pela quantidade de células do *cumulus oophorus* e o aspecto do citoplasma. Durante o processo de obtenção dos CCOs, a retirada das células do *cumulus* torna os oócitos menos competentes aos fenômenos da maturação, uma vez que, *in vivo*, estas células contribuem para o ambiente intrafolicular de desenvolvimento do oócito (Cognié *et al.*, 2004).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo comparar a utilização das técnicas de aspiração e fatiamento com relação à obtenção de oócitos viáveis, e avaliar a quantidade e qualidade dos oócitos obtidos.

### Material e Métodos

Os ovários utilizados no experimento foram provenientes de animais abatidos na região metropolitana de São Luís – MA, e coletados logo após o abate e evisceração de fêmeas caprinas e ovinas em fase aleatória do ciclo estral. Após os ovários serem acondicionados em garrafa térmica contendo meio de transporte (MT) constituído de solução fisiológica a 0,9 % com adição de 30 µg/mL de sulfato de gentamicina em temperatura entre 28° e 30° C, foram transportados até o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Os ovários foram divididos em dois grupos experimentais por espécie, para serem submetidos às técnicas de aspiração e fatiamento. A aspiração foi realizada com o uso de agulha 18G e seringa de 5mL, o líquido folicular obtido foi depositado em tubo tipo Falcon® com solução de DMPBS (Nutricell®), por 10 minutos a 39°C para sedimentação. No fatiamento utilizou-se um escarificador de lâminas paralelas, produzindo cortes longitudinais na superfície do ovário, estes foram lavados em placa de Petri com DMPBS (Nutricell®), para obtenção do CCOs e o líquido folicular mantido em repouso durante cinco minutos a 39°C para sedimentação. Decorrido este período os sedimentos foram transferidos para placas de Petri contendo DMPBS (Nutricell®) e líquido folicular, de acordo com a espécie e técnica de recuperação, para procura, seleção e quantificação dos oócitos sob estereomicroscópio (Nikon, SMZ800), com objetiva de 4x. Na seleção, foram observados os aspectos morfológicos dos CCOs, segundo a classificação de Lonergan *et al.* (1994), em cinco grupos de qualidade: Grau I (GI) apresenta *cummulus* compacto, contendo mais de três camadas de células; Grau II (GII), *cummulus* compacto, parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito,



com menos de três camadas celulares; Grau III (GIII), *cummulus* presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo (D), ausência de camada de célula do *cummulus*, e Atrésicos (A), células do *cummulus* em regressão.

Para correlação entre os escores de qualidades oocitárias e a técnica de colheita empregou-se o teste não paramétrico de Spearman ( $P < 0,05$ ). O teste de Exato de Fisher com nível de significância de 5% foi empregado para avaliar o percentual de oócitos recuperados por técnica.

### Resultados e Discussão

Foram coletados durante o experimento 62 ovários ovino, 32 submetidos à aspiração e 30 ao fatiamento, e 76 ovários caprinos, 34 aspirados e 32 fatiados. Obtendo como resultado um total de 303 oócitos ovinos, sendo 145 oócitos oriundos da aspiração com a seguinte distribuição, Grau I, 19; Grau II, 29; Grau III, 32; Desnudos, 34 e Atrésicos, 31. E 158 oócitos oriundos do fatiamento, divididos da seguinte forma, 21 Grau I; 27 Grau II; 36 Grau III; 36 desnudos e 38 Atrésicos. Não foi observada correlação entre a qualidade dos oócitos ( $r = 0,02033$ ,  $p = 0,8320$ ) e a técnica de recuperação utilizada nos ovinos.

Quanto aos ovários caprinos, foi recuperado um total de 302 oócitos, sendo 140 oriundos da aspiração folicular, alocados entre as seguintes qualidades, 13 oócitos Grau I; 27 Grau II; 29 Grau III; 37 Desnudos e 34 Atrésicos. E 162 oócitos recuperados pelo fatiamento do ovário, dispostos da seguinte forma, 15 oócitos Grau I; 32 Grau II; 34 Grau III; 42 Desnudos e 39 Atrésicos. Não houve correlação ( $r = 0,02395$ ,  $p = 0,7885$ ) entre a qualidade dos oócitos de acordo com a técnica utilizada. Chaves *et al.* (2010), em uma pesquisa relacionada a qualidade de oócitos caprinos e ovinos usando a técnica de aspiração folicular obteve 468 oócitos ovinos, sendo 83 classificados como Grau I (17,73%), 78 como Grau II (16,7%), 95 Grau III (20,3%), 119 Desnudos (25,43%) e 93 Atrésicos (19,87%).

Estes dados apresentaram taxas de recuperação semelhantes às encontradas neste experimento quanto às porcentagens de qualidade, demonstrando, desta forma, uma maior recuperação de oócitos de melhor qualidade (Graus I e II) quando da utilização da técnica de aspiração, pois está permite uma melhor seleção dos folículos a serem puncionados. Em caprinos, Chaves *et al.* (2010) encontraram as seguintes taxas de recuperação, quanto a qualidade dos oócitos, 64 (15,59%) oócitos Grau I, 70 (16,59%) Grau II, 91 (21,56%) Grau III, 123 (29,15%) Desnudos e 74 (17,54%) Atrésicos. Tais dados também apresentaram valores aproximados aos encontrados neste experimento, demonstrando que tanto para caprinos, quanto para ovinos a recuperação de oócitos por meio de aspiração folicular fornece oócitos de melhor qualidade (Graus I e II), o que favorece as técnicas de produção *in vitro*.

A média de oócitos recuperados pela técnica de aspiração foi de 4,53 oócitos/ovário em ovinos e 4,11 oócitos/ovário em caprinos, na técnica de fatiamento observou-se um índice médio de recuperação em ovinos de 5,26 oócitos/ovário e em caprinos de 5,06 oócitos/ovário. Não sendo observada diferença significativa entre os índices de recuperação por espécie ( $P > 0,05$ ), ocorrendo, porém, diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as técnicas dentro da espécie caprina.

### Consideração Final

Concluímos que as técnicas de aspiração e fatiamento podem ser utilizadas para obtenção de maior número de oócitos a serem utilizados em pesquisas de produção *in vitro*, com semelhantes resultados na quantidade e qualidade dos oócitos obtidos em pequenos ruminantes. Caprinos apresentaram uma taxa de recuperação de oócitos maior quando a técnica de fatiamento foi utilizada.

### Referências

- Avelar SRG.** Diferentes protocolos de estimulação ovariana para a produção de oócitos em cabras da raça Canindé. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- Baril G.** Produção *in vivo* de embriões caprinos e ovinos. In: Freitas VJF. Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem). 1.ed. Fortaleza: Multicor, 2006. cap.1, p.7-20.
- Chaves RM, Aguiar Filho C, Santos Júnior E, Almeida Filho JM, Lima PF, Oliveira MAL.** Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*). Rev Ciênc Anim Bras, v.11, n.3, p.683-688, 2010.
- Cognié Y.** State of art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognié Y, Baril G.** Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la bebris e la chèvre. Prod Anim, v.15, p.199-207, 2002.
- Cognié Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P.** State-of-the-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants, Reprod Fert Dev, v.16, p.437-445, 2004.



## Reprodução e critérios de seleção de ovinos machos e fêmeas em programas de melhoramento genético na ilha de São Luís – MA

*Breeding and selection criteria for male and female sheeps in genetic enhancement programs in São Luís – Ma*

Walterlana Julia Sousa Sampaio<sup>1,\*</sup>, Juliana da Silva Alves<sup>1</sup>, Hallef Mithchel Pereira Trovão<sup>1</sup>, Bruna Shirakubo de Araújo<sup>1</sup>, Celiz de Sousa Pedrosa<sup>1</sup>, Ellis de Sousa Barros<sup>1</sup>, Matheus Moreira Ribeiro<sup>1</sup>, Marília Albuquerque de Sousa Martins<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduandos em Medicina Veterinária – Universidade Estadual do Maranhão; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

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

### Abstract

*This study aimed to characterize the selection criterion for sheep, male and female, most applied in farms located in the municipalities that make up the micro region urban agglomeration of São Luís, Maranhão. Technical visits were performed in 10 properties where, in each, a questionnaire and information related to the creation of system was applied, purpose of creation, breeds, selection criterion and availability of genetic resources were obtained. The most valued characteristics to select the parents, regardless of their race, all properties were observing the animal phenotype, with no use of genetic resources for the practice, and these criterion related to body development (100%) for both sex, scrotal circumference and volume (100%), testicular tilting (20%) for males, and sexual precocity, maternal ability and number of calving (40%) for females.*

**Keywords:** sheep management, reproduction, selection programs.

**Palavras-chave:** ovinocultura, reprodução, trabalhos de seleção.

### Introdução

O melhoramento genético associado às biotecnologias reprodutivas são, sem dúvidas, as ferramentas mais ávidas e imprescindíveis para o avanço da indústria pecuária mundial. Novos tempos chegam e a aplicação de trabalhos seletivos na ovinocultura é uma modernização imposta aos produtores que desejam manter-se no atual cenário mercadológico exigente já que, de forma direta, culminam na maximização de seus lucros. Os critérios de seleção para reprodutores melhorados de um rebanho baseiam quase que restritamente na importância econômica da característica desejada pelo criador, onde a redução dos custos de produção é uma realidade. Dentre os objetivos biológicos mais importantes na redução dos custos por unidade animal destacam-se: o aumento do valor total dos produtos por fêmeas em relação ao tamanho metabólico corporal; o aumento das taxas de reprodução; o aumento da eficiência no crescimento até o peso de abate, com mínima formação de tecidos graxos; reduzir a idade de maturidade sexual, minimizando o tamanho maduro das fêmeas; e, o maior acesso à produção combinada das fêmeas e sua progênie sob manejo intensivo (Dickerson, 1970). Este estudo objetivou concentrar informações acerca da criação de ovinos na ilha de São Luís – MA, e ressaltar os dados que caracterizam os critérios seletivos para machos e fêmeas mais adotados pelas propriedades rurais que configuram a metrópole maranhense.

### Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado a partir da obtenção de dados coletados nas propriedades de criadores de ovinos nos municípios que constituem a microrregião da aglomeração urbana de São Luís, composta pelos municípios de São Luís, Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar no estado do Maranhão. Foi realizado com dados referentes a animais pertencentes às fazendas: Capril do Junco, Rancho Terra Nova, Rancho Piattó, Aprisco Bacuris, Estancia Liberdade, Rancho Ana Beatriz, Fazenda do Lori Ferreira Pinto, Fazenda do João Cândido, Fazenda Agricolau e Fazenda Remi 30, no total de 10 propriedades. Aplicou-se um questionário com criadores e técnicos contendo 10 questões para obtenção de informações relacionadas a sistema de criação, finalidade da criação, raças, critérios de seleção, disponibilidade de recursos genéticos e a respeito da correlação genotípico-fenotípica.

### Resultados e Discussão

Relacionado ao sistema de criação, em todas as propriedades requisitadas notoriamente destacava-se o semi-intensivo, onde os animais permaneciam as manhãs livres a pasto e durante a noite eram levados aos apriscos. Em apenas duas propriedades a finalidade do rebanho, além de corte, é para melhoramento genético, representando animais de excelência utilizados em exposições ou vendas. Nas demais fazendas os animais são utilizados como ovinos de corte, sendo para consumo do próprio proprietário ou venda destes animais para abate. O desempenho médio observado para as características avaliadas no presente estudo revelam que para selecionar os progenitores os criadores e responsáveis técnicos avaliam, acima de tudo, o fenótipo do animal, não havendo utilização de recursos genéticos para essa prática. Os critérios relacionados aos reprodutores (Tab. 1), em todas as propriedades visitadas, evidenciam certa preocupação ao selecionar os reprodutores não



advêm da própria propriedade, mas sim de compras em exposições ou fazendas vizinhas, para evitar a endogamia. A proporção de machos para fêmeas, em média, foi de 1 – 30, sendo que sempre há separação dos reprodutores as demais fêmeas do rebanho. As características mais observadas quanto aos reprodutores, além de um bom padrão racial, é o desenvolvimento corporal, escore de conformação e musculatura desenvolvida, circunferência escrotal e volume/peso testicular, concordando com Notter *et al.* (1981) onde afirma que a escolha do reprodutor pode ser feita tomando-se como base o desenvolvimento corporal, uma vez que, este parâmetro também se correlaciona com a circunferência escrotal, a qual é um indicador do peso e do tamanho dos testículos como também da função gametogênica, concordando também com Cardoso e Queiroz (1988) que por meio de avaliações diárias da produção espermática em carneiros confirmaram que estas características estão altamente correlacionadas com o peso testicular e a circunferência escrotal. Para as matrizes, (Tab. 2) em todas as propriedades estas são selecionadas em meio ao próprio rebanho, diferente dos reprodutores que são exteriores a criação, os critérios mais citados foram as características relacionadas à habilidade materna, como número de parições, tendo como eleição fêmeas com duas parições por ano, e também animais com precocidade sexual e boa conformação corpórea, resultados similares foram obtidos por Azevêdo (2008), onde concorda com todos esses critérios para a seleção de uma boa matriz, inclusive uma fêmea destinada a matriz é fundamental a avaliação do seu estado sanitário, pois fêmeas enfermas são incapazes de produzir o esperado.

Tabela 1. Critérios de manejo reprodutivo e seleção para machos.

Característica	Número de Fazendas	Média	Porcentagem
Circunferência escrotal	10	1	100%
Escore de conformação de conformação e músculo	10	1	100%
Volume escrotal	1	0,1	10%
Pendulação testicular	2	0,2	20%

Tabela 2. Critérios de manejo reprodutivo e seleção para fêmeas.

Característica	Número de Fazendas	Média	Porcentagem
Habilidade Materna	4	0,4	40%
Escore de Conformação	10	1	100%
Escore de facilidade ao parto	4	0,4	40%
Número de parições	4	0,4	40%

### Consideração Final

Analisando as informações obtidas com o trabalho, observou-se que as técnicas de seleção praticadas pela a grande maioria dos produtores entrevistados obtinham um caráter empírico, que é refletida na baixa produtividade do rebanho. Em grande parte das propriedades visitadas a produção de ovinos é voltada ao abate, sendo uma parte selecionada a venda e outra ao consumo próprio. Duas das propriedades possuíam animais diferenciados, voltados exclusivamente para exposição em eventos agropecuários, em que, nos mesmos foram aplicadas técnicas apuradas de seleção, com mão de obra técnica qualificada. Com base no que foi verificado com a pesquisa de campo, o estado do Maranhão possui uma baixa produtividade em rebanhos de ovinos devido à escassez de estímulos possivelmente provocada por um mercado desvalorizado, de poucos investimentos e alternativas melhores na produção animal.

### Referências

- Cardoso FM, Queiroz GF.** Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of brazilian hairy rams. *Anim Reprod Sci*, v.17, p.77-84, 1988.
- Dickerson G.** Efficiency of animal production– molding the biological components. *J Anim Sci*,v.30, p.849-859, 1970.
- Notter DR, Lucas JR, McClagherty FS.** Accuracy of estimation of testis weight from in situ testis measures in ram lambs. *Theriogenology*, v.15, n.2, p.227-231, 1981
- Azevêdo DMMR.** Seleção de Reprodutores e Matrizes na Criação de Pequenos Ruminantes. 2008. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=3065>> Acesso em: 10 de dezembro de 2014.



## Resposta folicular após estimulação ovariana com gonadotrofinas e polivinilpirrolidona em cabras Anglo Nubiana

*Follicular response after ovarian stimulation with gonadotropins and polyvinylpyrrolidone in Anglo Nubian goats*

**George Antonio Maciel Mudo\***, Helder Anderson Lima Silva, Laisa Gomes Medeiros Ribeiro, Raphael Amorim de Oliveira, Joedson Dantas Gonçalves, Luana Barbosa Freire de Figueiredo, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior

Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil.

\*E-mail: george.mudo@gmail.com

### Abstract

To evaluate the effect of different hormonal stimulation treatments with PVP on ovarian follicular development, 27 goats received intravaginal devices (CIDR) for 10 days and 125 µg cloprostenol on day 8 of treatment. The goats were distributed in the following groups: G1 (FSH-eCG), 300 IU of eCG and 70 mg pFSH, 36 h prior to the withdrawal of CIDR; G2 (FSH), receiving 180 mg (40/40; 35/35, 30 mg) at 12 h intervals; G3 (FSH-PVP10), receiving 70 mg FSH dissolved in PVP 10,000 MW, 24 hours before CIDR; and G4 (FSH-PVP40), 70 mg of FSH dissolved in PVP MW 40,000, 48 hours before CIDR. The follicles with diameter  $\geq 2$  mm were counted, measured and classified. FSH-PVP 40 had a greater number of small follicles than FSH ( $P < 0.05$ ) and FSH showed greater number of large follicles ( $P < 0.05$ ). In conclusion, treatment with FSH-PVP40 is an alternative to stimulate ovaries in goats.

**Keywords:** follicle, goat, PVP.

**Palavras-chave:** caprino, foliculo, PVP.

### Introdução

Os tratamentos hormonais para a estimulação ovariana têm sido utilizados em cabras para induzir o recrutamento e crescimento folicular, elevando o número de oócitos e embriões produzidos pela doadora (Baldassarre et al., 2003). Têm-se relatado que, em vacas e ovelhas, a superovulação pode ser induzida por uma única injeção de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona (PVP). Porém, pouco se sabe sobre os fatores que podem afetar a capacidade do PVP em agir como um veículo para o FSH em protocolos de superestimulação em cabras (Alessandro et al., 2001). Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos de estimulação hormonal com gonadotrofinas dissolvidas em polivinilpirrolidona sobre o desenvolvimento folicular ovariano em cabras da raça Anglo Nubiana.

### Material e Métodos

Foram utilizadas 27 cabras da raça Anglo Nubiana, cujos estros foram sincronizados pelo uso de dispositivos intravaginais contendo 330 mg de progesterona (CIDR), por 10 dias, bem como pela administração intramuscular (i.m.) de 125 µg de cloprostenol, 48 h antes da remoção do CIDR. As cabras foram distribuídas em quatro grupos de acordo o tratamento de estimulação ovariana: Grupo FSH (n = 6), onde 180 mg de NIH-FSH P1 (40/40; 35/35; 30 mg), aplicadas a cada 12 h e a partir de 72 horas antes da retirada do CIDR; Grupo FSH-eCG (n = 7), 70 mg de NIH-FSH P1, combinado com 300 UI de eCG, 36 horas antes da retirada do dispositivo; Grupo FSH-PVP 10 (n = 7), que consistiu no uso i.m. de 70 mg NIH-FSH-P1 dissolvidos em PVP 10.000 PM, a uma concentração de 30%, 24 horas antes da retirada do CIDR; e o Grupo FSH-PVP 40 (n = 7), onde foi aplicado i.m. 70 mg de NIH-FSH-P1 dissolvidos em PVP 40.000 PM, a uma concentração de 30%, 48 horas antes da retirada do dispositivo intravaginal. Logo após a retirada do CIDR, a avaliação dos ovários foi realizada por laparotomia. Os folículos presentes em ambos os ovários foram classificados como: pequenos (<3 mm), médios (3-4 mm) ou grandes (>4 mm). Para análise dos resultados, foi utilizada a ANOVA e o teste de Tukey. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher e Qui-quadrado. Os grupos de tratamento foram comparados a uma probabilidade de 5%.

### Resultados e Discussão

O Grupo FSH-PVP 40 foi significativamente superior ( $9,14 \pm 1,55$ ) ao grupo FSH ( $3,57 \pm 1,17$ ) quanto ao número de folículos pequenos, enquanto o grupo FSH foi significativamente superior ao demais grupos de tratamento em relação ao número de folículos grandes. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os grupos quanto ao número de folículos médios. As diferenças significativas encontradas para o número de folículos de tamanhos pequenos do grupo FSH-PVP 40, em comparação ao grupo FSH, pode ser justificada pelo fato que a dose total de FSH administrada de uma só vez conduz a um menor número de folículos do que se esta dose de FSH for dividida em várias injeções (Kelly et al., 2005). O alto número de folículos pequenos, quando



comparado ao FSH com administração em bolus de pFSH-PVP, 48 h antes da remoção da esponja, pode ser atribuído aos elevados níveis circulantes da gonadotrofina, devido à administração única de 70 mg pFSH. Em nosso estudo, a administração da gonadotrofina coincidiu com a indução da luteólise por injeção de um análogo da PGF<sub>2α</sub> (48 horas antes da remoção da esponja). Assim, podemos deduzir que, naquele momento, o PVP foi incapaz de manter a atividade pFSH suficiente para sustentar o crescimento de folículos maiores. Já em relação ao tamanho de folículos grandes, o grupo FSH apresentou maior número em comparação aos demais, o que se deve, inicialmente, à incapacidade do FSH, administrado em cinco doses decrescentes, de recrutar e sustentar o tamanho do folículo. Além disso, a presença de um folículo grande (dominante) é outro fator relacionado, exercendo efeito deletério sobre o recrutamento folicular, observando-se uma resposta estimulatória dependente do número de pequenos folículos no início do tratamento com FSH exógeno (Rubianes e Menchaca, 2003).

### **Conclusão**

Os tratamentos de estimulação com FSH dissolvidos em polivinilpirrolidona foram eficazes no desenvolvimento folicular ovariano em cabras Anglo-Nubiana.

### **Referências**

- Alessandro AGD, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellittib A.** Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.255-264, 2001.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN.** Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v.59, p.831-839, 2003.
- Kelly JM, Kleeman DO, Walker SK.** Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology*, v.63, p.1876-1896, 2005.
- Rubianes E, Menchaca A.** The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.271-287, 2003.



## **Sensibilidade de cabras da raça Anglonubiana a infecção por verminose no periparto indicada pelo OPG**

*Sensibility of goat breed Anglo-Nubian infection by nematode parasites in peripartum indicated by OPG*

**Francisco Felipe Ferreira Soares<sup>1,\*</sup>, Dayse Andrade Barros<sup>1</sup>, Yulle Gabrielle Pereira Santos<sup>1</sup>, Moara Matos de Lobão<sup>1</sup>, Misael das Virgens Santana<sup>1</sup>, Dalvan Fortaleza Alencar<sup>1</sup>, Márdyla de Sousa Marques<sup>2</sup>, José Elivalto Guimarães Campelo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Granduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil; <sup>2</sup>Bióloga, UFPI, Mestre em ciências biológicas, UFRN; <sup>3</sup>Doutor, Professor do DZO/CCA/UFPI, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: felipeferreira\_01@hotmail.com

### **Abstract**

*The objective of this research was to evaluate the relationship of the infestation of gastrointestinal nematodes with the occurrence of peripartum in the angonubiana breed goats were divided into two age groups: Young goats <4 years old and Goats> 4 years. The set of information corresponds to the period from 2009 to 2015 obtained from the Bank of UFPI the goat herd data, which is located in Teresina - PI. There was no significant difference in the samples taken during pregnancy ( $P > 0.05$ ), although in the final third of the OPG tended to grow. Therefore, without significant evidence of peripartum express sensitivity of animals to parasitism. So in herd infected continues throughout the year tends to be little influence on the time of year in the goat parasitism degree during pregnancy and lactation, regardless of age. However, does not imply inattention curative measures in the peripartum.*

**key words:** nematodes, Anglo Nubian, peripartum.

### **Introdução**

A criação de caprinos no Nordeste é favorecida por ser espécie mais adaptada às condições ambientais e climáticas desfavoráveis do que a maioria das outras espécies (Voltoline, 2006). Porém, a verminose causa sérios prejuízos devido à redução da produtividade do rebanho e mortalidade de animais. A suscetibilidade ao parasitismo tem origem genética, variando entre animais mais sensíveis e outros mais resistentes (Nunes et al., 2007). Esse tema tem sido mais estudado nos ovinos, porém, fortes evidências têm indicado que raças nativas caprina se mostram mais resistentes se comparadas às com animais de maior porte. Dentre os efeitos não genéticos sobre a variação no OPG, o período do Peri-parto contribui significativamente, existindo uma relação direta entre a eliminação de ovos de nematódeos gastrintestinais em fêmeas e a proximidade do parto (Pinto et al., 2008). Nessa perspectiva, o objetivo com essa pesquisa foi avaliar a relação do OPG com a ocorrência do periparto em cabras da raça Anglonubiana de duas idades diferentes.

### **Material e Métodos**

A pesquisa consistiu de edição e análise de informações do Banco de dado do rebanho caprino da UFPI, que está localizado em Teresina (Latitude de 5° 5' 20" sul e Longitude de 42°48' 07" oeste). As informações correspondem ao período de 2009 a 2015, quando o rebanho foi monitorado pela coleta de informações relacionadas a resposta das matrizes a verminose, através do exame de OPG (ovos por grama de fezes), escore da condição corporal, com a realização em média de 8 coletas por animal ao longo do ano e todas as matrizes do rebanho.

No manejo alimentar as cabras foram mantidas indo a pasto em torno de 8 horas da manhã e recolhidas ao aprisco no final do dia onde permaneciam durante a noite e na parte da manhã, quando foram realizadas as coletas de dados. As cabras em lactação tiveram acesso coletivo à ração comercial com 16% de proteína bruta para manutenção no período considerado.

No manejo reprodutivo as cabras foram divididas em dois grupos, de forma que a ocorrência de lactação em um correspondeu à ocorrência de estação de monta, resultando, portanto, em repetição de grupos de animais contemporâneos em relação a estágio fisiológico dentro do mesmo ano e da mesma época (seca ou chuvosa).

No manejo sanitário os animais foram vermifugados com a utilização de anti-helmíntico apenas quando mais de 10% dos animais apresentavam resultado de OPG superior a 1000, conforme recomenda Costa et al. (2011).

Para exames de OPG, as amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal, no período da manhã, sempre antes de vermifugação. Acondicionadas em sacos plásticos identificados foram levadas ao Laboratório de Sanidade Animal - LASAN da UFPI onde as análises de OPG foram realizadas com a técnica de Gordon e Whitlock (1948), citada por Ueno e Gonçalves (1998).

Na edição dos dados foram mantidas informações de OPG de fêmeas e transformados para a escala  $\text{Log}_{10}\text{OPG}$ . Formou-se dois arquivos de dados, um contendo informações de cabra Jovem (menor que 4 anos de idade) e cabras Velha (maior que 4 anos). Em cada arquivo os dados foram estratificados em duas épocas, de

acordo com a data da coleta de fezes, de janeiro a junho e de julho a dezembro, representando respectivamente o período chuvoso e o seco na região.

Em cada semestre de 2009 a 2016 os valores do  $\text{Log}_{10}$  OPG obtidos de coletas de fezes ocorridas durante a gestação (terços inicial, intermediário e final), foram distribuídas nos seguintes Tratamentos: T1 - coletas de 90 a 120 dias antes do parto, T2 - de 45 a 89 dias; T3 - de 44 dias até o parto. Processo similar foi feito durante a lactação: T4 - coletas do parto até 45 dias depois, T5 - de 46 a 90 dias e T6 - de 91 a 120 dias. Portanto, com o intervalo de coleta abrangendo o período do periparto, que é de 45 dias antes e depois do parto segundo Pinto et al. (2008).

.Realizou-se uma análise de variância no arquivo com os dados de cabras com menos de 4 anos com coletas de fezes ocorridas na época chuvosa e na seca. A outra análise no segundo arquivo foi similar com as coletas em cabras com idade superior a 4 anos. As médias dos Tratamentos em cada análise foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

Estão apresentadas (Tab. 1) as médias do  $\text{Log}_{10}$ OPG de cabras com menos 4 anos de idade. Observa-se que foi elevada a quantidade de ovos eliminados tanto na época seca do ano como na chuvosa. Segundo Silva (2010) a manutenção de pastejo em áreas com gramínea irrigadas contribui para manutenção de parasitismo elevado ao longo do ano. Sob a condição de exposição continuada pode favorecer a expressão de adaptação dos animais à infecção por endoparasitas, segundo Bishop (2010).

Tabela 1. Médias do  $\text{Log}_{10}$ OPG de cabras da raça Anglonubiana com menos de 4 anos de idade, com coletas de fezes na época seca e na chuvosa do ano, durante a gestação e lactação, ocorridas de 2009 a 2015 no rebanho caprino da UFPI em Teresina.

Época da coleta de fezes	Coletas na Gestação			Coletas na Lactação		
	T1 - no 1/3	T2- no 1/3	T3 - no 1/3	T4 - no 1/3	T5- no 1/3	T6 - no 1/3
	Inicial	Intermediário	final	Inicial	Intermediário	final
Chuvosa	2,83 <sup>a</sup>	2,80 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup>	3,09 <sup>a</sup>
Seca	2,90 <sup>a</sup>	2,77 <sup>a</sup>	2,76 <sup>a</sup>	3,22 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>	2,84 <sup>a</sup>

\*Médias com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Não foi observada diferença significativa nas coletas realizadas na gestação ( $P > 0,05$ ), embora no terço final a média do  $\text{Log}_{10}$  OPG tendeu a crescer. Portanto, sem indícios significativos do periparto externar sensibilidade dos animais a parasitismo. Durante a lactação as médias tenderam a se apresentar com valor superior aos verificados na gestação, porém não significativamente ( $P > 0,05$ ), com indicativo de redução no terço final da lactação (T6), que correspondeu ao período de 91 a 120 dias após o parto.

Esse resultado apresenta concordância com afirmações de Pinto et al. (2008), que que o OPG tende a se elevar em torno do parto. Não foi verificado comportamento diferenciado nas duas épocas do ano e medidas curativas devem ser aplicadas durante o periparto.

Como a estrutura dos dados utilizada é longitudinal (coletas repetidas no mesmo animal ao longo do ano), o valor do OPG igual a 2,90 no terço inicial da gestação na época seca do ano, pode estar mostrando um efeito residual da infecção elevada verificada no terço final da lactação na estação chuvosa anterior (3,09). Assim, o efeito acumulativo indica que a infecção durante a época chuvosa não foi eficientemente controlada. Além disso, ao se realizar análises genéticas envolvendo o OPG, parece não ser necessário constar o período do periparto como efeito fixo (causa de variação não genética) na modelagem.

Tabela 2. Médias do  $\text{Log}_{10}$ OPG de cabras da raça Anglonubiana com mais de 4 anos de idade, com coletas de fezes na época seca e na chuvosa do ano, durante a gestação e lactação, ocorridas de 2009 a 2015 no rebanho caprino da UFPI em Teresina

Época da coleta de fezes	Coletas na Gestação			Coletas na Lactação		
	T1 - no 1/3	T2- no 1/3	T3 - no 1/3	T4 - no 1/3	T5- no 1/3	T6 - no 1/3
	Inicial	Intermediário	final	Inicial	Intermediário	final
Chuvosa	2,29 <sup>a</sup>	2,80 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>
Seca	2,72 <sup>a</sup>	2,53 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	3,19 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>	2,85 <sup>a</sup>

\*Médias com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Estão apresentadas (Tab.2) as médias do  $\text{Log}_{10}$ OPG de cabras com mais 4 anos de idade. Observa-se que apresentam valores que indicam tendência similar ao verificado nas cabras mais novas, ou seja, o valor do OPG



se elevou um pouco no periparto, persistindo durante a lactação, mas não significativamente ( $P>0,05$ ). Foi similar também o efeito residual da infecção durante o terço final da lactação no período chuvoso do ano, que persistiu no terço inicial da gestação do período seco do ano. Durante a lactação as médias foram um pouco superior às da gestação, porém não significativamente ( $P>0,05$ ).

A tendência de aumentar a eliminação de ovos de parasitas gastrintestinais no período do periparto (45 dias antes e depois do parto) pelas cabras, segundo Costa et al. (2011), é um fenômeno que envolve mecanismos desconhecidos, mas a imunossupressão de origem endócrina, decorrente de variações hormonais próximas ao parto e durante a lactação, estão entre possíveis causas. Porém a influência das condições climáticas como umidade e calor elevados, parece se sobrepondo à interferência da idade.

### **Conclusão**

Em rebanho com infecção contínua ao longo do ano, tende a ser pequena a influência da época do ano no grau de parasitismo da cabra durante a gestação e lactação, independente da idade. Porém, não implica em desatenção com medidas curativas no periparto.

### **Referências**

- Bishop SC, Morris CA.** Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Rumin Res*, v.70, p.48-59. 2007. Review.
- Costa VMM, Simões SVD, Riet-Correa F.** Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesq Vet Bras*, v.31, n.1, p.65-71, 2011.
- Nunes AP, Oliveira AC, Berne MEA, Borba MFS, Echevarria F, Vaz C M, Carvalho FIF.** Estudo da variabilidade genética de resistência a nematódeos gastrintestinais em ovinos da raça Corriedale com marcadores RAPD. *Rev Bras de Agrociência*, v.13, n.1, p.25-33, 2007.
- Pinto JMS, Oliveira MAL, Álvares CT, Costa-Dias R, Santos MH.** Relação entre o Peri-parto e a eliminação de ovos de nematóides gastrintestinais em cabras Anglo-nubiana naturalmente infectadas em sistema semi-extensivo de produção. *Rev Bras Parasitol Vet*, v.17, supl.1, p.138-143, 2008.



## **Soroprevalência da leptospirose em ovinos em municípios da Microrregião do Alto-Médio Gurguéia no Estado do Piauí**

*Seroprevalence of leptospirosis in sheep in municipalities of the Microregion of high-middle Gurguéia in the State of Piauí*

**Janaina de Fátima Saraiva Cardoso\*, Raimundo Rosal Vaz, Regina Célia de Jesus Fialho, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, Danilo de Sousa Lima, Aline Oliveira Barbosa, Bruno Leandro Maranhão Diniz, Ney Rômulo de Oliveira Paula**

Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: janainadefatima@hotmail.com

### **Abstract**

*Leptospirosis, considered a zoonosis of universal distribution, is responsible for a decrease in the productive and reproductive indexes of the herds because they result in abortion, repetition of estrus, placental retention and consequently economic losses. Considering the economic importance of sheep farming in the state of Piauí and the microregion, the objective of this study was to determine the prevalence of anti-leptospira antibodies in sheep from the Upper-Middle-Gurguéia micro-region in the state of Piauí. Blood samples were collected from 100 sheep from 03 municipalities in the Upper-Middle Gurguéia micro-region. To investigate anti-leptospira antibodies was performed the Serum Microscopic Agglutination (SAM) technique. The presence of anti-leptospira antibodies in sheep exploited in the Upper-Middle Gurguéia micro-region was verified. Therefore, preventive control measures to avoid introduction as well as combat measures for the control of Leptospirosis in the sheep herd of the Upper-Middle Gurguéia microregion are necessary.*

**Keywords:** *Economic losses, prevention, risk.*

**Palavras-chave:** perdas econômicas, prevenção, risco.

### **Introdução**

Nos últimos anos a ovino-caprinocultura no Brasil, tem evoluído muito, esse fator está relacionado a subsistência, além do mercado consumidor está procurando outros tipos de carne diferente da de bovino. No entanto a maioria dos tipos de criação é extensiva e rudimentar, na grande dependência de plantas nativas, utilização de raças não especializadas, déficit em assistência técnica, e sem controle sanitário. A leptospirose em ovinos pode apresenta-se nas formas sintomáticas e assintomáticas, a primeira ainda pode ser aguda ou crônica. Na forma aguda, os animais podem apresentar anorexia, depressão, icterícia, aumento da temperatura corporal ou síndromes hemorrágicas. A forma crônica, porém, é mais notável, causando problemas na fertilidade, abortos, diminuição na produção de leite, mortalidade neonatal e abortos (Martins et al., 2012).

Este estudo teve como objetivo realizar estudo epidemiológico sobre os sorovar da leptospirose predominantes nos municípios de Alvorada do Gurguéia, Cristino Castro e Redenção do Gurguéia na região do alto médio Gurguéia, através da técnica de Soro aglutinação Microscópica (SAM).

### **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado em 03(três) municípios Alvorada do Gurguéia, Cristino Castro e Redenção do Gurguéia na Microrregião do Alto-Médio Gurguéia no Estado do Piauí. Foram coletados soros sanguíneos de 100 ovinos. Na pesquisa de aglutininas antileptospiras, utilizou-se a prova de soroaglutinação microscópica (SAM) contra 22 sorovares patogênicos, sendo efetuadas as leituras em microscópio em campo escuro. O título final foi aquele que ainda apresentou 50% ou mais de aglutinação, sendo o ponto de corte da reação o título de 1:100.

### **Resultados e Discussão**

Dos amostras testadas 22% reagiram sorologicamente frente a um ou mais sorogrupos analisadas através da técnica de soroaglutinação microscópica conforme a Tabela 1. Na distribuição sorológica foi observado uma alta sororeatividade para o grupo *Icterohaemorrhagiae*, seguidos pela *Bratislava*, *Pamona* e *Grippotyphosa*. O sorovar mais comum em ovinos em todo o mundo é o *Hardjo*, sendo, portanto, o principal responsável por problemas reprodutivos em ovelhas e de morte de cordeiros (Herrmann et al., 2004). Porém em trabalhos mais recentes no estado do Piauí como o realizado por Carvalho et al. (2011) relataram que o sorovar de maior ocorrência foi o *Autumnalis*. Esses mesmos autores relatam ainda que os ovinos utilizados no experimento estavam clinicamente sadios, porém infectados por *Leptospira* spp. Por outro lado outro um trabalho realizado por Favero et al. (2002) onde os mesmos realizaram um levantamento dos sorovares de leptospiras mais predominantes em várias espécies os mesmos relataram que o sorovar que mais acometeu a espécie ovina foi a *icterohaemorrhagiae*, corroborando assim com nossos resultados. A presença de reações positivas para esse sorovar aponta a importância da população de roedores na transmissão de doenças e reforça a



necessidade de programas de controles de roedores, adotando além de medidas ofensivas (desratização), normalmente as únicas utilizadas, a inclusão de modificações ambientais como medidas preventivas (antirratização) e educação em saúde (Araujo Neto et al., 2010).

Tabela 1. Frequência de sorovares reagentes ao teste de soroprecipitação microscópica para leptospira em 100 soros de ovinos em 03 municípios localizados na microrregião alto médio Gurguéia.

Sorovares	%
Icterohaemorrhagiae	16
Pomona	1
Grippotyphosa	4
Bratislava	1
Total	22

### Conclusão

Foi encontrado a presença de *Leptospira* spp, na Microrregião do Alto-Médio Gurguéia no Estado do Piauí, com prevalência dos sorovares, *icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Bratislava*.

### Referências

**Araujo Neto JO, Alves CJ, Azevedo SS, Silva MLCR, Batista CSA.** Soroprevalencia de leptospirose em caprinos da microrregião do serido oriental, estado rio grande do norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.47, p.150-155, 2010.

**Carvalho SM, Gonçalves LMF, Macedo NA, Goto H, Silva Favero MCA, Pinheiro RS, Vasconcelos SA, Moraes ZM, Ferreira F, Neto JSF.** Sorovares de leptospiros predominates em rebanhos sorologicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suinos e caes de diversos estados brasileiros. *Ciencia Rural*, v.32, p.613-619, 2002.

**Herrmann GP, Lage AP, Moreira EC, Haddad JPA, Resende JR, Rodrigues RO, Leite RC.** 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-leptospiros spp em ovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil *Ciencia Rural* 34:443-448.

**Martins G, Brandão FZ, Hamond C, Medeiros M, Lilenbaum W.** Diagnosis and control of an outbreak of leptospirosis in goats with reproductive failure. *Vet J*, v.193, p.600-601, 2012.



## Taxa de fertilidade de ovelhas submetidas à inseminação artificial por via cervical e laparoscopia, no semi-árido do Piauí

*Fertility rate of ewes submitted to artificial insemination by laparoscopy and cervical, on semi-arid in Piauí*

Misael Das Virgens Santana<sup>1,\*</sup>, Gustavo Henrique Chaves Martins<sup>2</sup>, Kenney de Paiva Porfírio<sup>3</sup>, Francisco Felipe Ferreira Soares<sup>1</sup>, Leticia Soares de Araújo Teixeira<sup>4</sup>, Jheyson Douglas Rodrigues de Sousa<sup>1</sup>, Ney Romulo de Oliveira Paula<sup>5</sup>, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>2</sup>Médico Veterinário, Residente multiprofissional em reprodução animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil;

<sup>3</sup>Mestrando em ciência animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>4</sup>Médica veterinária, graduada pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>5</sup>Professor Dr. Adjunto da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil.

\*E-mail: misaelsantana2100@gmail.com

### Abstract

*There is various techniques of artificial insemination, but are not yet applied routinely in sheep. The cervical insemination is quick and simple. Laparoscopy requires specialized technical and more work. artificial insemination using simultaneous estrus synchronization provides higher productivity. This study aimed to observe the pregnancy rate using frozen semen and techniques of different insemination after synchronization of estrus. The experiment was conducted with thirty-seven animals. All subject to estrus synchronization protocol. Sixty days after insemination all underwent ultrasound for diagnosis of pregnancy. Twenty-five of the thirty-seven of the experiment showed pregnancy. The results demonstrated that cervical AI with frozen semen is a good alternative to using it routinely in sheep.*

**Keywords:** Sheep, Pregnant, Insemination.

**Palavras-chave:** Ovelha, Prenhez, Inseminação.

### Introdução

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado é uma biotécnica reprodutiva ainda pouco utilizada na espécie ovina. Este procedimento é dificultado pelas características anatômicas da cérvix da ovelha, a qual apresenta anéis tortuosos e reduzido diâmetro (Kershaw et al., 2005).

A técnica de inseminação cervical, o sêmen é colocado cerca de 1 a 3 centímetros. Utiliza-se espelho para visualização da cérvix. É uma técnica rápida e de fácil aplicação. A fertilidade aumenta de acordo com o grau de profundidade onde é colocado o sêmen (Ax et al., 2004).

A técnica de IA intrauterina por laparoscopia é uma facilitadora por permitir colocar o sêmen diretamente no útero (Killen e Caffery, 1982; Ghalsasi e Nimbkar, 1996). No entanto essa técnica possui limitações: por se tratar de um procedimento cirúrgico, exigir a utilização de equipamentos de alto custo e mão-de-obra especializada (Evans e Maxwell, 1987).

Nesse sentido, a inseminação artificial utilizando sincronização simultânea do cio concede partos concentrado em período programado, facilitando o manejo dos animais e reduzindo a mão de obra, elevação da prolificidade e maior produtividade (Pavoskiet et al., 2009). O presente trabalho visou observar a taxa de prenhez utilizando sêmen congelado e técnicas de inseminação diferentes após a sincronização do cio e IATF.

### Materiais e Métodos

O Experimento foi realizado na fazenda campina verde no município de Elesbão Veloso, localizado na mesorregião cento-norte do Piauí, que está situado na latitude: 06° 12' 07" S e longitude: 42° 08' 25" W, no mês de junho de 2016. Todos os animais foram avaliados clinicamente, vermifugados, mantidos em pastagens cultivadas e recebendo sal mineral, para ovinos, à vontade.

Foram utilizadas 37 ovelhas mestiças. Os animais foram selecionados de acordo com o escore corporal, e submetidas à ultrassonografia (Sonoscape A5 Vet.) para selecionar os animais aptos para o experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: G1 - (n=18) inseminação cervical utilizando pistola walmur<sup>®</sup> e G2 - (n = 19) inseminadas por laparoscopia.

As ovelhas foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro: inseridas esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de medroxiprogesterona - MAP (Progespon<sup>®</sup>), por um período de 12 dias. No décimo segundo dia de tratamento retirou se as esponjas e imediatamente aplicou se 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina - eCG (Novormon<sup>®</sup>), em cada ovelha. Após 56 horas da aplicação de eCG realizou se a inseminação artificial, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 20 horas antes da inseminação.

As ovelhas foram inseminadas utilizando uma única dose de sêmen congelado em palheta de 0,25 mL. Durante o procedimento, as ovelhas foram contidas pelo tratador com o posterior elevado num ângulo de 90° (Trendelemburg). Para visualização da cérvix e passagem do aplicador de sêmen para inseminação das ovelhas



foi utilizado um espéculo do tipo bico de pato e um foco de luz. Após a localização do orifício cervical, introduziu a pistola de walmur e sêmen foi depositado no sistema genital da fêmea, Preconizou a deposição do sêmen o mais profundo possível, mas também procurando não traumatizar o epitélio da cérvix. Na técnica de laparoscopia o sêmen foi depositado em ambos os cornos uterinos. Sessenta dias após a inseminação, as 37 ovelhas foram submetida á ultrassonografia com um aparelho de ultrassom veterinário Sonoscape A5 Vet. para confirmação da gestação.

### Resultados e Discussão

No presente trabalho, das trinta e sete ovelhas inseminadas, vinte e cinco (67,57%) demonstraram gestação na avaliação ultrassonográfica. Sendo doze (63,15%) inseminadas por laparoscopia e treze (72,22%) cervical utilizando pistola Walmur<sup>®</sup>, como mostra a tabela 1.

Tabela 01 taxa de prenhes de ovelhas submetidas a duas técnicas de inseminação após IATF.

Técnica de IATF	Positivos	Negativos
Laparoscopia	12/19 (63,15%)	07/19 (36,85)
Intra cervical	13/18 (72,22%)	05/18 (27,78%)
Total	25 (67,57%)	12 (32,43%)

Rabassa et al. (2006), avaliando as taxas de prenhez de ovelhas inseminadas por diferentes técnicas de inseminação artificial, com sêmen congelado, utilizando tipos de diluentes diferentes, encontraram uma taxa de prenhez de 40%, tanto as ovelhas inseminadas por via transcervical como as inseminadas por laparoscopia, não diferindo, portanto, entre si ( $P > 0,05$ ). Em contradição com o estudo por Rabassa et al. (2006) as taxas de prenhez encontradas nesse trabalho diferem em relação as duas técnicas, apresentando os seguintes resultados: 63.15% vis laparoscopia e 72.22% via intra cervical.

Maxwell et al. (1986) mostraram resultados satisfatórios realizando inseminação artificial por laparoscopia, além disso esses autores também avaliaram o efeito de inseminações uni ou bilaterais e local de deposição do sêmen na taxa de gestação de ovelhas Merino, onde encontraram valores significativamente maiores para inseminações artificiais bilaterais em relação às unilaterais (76,8 e 44,9%).

### Considerações Finais

Os resultados obtidos demonstraram que a IA cervical é uma boa alternativa para que seja possível a utilização da mesma com sêmen congelado como rotina na criação de ovinos.

### Referências

- Ax RL, Dally MR, Didion BA, Lenz R W, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. Inseminação artificial. In: Hafez ESE. Reprodução animal. 7. Ed. Barueri: Manole, 2004. 531 p.
- Barbosa LP, Quaglia FV, Dutra PA, Cardoso Neto BM; Santana D, Santos JA, Souza RS. Efeito do local de deposição do sêmen e da condição reprodutiva na taxa de gestação e prolificidade de ovelhas inseminadas por laparoscopia. Arq Pesq Anim, v.1, n.1, p.25-30, 2012.
- Ghalsasi PM, Nimbkar C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. Small Rumin Res, v.23, p.69-73, 1996.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. Theriogenology, v.64, p.1225-1235, 2005.
- Killen ID, Caffery GJ. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. Australian Vet J, v.59, p.95, 1982.
- Maxwell W. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 2 Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. Anim Reprod Sci, v.10, p.309-316, 1986.
- Pavoski C, Lourenço F, Boso A, Prado C. Inseminação artificial em pequenos ruminantes na Região noroeste do Paraná, Brasil. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, 2009.
- RabassaVR, Tabeleão VC, Pfeifer LFM, Schneider A, Ziguier EA, Schossler E, Severo NC, Pino FABB, Corrêa MN. Efeito Das Técnicas Transcervical E Laparoscópica Sobre A Taxa De Prenhez De Ovelhas Inseminadas Em Tempo-Fixo. Ciência Animal Brasileira, v.8, n.1, p.127-133, 2007.
- Silva JC. criopreservação de sêmen ovinos com diferentes concentrações espermáticas associado ou não com ácido ascóbrico. 2013. 66f. Tese (Doutorado em Doctor Scientiae) Instituição de Pesquisa. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Minas Gerais, 2013.



## **Taxa de prenhez de acordo com o grau de abertura do orifício vaginal da cérvix de cabras Saanen no Nordeste do Pará, durante a inseminação artificial**

*Pregnancy rate according to the degree of opening of the vaginal orifice of the cervix Saanen goats in northeastern Pará, during artificial insemination.*

**Suellem Chucre Elias<sup>1,\*</sup>, Christian Trindade Machado<sup>1</sup>, Keyla Danielly Aragão e Silva<sup>1</sup>, Cláudia da Silva Carvalho<sup>1</sup>, Éder Sales Cangussu<sup>1</sup>, Álvaro Chaves Neto<sup>2</sup>, Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>3</sup>, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduando(a) da Universidade Federal Rural da Amazônia; <sup>2</sup>Pós-Graduando da Universidade Federal Rural da Amazônia;

<sup>3</sup>Docente da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

\*E-mail: ctmachado9@gmail.com

### **Abstract**

*Was aimed at the application of reproductive technologies in goats is mainly limited to inability to cross the long, narrow cervix, preventing intrauterine deposition of frozen semen Croy et al. (1999). The degree of difficulty in transposing the cervix may vary according to various factors such as individual effect, reproductive stage, postpartum interval, reproductive season, technical experience and other Husein et al. (1998). The study was conducted in the state of Pará, in the municipality of Igarapé-Açu, Pará northeast, at a private estate. We used 12 Saanen goats intended for milk production, with ages ranging from 1 to 3 years, all identified with numerical necklace and documented in animals individual. Os identification cards were created intensively with forage (*Pennisetum purpureum*) ground corn meal, water and mineral supplement will. The evaluation of the cervical opening degree was carried out by vaginal speculum.*

**Keywords:** Insemination, opening of the cervix, Saanen.

**Palavras-chave:** Inseminação, abertura da cervix, Saanen.

### **Introdução**

Visou-se a aplicação de tecnologias da reprodução em caprinos, tem como principal limitação a inabilidade em se transpor a longa e estreita cérvix, inviabilizando a deposição intra-uterina do sêmen congelado Croy et al. (1999). O grau de dificuldade em transpor a cérvix pode variar de acordo com vários fatores tais como: efeito individual, estágio reprodutivo, intervalo pós-parto, estação reprodutiva, experiência do técnico entre outros Husein et al. (1998). A Inseminação Artificial é uma das biotécnicas mais importante para o melhoramento genético de animais, tornando-se possível poucos reprodutores altamente selecionados produzem espermatozoides suficientes para inseminar várias fêmeas em diferentes propriedades Barbosa et al. (2013). A Inseminação Artificial pode ser feita de diversas formas incluindo desde o momento da deposição na vagina, até a deposição do sêmen no corno uterino. Essa biotécnica através da via cervical pode ter sua eficiência avaliada dependendo do local de deposição do sêmen verificando o número de anéis cervicais ultrapassados, ou, o grau de penetração do aplicador em cm (Fonseca et al., 2010).

### **Material e Métodos**

O estudo foi realizado no estado do Pará, no município de Igarapé-Açu, na região nordeste paraense, em uma propriedade particular. Foram utilizadas 12 cabras da raça Saanen destinadas à produção leiteira, com idade variando entre 1 a 3 anos, todas, identificadas com colar numérico e documentados em fichas de identificação individual. Os animais eram criados de forma intensiva, com forragem (*Pennisetum purpureum*), farelo de milho triturado, água e suplemento mineral à vontade. A avaliação do grau de abertura cervical foi realizada através do espéculo vaginal (Figura 1- A, B e C), conforme metodologia descrita por Grunert et al. (2005), porém, esse autor avaliou na espécie bovina, não havendo ainda relatos na literatura para espécie caprina. Esta avaliação foi classificada neste trabalho da seguinte forma (Figura 2): grau 0- abertura do orifício cervical não evidente; grau 1- abertura do orifício cervical com espessura de um palito de fósforo; grau 2- abertura do orifício cervical com espessura de um canudinho de refrigerante; grau 3- abertura do orifício cervical com espessura um lápis; grau 4: abertura do orifício cervical com espessura um tubo de caneta estereográfica; grau 5- abertura do orifício cervical com espessura um dedo mínimo.

### **Resultados e Discussão**

A taxa de prenhez para as cabras que obtiveram abertura do cérvix grau 0, grau 1, grau 2, grau 3, grau 4 e grau 5 foi de 0%, 100%, 50%, 66,6%, 66,6% e 0% respectivamente. Não houve influência do grau de abertura da cérvix na taxa de prenhez ( $P > 0,05$ ), conforme tabela 1. Não houve diferença estatística comparando o grau de abertura do cérvix devido o número de animais ser pequeno, porém a resposta foi satisfatória por apresentarem excelente resultados através do protocolo realizado e observou-se que, o melhor momento para a realização da inseminação artificial é quando o animal apresenta grau de abertura 3 e 4.

Tabela 1. Taxa de prenhez, de acordo com o grau de abertura do cérvix em 12 cabras leiteiras da raça Saanen submetidas à IATF na região nordeste Pará-Brasil.

Grau de abertura da cérvix	Diagnóstico de gestação	
	Positivo	Negativo
0	0 (0%)	2 (100%)
1	1 (100%)	0 (0%)
2	1 (50%)	1 (50%)
3	2 (66,6%)	1 (33,3%)
4	2 (66,6%)	1 (33,3%)
5	0 (0%)	1 (100%)



Figura 1. Avaliação do orifício vaginal através do espéculo vaginal.

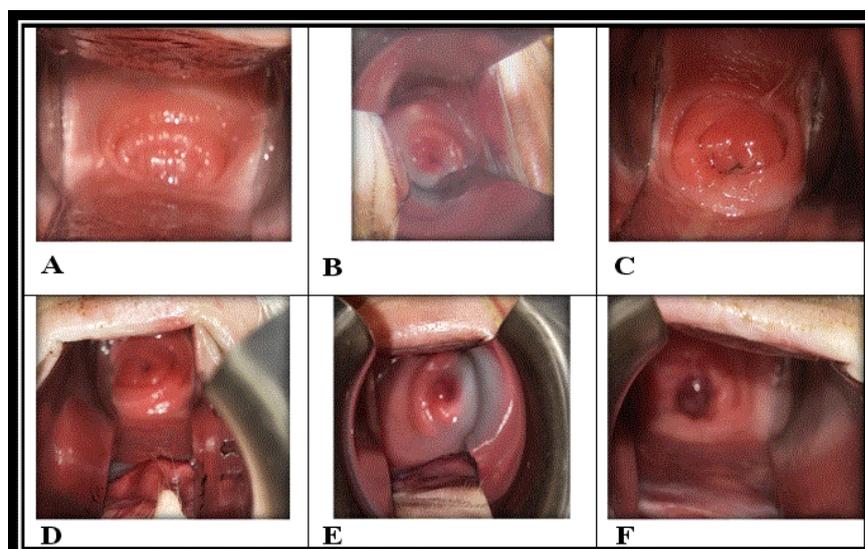


Figura 2. Relação do grau de abertura da cérvix das cabras leiteiras da raça Saanen. Grau de abertura da cérvix de cabras leiteiras inseminadas em tempo fixo. A- grau 0; B- grau 1; C- grau 2; D- grau 3; E- grau 4 e F- grau 5.

### Conclusão

Através da análise dos dados coletados verificou-se que o grau de abertura não influenciou na taxa de prenhez das cabras da raça Saanen. Os animais com grau de abertura 3 e 4 apresentam um melhor momento para que sejam inseminados.

### Referências

**Barbosa LP, Biscarde CEA, Dutra PA, Cardoso Neto BM, Souza DO.** Sincronização e inseminação artificial em sistemas de produção de caprinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.37, n.2, p.151-155, 2013.

**Croy BA, Prudencio J, Minhas K, Ashkar AA, Galligan C, Foster RA, Buckrell B, Coomber BL.** A preliminary study on the usefulness of hull-8 in cervical relation of the ewe for artificial insemination and embryo transfer. *Theriogenology*, v.52, p.271-87, 1999.



**Fonseca JF, Cruz RC, Pinto PHN, Faco O.** Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia, Ilhéus BA-UESC, 20 a 22 de Outubro de 2010. p.30.

**Grunert E, Birgel EH, Vale WG, Birgel Junior EH.** Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos: Ginecologia. Livraria Varela, São Paulo, 2005.

**Husein MQ, Bailey MT, Ababneh MM, Romano JE, Crabo BG, Wheaton JE.** Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed sêmen outside the breeding season. *Theriogenology*, v.49, p.997-1005, 1998.



## **Taxa de prenhez de acordo com o tipo de muco apresentado em cabras da raça Saanen submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF)**

*Pregnancy rate according to the type of mucus presented in Saanen breed goats submitted to artificial insemination in fixed time (TAI)*

**Suelen Chucre Elias\*, Keyla Daielly Aragão e Silva, Anália Costa de Oliveira Neta, Keitiane Colares de Sousa, Wilton Figueiredo de Lma, Alvaro Chaves Neto, Sebastião Tavares Rolim Filho, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro**

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

\*E-mail: allvarochaves@gmail.com

### **Abstract**

*This study aimed to evaluate the pregnancy rate according to the type of mucus presented in Saanen goats submitted to artificial insemination in fixed time (TAI). The study was conducted in the state of Pará, in the municipality of Igarapé-Açu, in Pará Northeast, in a private property. 12 goats used for milk production were used, with ages ranging from 1 to 3 years, the classification of the type of vaginal mucus, was made according to Smith (2006). The pregnancy rate for animals with crystalline mucus was 33.3% for those who had crystalline-striated mucus was 0% for those who had striatum mucus was 66.6% for those who had striatum mucus -caseoso was 50% and for those who had mucus cheesy pregnancy rate was 50%. After data analysis showed that the type of mucus does not influence the animal pregnancy rate.*

**Keywords:** caprine, reproductive management, Artificial insemination.

**Palavras-chave:** caprino, manejo reprodutivo: Inseminação artificial.

### **Introdução**

A observação do muco, e da sua alteração durante o período de cio, pode ser usada para estimar o melhor momento do estro para se realizar a inseminação, uma vez que há correlação entre o tipo de muco observado no momento da inseminação e a taxa de fertilidade (Silveira et al. 2009).

A relação entre as características do muco e o momento da inseminação é um parâmetro de grande importância na reprodução, sendo o volume e a consistência desse muco varia durante o período do estro, essa variação se dá devido a presença de células de descamação do epitélio genital feminino. No início do estro observa-se muco cristalino e há pouca secreção, após 12 a 18h do início do estro ele torna-se estriado e mais abundante e no período de 25 a 30h observa-se o muco mais denso e com aparência caseosa. Sendo o melhor momento para a inseminação é quando o muco apresenta-se estriado e abundante (Evans e Maxwell 2010).

O uso da inseminação artificial representa uma biotecnologia bastante difundida na reprodução animal, onde iremos possibilitar a utilização de indivíduos geneticamente superiores associadas a menores custos por serviços, como a manutenção de uma grande número de machos na propriedade (Siqueira 2006). A sincronização do estro tem sido amplamente usada em caprinos como instrumento de auxílio nos processos de inseminação. Além de permitir um planejamento adequado na produção desses animais (Alves et al. 2005). Objetivou-se avaliar a taxa de prenhez de acordo com o tipo de muco apresentado em cabras da raça Saanen submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

### **Material e Métodos**

O estudo foi realizado no estado do Pará, no município de Igarapé-Açu, na região nordeste paraense, em uma propriedade particular. Foram utilizadas 12 cabras da raça Saanen destinadas à produção leiteira, com idade variando entre 1 a 3 anos, todas, identificadas com colar numérico e documentados em fichas de identificação individual. A classificação do tipo de muco vaginal, foi feita de acordo com Siqueira (2006), no qual afirma que o muco obtém aparência cristalina no início do estro, passando a estriado e finalmente caseoso, ao final do estro.

### **Resultados e Discussão**

Em relação ao tipo de muco apresentado pelos animais durante a inseminação, a taxa de prenhez para os animais que apresentaram muco cristalino foi de 33,3%, para os que apresentaram muco cristalino-estriado foi de 0%, para os que apresentaram muco estriado foi de 66,6%, para os que apresentaram muco estriado-caseoso foi de 50% e para os que apresentaram muco caseoso a taxa de prenhez foi de 50%. Nesse estudo não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) conforme mostra tabela 1. Esses resultados foram satisfatórios, devido os animais apresentarem bom resultado com o protocolo realizado durante a IATF, e mostrou-se que o melhor muco para a realização da inseminação foi o estriado com o índice de 66,6% de taxa de prenhez. Comparando a taxa de prenhez em relação aos tipos de mucos no presente trabalho, o resultado do muco cristalino mostrou-se superior aos de Siqueira (2009), que foi de 15,38% e ao de Siqueira et al. (2006), que foi de 3,64%. Em relação ao muco



estriado, a taxa de prenhez de Siqueira (2006), e Siqueira et al. (2009), mostrou-se inferior comparado com o presente estudo apresentando resultado de 34,55% e 57,58% respectivamente. Já o muco estriado caseoso no presente estudo mostrou-se superior ao de Siqueira (2006) que obteve 7,27%, e inferior ao de Siqueira et al. (2009), que foi de 80%, e comparando o muco caseoso do presente trabalho com o de Siqueira (2006), e Siqueira et al. (2009), mostrou-se superior 3,64% e inferior 66,67% respectivamente. Provavelmente a diferença nas porcentagens dos tipos de muco deu-se pelo momento do estro no qual os animais apresentavam, pois, segundo Siqueira et al. (2009), a presença do muco estriado e abundante corresponde ao terço médio para o final do estro (12 à 18 após o seu início), sendo que os animais podem variar o aspecto do muco durante o estro, e não apresentando o mesmo tipo de muco ao mesmo tempo.

Tabela 1. Taxa de prenhez, de acordo com o tipo de muco durante a inseminação em 12 cabras leiteiras da raça Saanen submetidas à IATF na região nordeste do Pará-Brasil.

Tipo de Muco	Diagnóstico de gestação	
	Positivo	Negativo
Cristalino	1 (33,3%)	2 (66,6%)
Cristalino-Estriado	0 (0%)	1 (100%)
Estriado	3 (66,6%)	1 (33,3%)
Estriado-Caseoso	1 (50%)	1 (50%)
Caseoso	1 (50%)	1 (50%)

( $P > 0,005$ ).

#### Conclusão

Após análise dos dados verificou-se que o tipo de muco não influenciou na taxa de prenhez dos animais.

#### Referências

- Siqueira AP.** Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado. 2006. 106f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.
- Siqueira, AP, Fonseca, JF, Silva Filho, JM, Bruschi, JH, Viana, JHM, Palhares, M.S, Bruschi, MCM, Peixoto, MP.** Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com o sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, n.2, p.299-395, 2009.



## Taxa de prenhez em cabras da raça Saanen no nordeste do Pará submetidas à inseminação artificial em tempo fixo

*Pregnancy rate in Saanen goats in northeast Pará submitted to artificial insemination in fixed time*

Suelen Chucre Elias, Alvaro Chaves Neto\*, Yvana Carla Rezende Hadad, Keitiane Colares de Sousa, Jade Ohana, Louise Carneiro de Carvalho, Gustavo Alighiere Lopes da Silva, Sebastião Tavares Rolim Filho

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

\*E-mail: allvarochaves@gmail.com

### Abstract

*Control of the estrous cycle through estrus synchronization protocols allows the producer to share lots of females according to the management capacity and ownership of facilities easier handling and better use of players. Therefore, the objective was to verify the influence of artificial insemination in fixed time (FTAI) with the use of frozen semen in pregnancy rates of dairy goats. The study was conducted in the state of Pará, in the municipality of Igarapé-Açu, in a private property that is located in the northeastern region of Pará. 12 Saanen goats intended for milk production were used. Animals submitted to TAI with the use of six frozen semen became pregnant, representing a pregnancy rate of 50%, which proved satisfactory results.*

**Keywords:** *Pregnancy rate, dairy goats, FTAI.*

**Palavras-chave:** Taxa de prenhez, cabras leiteiras, IATF.

### Introdução

Desde a domesticação da espécie caprina, há cerca de 10.000 anos, esta vem se tornando cada vez mais importante na exploração e produção de alimentos, medicamentos, cosméticos e artefatos para consumo humano. O rebanho nacional de caprinos em 2014 alcançou 8.851.879 cabeças, sendo 8.109.672 cabeças na Região Nordeste (91,6%) IBGE, (2015). Gonçalves; Figueiredo; Freitas (2001), descrevem que a caprinocultura no Brasil, nesses últimos anos vem se consolidando como importante alternativa pecuária, principalmente para o pequeno produtor, que emprega mão-de-obra familiar. Segundo Machado e Simplicio (1992), as primeiras inseminações em cabras no Brasil ocorreram no ano 1954. Apesar do seu potencial no incremento à produtividade e seleção dos animais, a inseminação artificial nessa espécie ainda é pouco aplicada no Brasil, restringindo-se, basicamente, a trabalhos de pesquisa (Machado e Simplicio, 1995).

O controle do ciclo estral por meio dos protocolos de sincronização de estro permite ao produtor dividir lotes de fêmeas de acordo com a capacidade de manejo e as instalações da propriedade (Canova, 2008). Suas vantagens estão no aparecimento do estro de todas as fêmeas tratadas em um mesmo período, na reprodução em período de anestro estacional, na facilidade de manejo e no melhor aproveitamento de reprodutores (Barbosa et al., 2013).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com o uso do sêmen congelado na taxa de prenhez de cabras leiteiras.

### Material e Métodos

O estudo foi realizado no estado do Pará, no município de Igarapé-Açu, em uma propriedade particular que está localizada na região nordeste paraense. Foram utilizadas 12 cabras da raça Saanen destinadas à produção leiteira, com idade variando entre 1 a 3 anos, todas, identificadas com colar numérico e documentados em fichas de identificação individual. Os animais eram criados de forma intensiva, com forragem (*Pennisetum purpureum*), farelo de milho triturado, água e suplemento mineral à vontade.

O protocolo se deu da seguinte forma: no dia zero (D0) foi colocado o dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR® 0,3g, Zoetis); no dia treze (D13) foi realizada a retirada do dispositivo intravaginal e feita a aplicação de 2 mL (0,15mg) de PGF2α (Cloprostenol Sódico-Croniben®, Biogenesis) e 2 mL (400 UI) de gonadotrofina Coriônica Equina (eCG-Novormon®, Sintex) e no dia quinze (D15) foi realizada a inseminação artificial em tempo fixo somente uma vez. Todo o protocolo foi realizado pelo período da manhã, e buscando sempre realiza-los dentro de uma hora esquematizada para todas as etapas do protocolo.

Todos os dados foram tabulados em planilha eletrônica utilizando o programa excel os quais foram avaliados pelo software especializado SAS (2009) através do teste estatístico Teste Exato de Fisher com nível de significância de 5% e posteriormente comparadas as taxas de prenhez.

### Resultados e Discussão

Dos 12 animais submetidos à IATF seis ficaram gestantes, representando uma taxa de prenhez de 50%. Esses índices são superiores aos encontrados por Souza et al. (2009), que trabalharam com 30 cabras SRD adultas, e obteve 26,6% de taxa de prenhez. Foi similar aos de Lehloenya (2005), que obtiveram taxas de



preñez de 52% e 53% quando inseminaram cabras com intervalos de 48 e 60 horas respectivamente após a retirada do progestágeno, e resultados inferiores aos de Rodrigues et al. (2014), que trabalhou com 94 animais e obteve taxa de preñez de 73,33%.

Baseando-se no número de inseminações realizadas neste trabalho, podemos afirmar que os resultados, foram dentro dos dados descritos na literatura, devido á boa nutrição e sanidade dos animais.

### **Conclusão**

A taxa de preñez com uso de sêmen congelado na IATF apresentou resultados satisfatórios de 50% de preñez.

### **Referências**

- Instituto Brasileiro de Geografia Estatístico (IBGE).** Pesquisa Pecuária. Disponível em: [ftp://p.ibge.gov.br/Produção\\_Pecuária/Produção\\_da\\_Pecuária\\_Municipal/2012/tabelas\\_pdf/tab04.pdf](ftp://p.ibge.gov.br/Produção_Pecuária/Produção_da_Pecuária_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab04.pdf). Acessado em: 22/09/2014.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.** Biotécnica aplicada à reprodução animal. São Paulo: Varela, p.15-23;p.57-65; p.111-23, cap. 2, 4 e 7, 2001.
- Machado R, Simplício AA.** Effects of two washing solutions on sperm survival of the bucks. In: International Conference on Goats. 1992. New Delhi. Proc...New Delhi: 1992. v.2, p.1089-1094..
- Machado R, Simplício AA.** Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. Rev Bras Reprod Anim, v.19, n.1-2, p.61-72, 1995.
- Canova EB.** Métodos indutivos de estro em pequenos ruminantes. PUBVET, Londrina, v.2, n.1, 2008.
- Barbosa LP, Biscarde CEA, Dutra PA, Cardoso Neto BM, Souza DO.** Sincronização e inseminação artificial em sistemas de produção de caprinos. Rev Bras Reprod Anim, v.37, n.2, p.151-155, 2013.
- Souza KC, Andrioli A, Silva DO, Avila AA, Brito IF, Abreu AA.** Efeito de diferentes liberadores de progesterona utilizados num programa de inseminação artificial em tempo fixo em cabras. Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2009, Águas de Lindóia Proceedings...São Paulo, ABZ, 2009.
- Rodrigues KF, Bueno MN, Souza IOT, Sousa Junior A, Souza JAT, Costa APR.** Efeito do enalapril e do horário de inseminação sobre taxa de preñez de cabras submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. V Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal. Acta Veterinária Brasilica, v.8. supl. 2, p.161-162, 2014.



## Taxa de recuperação de oócitos caprinos oriundos de abatedouros localizados na microrregião homogênea de Teresina, Piauí, Brasil

*Recovery rate goat oocytes from slaughterhouses located in the homogeneous micro-region of Teresina, Piauí, Brazil*

**Kenney de Paiva Porfírio<sup>1,\*</sup>, Janaina de Fatima Saraiva Cardoso<sup>2</sup>, Marlene Sipaúba de Oliveira<sup>3</sup>, Alberto Pereira de Araújo Neto<sup>4</sup>, Tuanny Creusa Medeiro Damasceno<sup>1</sup>, Danilo de Sousa Lima<sup>5</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>2</sup>, Raphael Briseno Frota<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>2</sup>Professor Dr. Adjunto da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>3</sup>Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil; <sup>5</sup>Mestre em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Bom Jesus, Piauí, Brasil; <sup>6</sup>Médico Veterinário, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil.

\*E-mail: kenneymv@hotmail.com

### Abstract

*The aim of this study was to evaluate the recovery rate of oocytes by OPU technique with needle attached syringe in goats from slaughterhouses located in the homogeneous micro-region of Teresina, Piauí. 68 ovaries from 34 pubertal goats without defined breed (SRD) from local abattoirs were used. After slaughter, the ovaries were immediately transported to the laboratory in thermos physiological saline (0.9% NaCl) heated at 35 °C plus 30 µg/ml gentamicin sulfate. Soon after it was held aspiration of oocytes and the identification and classification of structures was subsequently conducted. It was recovered a total of 42 COCs, the average of oocytes recovered by females 1.23. The low recovery rate obtained in this study may be due to low body condition score in which the animals were at the time of the examination.*

**Keywords:** OPU, cumulus oocyte complex, small ruminants.

**Palavras-chave:** aspiração folicular, complexo cumulus oócitos, pequenos ruminantes.

### Introdução

A principal fonte de ovários para punção de folículos ovarianos, em qualquer espécie doméstica, continua sendo em abatedouros (Gonçalves et al., 2008). Seus ovários constituem um modelo clássico de pesquisa. Neste caso, o bem estar animal é respeitado, uma vez que as fêmeas são sacrificadas para o consumo da carne e os ovários são perdidos (Nunes et al., 2010). Os oócitos em pequenos ruminantes podem ser obtidos por aspiração folicular, (Nunes et al., 2010). Nessa técnica a punção é realizada com uma agulha 18 ou 19G acoplada a uma seringa de 1mL ou bomba de vácuo (Gonçalves et al., 2008).

Um dos fatores que influencia a qualidade do oócito recuperado é o transporte adequado do material coletado, seja ovário ou oócito. A temperatura, o meio e o tempo de transporte são aspectos fundamentais para preservação do material e com este objetivo cada autor tem uma maneira de fazê-lo. Este tempo também deve ser o mais curto possível, mas se realizado no período de até 3 horas parece não afetar a viabilidade dos Complexos Cumulus Oócitos (CCOs) (Gonçalves et al., 2002).

Contudo, um dos grandes problemas atualmente é que, de acordo com Nunes et al. (2010), pequenos ruminantes apresentam menor recuperação e baixa qualidade de CCOs quando os ovários são provenientes de abatedouros.

Diante deste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a taxa de recuperação de oócitos pela técnica de aspiração folicular com agulha acoplada a seringa, em caprinos provenientes de abatedouros localizados na microrregião homogenia de Teresina, Piauí.

### Material e Métodos

O experimento foi executado no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Campus Petrônio Portela, Teresina, Piauí, Brasil, no período de setembro e outubro de 2016. Sob aprovação na comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, protocolo nº108/15.

Foram utilizados 68 ovários provenientes de 34 cabras púberes sem padrão racial definido (SRD) oriundos de abatedouros locais da região metropolitana de Teresina-PI. Antes da realização do abate foi realizada a análise do escore de condição corporal, onde o mesmo foi realizado em uma escala variando de (1 a 5). Após o abate, os ovários colhidos foram transportados imediatamente ao laboratório em garrafa térmica contendo solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida a 35°C acrescida de 30 µg/mL de sulfato de gentamicina em um período máximo de 2 (duas) horas.

No laboratório os ovários foram lavados com solução fisiológica e colocados aquecidos a 35°C em banho Maria durante todo período de punção, em recipiente com soro fisiológico. Logo em seguida foi realizada



a aspiração dos oócitos como proposto por Freitas et al. (2008). O aspirado foi diretamente colocado em tubos tipo *falcon* de 15 mL e após o período de decantação de 15 minutos o sedimento foram aspirado através de pipeta e depositado em placas de Petri com solução de DPBS com BSA 0,4% (PBS com BSA 0,4%; Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas - SP, Brasil) aquecidas previamente em placa aquecedora com temperatura de 37°C para a identificação e classificação das estruturas oocitárias, as quais foram transferidas para placas de Petri de 35 x 10 mm.

Os oócitos foram avaliados e classificados quanto ao estágio de qualidade segundo Ramos et al. (2006) em estereomicroscópio, sob aumentos de 10X e 40X.

### Resultados e Discussão

Foi recuperado um total de 42 CCOs, sendo a média de oócitos recuperados por fêmeas de 1,23. Os oócitos também foram classificados quanto ao estágio de qualidade, a Tabela 1, nos mostra a taxa de recuperação de oócitos de cabras provenientes de abatedouros localizados na região metropolitana de Teresina, Piauí.

As principais características dos ovários puncionados, bem como o escore de condição corporal que os animais apresentavam no momento do abate estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Taxa de recuperação e classificação de oócitos caprinos provenientes de abatedouros puncionados por agulha acoplada em seringa.

CCOs recuperados	Classificação			
	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
42	8	17	7	10

Avaliação e classificação quanto o estágio de qualidade segundo Ramos et al. (2006).

Tabela 2. Principais características dos ovários puncionados e escore de condição corporal.

Variáveis	N	(%)
Características (ovários)		
Presença de Corpo Lúteo	27/68	39,7
Ausência de Corpo Lúteo	41/68	60,3
Características (Folículos)		
Tamanho (2mm e 8mm)	35/68	51,5
Tamanho ( $\leq 2$ mm)	33/68	48,5
ECC*		
$\leq 2,0$	39/68	57,3
$\geq 3,0$	29/68	42,7

\*Escore de Condição Corporal das cabras em uma escala de (0 a 5).

Os resultados referentes a taxa de recuperação estão um pouco abaixo aos descritos por Nunes et al. (2010), onde os mesmos relatam que pequenos ruminantes apresentam menor recuperação e baixa qualidade dos oócitos quando utilizados ovários de abatedouros para a aspiração sendo da ordem de 2 a 3 CCOs por par de ovários.

Outros trabalhos relatam uma taxa de recuperação superior em pequenos ruminantes, como o trabalho realizado por Padilha et al. (2012) que obtiveram uma taxa de recuperação de oócitos de 6,4 CCOs, porém em fêmeas eram tratadas hormonalmente para essa finalidade e submetidas a coletas semanalmente via laparoscopia.

A pequena quantidade de CCOs recuperados pela aspiração pode ser devido ao motivo que as levou ao abate, o qual, em sua maioria, ocorre por problemas de infertilidade ou final de atividade reprodutiva (Ohashi e Barruseli, 2008).

No que diz respeito a recuperação de oócitos em espécies sazonais, alguns aspectos merecem destaque e são de fundamental importância. É o caso da variação individual, o estado nutricional e a oferta de alimentos, a idade do animal, o clima, além da fase (presença de corpo lúteo no ovário), idade reprodutiva e recente parição, o dia do ciclo estral e o estímulo hormonal recebido (Nunes et al., 2010).

A taxa de recuperação de oócitos também pode ser influenciada por artefatos durante a execução da técnica de aspiração folicular como a pressão de vácuo, tamanho da agulha e sistema de aspiração (Smith et al., 1994).

A aspiração dos ovários para recuperação dos CCOs tem que ser feita de maneira eficiente e adequada, para não comprometer a quantidade, qualidade e posterior viabilidade destes (Padilha et al., 2012).

### Considerações Finais

Cabras com baixo escore de condição corporal durante o período seco oriundos de abatedouros locais da microrregião homogênea de Teresina apresentam baixa taxa de recuperação de oócitos.



### **Agradecimentos**

Ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro, através do ETENE/FUNDECI.

### **Referências**

**Freitas VJF, Andrade MLL, Cajazeiras, JB, Luz JV.** Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.781-786, 2007.

**Gonçalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL, Montagner MM, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, p.179-194, 2002.

**Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.** In: \_\_. *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal*. 2a. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

**Nunes JF.** *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes*. 1a. ed. Fortaleza: Tecnograf, 2010.

**Ohashi OM, Baruselli PS.** Biotecnica da reprodução animal aplicadas em bubalinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. Editora Roca, 2a.ed., p.105-123, 2008.

**Padilha LC.** Maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas santa inês submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia. 2012. 63p. Dissertação (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) – Unesp, Campus de Jaboticabal – São Paulo. 2012.

**Smith JF, Tervit HR, McGowan LT, Pugh PA.** Effect of aspiration system on the recovery and development of sheep follicular oocytes. *Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology*, v.26, p.16, 1994.



## Taxa de recuperação de oócitos de ovinos provenientes de abatedouros locais da região metropolitana de Teresina, Piauí, Brasil

*Recovery rate of sheep oocyte from local abattoirs in metropolitan region of Teresina, Piauí, Brazil*

Tuanny Creusa Medeiros Damasceno<sup>1,\*</sup>, Marlene Sipaúba de Oliveira<sup>2</sup>, Kenney de Paiva Porfirio<sup>3</sup>, Janaina de Fátima Saraiva Cardoso<sup>4</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>4</sup>, Danilo de Sousa Lima<sup>5</sup>, Alberto Pereira de Araújo Neto<sup>6</sup>, Layanne de Macedo Praca<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do programa de pós-graduação em Ciência animal, Universidade Federal do Piauí; <sup>2</sup>Doutoranda do programa de pós-graduação em Ciência animal, Universidade Federal do Piauí; <sup>3</sup>Mestrando do programa de pós-graduação em Ciência animal, Universidade Federal do Piauí; <sup>4</sup>Professor do departamento Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI; <sup>5</sup>Mestre em Zootecnia e Médico Veterinário da Ouro Fino, Picos, PI; <sup>6</sup>Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Piauí; <sup>7</sup>Mestre em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

\*E-mail: tuttymedeiros@hotmail.com

### Abstract

*In order to evaluate the recovery rate of local abattoirs oocyte the metropolitan region of Teresina-PI. Ovaries were used 72 36 pubescent sheep without defined breed (SRD). The collected ovaries were transported to the laboratory in thermos physiological saline (0.9% NaCl) heated at 35 ° C plus 30 ug / ml sulphate gentamicin in a maximum of two (2) hours, the follicular aspiration needle attached syringe was subsequently performed, the aspirated pellet was deposited on heated Petri dishes previously in hot plate to 37 ° C for the identification and classification of oocytárias structures. 52 were recovered oocyte cumulus cells and the ewe recovery rate was 1.4. Therefore the low recovery rate can be the result of the female body condition, food supply, breeding age and age of the animal.*

**Keywords:** sheep breeding, aspiration follicular, ovaries.

**Palavras-chave:** ovinocultura, aspiração folicular, ovários.

### Introdução

A ovinocultura tem grande importância sócio-econômica no Brasil, devido a sua facilidade em se adaptar as condições climáticas adversas. A criação de ovinos no Nordeste brasileiro ainda é explorada, muitas vezes de forma extensiva, como uma fonte alternativa de subsistência e com a utilização de tecnologias pouco apropriadas. Diante disso, é necessário assumir estratégias reprodutivas práticas, viáveis e lucrativas, objetivando aumentar os índices produtivos em concomitância com o progresso genético (Crocomo et al., 2012). A utilização de biotecnologias reprodutivas promove resultados amplos em programas de melhoramento genético de rebanhos ovinos (Freitas et al., 2013). Estudos têm sido realizados visando facilitar o uso do gameta feminino e, atualmente, a técnica mais promissora é a criopreservação de oócitos, desejável por razões biológicas e comerciais, que consiste no armazenamento e na preservação de materiais biológicos sob baixas temperaturas. Mas para o sucesso das técnicas, faz-se necessário a realização de experimentos para que se obtenha oócitos de boa qualidade. Diante desse fato, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa de recuperação de oócitos oriundos de ovelhas de abatedouros locais na da região metropolitana de Teresina-PI.

### Material e Métodos

O experimento foi executado no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Campus Petrônio Portela, Teresina, Piauí, Brasil, situado às coordenadas geográficas 5° 03' 23.1'' de Latitude Sul e 42° 47' 27.9'' de Longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros. Foram utilizados 72 ovários provenientes de 36 ovelhas púberes sem padrão racial definido (SRD) oriundos de abatedouros locais da região metropolitana de Teresina-PI. Após o abate, os ovários colhidos foram transportados imediatamente ao laboratório em garrafa térmica contendo solução salina fisiológica (NaCl 0.9%) aquecida a 35°C acrescida de 30 µg/mL de sulfato de gentamicina em um período máximo de 2 (duas) horas. No laboratório os ovários foram lavados com solução fisiológica e colocados aquecidos a 35°C em banho Maria durante todo período de punção, em recipiente com soro fisiológico. Posteriormente foi realizada a aspiração dos oócitos através de agulha de calibre 21G acoplada a seringa como proposto por Freitas et al. (2008). O aspirado foi colocado em tubos tipo *falcon* de 15 mL e após o período de decantação de 15 minutos o sedimento foi aspirado através de pipeta e depositado em placas de Petri com solução de DPBS com BSA 0,4% (PBS com BSA 0,4%; Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas - SP, Brasil) aquecidas previamente em placa aquecedora com temperatura de 37°C para a identificação e classificação das estruturas oocytárias (graus 1 a 4, de acordo com Crocomo (2012)) utilizando-se esteriomicroscópio, sob aumentos de 10X e 40X.



### Resultado e Discussão

No presente experimento a Tabela 1 demonstra o resultado referente ao número de oócitos recuperados por ovelha, que foi de 1,4 por fêmea. Diferindo do resultado encontrado por Teixeira et al. (2011) que obteve 6,36 oócitos recuperados, entretanto, as fêmeas utilizadas foram tratadas submetidas à sincronização de estro, tendo em vista que nesse procedimento geralmente eleva a taxa de recuperação de oócitos. Morton et al. (2007) em seu trabalho obteve uma média de 2,0 oócitos de boa qualidade (graus I e II) por ovário em bomba a vácuo, enquanto pelo uso da seringa foram recuperados 1,5 oócitos por ovário, nesse experimento ele analisou se houve interferência no método de coleta de oócitos através de bomba a vácuo e seringa. Demonstrando também diferença em relação ao resultado obtido nesse estudo. Vale ressaltar que a qualidade oocitária é um parâmetro importante para a sucesso das biotecnologias. Nunes et al. (2010) relatam que a baixa taxa de recuperação de oócitos, pode ser resultante de diversos fatores, onde os principais são: estado nutricional, oferta de alimento, idade do animal, idade reprodutiva e estímulo hormonal recebido. E Ohashi e Barusseli, (2008) descreve que a obtenção de baixa taxa oocitária, pode ser decorrente do motivo que levou o animal ao abate, o qual em sua maioria é infertilidade ou final da idade reprodutiva.

Tabela 1. Resultado da recuperação de oócitos de ovelhas no abatedouro em Teresina-PI.

Número de ovários	Classificação			
	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
72	14	18	8	12

### Considerações Finais

Ovários de ovelhas oriundas de abatedouros locais da região metropolitana de Teresina, Piauí, apresentam uma baixa taxa de recuperação de oócitos, podendo ser resultante, em particular, do estado de saúde e nutricional dos animais.

### Referências

- Crocomo LF, Filho MWC, Landim Alvarenga FC, Bicudo SD.** Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, n.1, p.25-31, 2012.
- Freitas VJF et al.** Criopreservação de oócitos e embriões. In: Oliveira MEF et al.
- Morton KM, Maxwell WMC, Evans G.** Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and *in vitro* development of ovine oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.106-110, 2007.
- Nunes JF, Moura AAA, Simplicio AA, Souza CEA, Andrade CR, Baril G, Serova I, Salgueiro CCM, Menezes ESB; Castro EV, Serov I, Rego JPA, Martins JAM, Cavalcante JMM, Tavares LMT, Andreeva L, Brasil OO, Martins Filho R, MouraRR, Oliveira RV, Araújo VR, Figueiredo JR, VJF, Melo LM, Serov O.** Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes. Fortaleza. Ed. Fortaleza: Tecnograf, v.1, 208p., 2010
- Ohashi OM, Barusseli PS.** Biotécnicas da reprodução animal aplicadas em bubalinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas á reprodução animal. São Paulo. Editora: Roca, 2a.ed., 2008.p.105-123.
- Teixeira PPM, Padilha LC, Oliveira MEF, Motheo TF, Silva ASL, Barros FFPC, Coutinho LN, FLORES FN, Lopes MCS, Bandarra MB, Rodrigues LFS, Vicente WRR.** Aspiração Folicular por videolaparoscopia em ovelhas. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.16, p.1-10, 2011.



## Uso de resíduo lipídico sobre os parâmetros bioquímicos de ovelhas deslanadas durante a estação de monta

*Use of lipid residue on biochemical parameters of woolless sheep during the breeding season*

Lumária França de Santana<sup>1\*</sup>, Marta Maria Soares de Freitas Almeida<sup>2</sup>, Jaciara Neves da Costa Torreão<sup>3</sup>, Andressa Francisca Silva Nogueira<sup>4</sup>, João Carlos Rocha dos Anjos<sup>5</sup>, Pamela Santos da Costa<sup>6</sup>, Mayara Jane Martins Alves<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, CPCE/UFPI, Campus Bom Jesus, PI; <sup>2</sup>Professora Substituta, CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>3</sup>Professora Adjunta CABJ/CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>4</sup>Professora Auxiliar CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>5</sup>Professor Substituto, CPCE/UFPI, Bom Jesus, PI; <sup>6</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, CPCE/UFPI, Campus Bom Jesus, PI; <sup>7</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, CPCE/UFPI, Campus Bom Jesus, PI, Brasil.

\*E-mail: lumariafranca08@gmail.com

### Abstract

*The objective was evaluate inclusion of increasing levels of lipid residue in diet, replacing energy sources commonly used in blood biochemical parameters of woolless sheep during the breeding season. Was used 24 sheep, between 1 and 6 years old, with an average of 40 kg. The experiment lasted nine weeks. In first six weeks the sheep received flushing, where diets were formulated with increasing levels of lipid residue include replacing corn and soybean meal, and (T1) without addition of waste, (T2) with 5% (T3 ) 10%. The blood serum chemistries for performing was collected once weekly throughout the trial period. The results of the biochemical analyzes of cholesterol, triglycerides and glucose showed no statistical difference. The increasing levels of lipid residue in the diet did not change the blood biochemical parameters of woolless sheep during the breeding season.*

**Keywords:** *cholesterol, triglycerides, glucose.*

**Palavras-chave:** colesterol, triglicérides, glicose.

### Introdução

É possível aumentar a produtividade do rebanho de ovinos no semiárido com técnicas nutricionais e reprodutivas sem grandes custos para o produtor, entre essas ressalta-se: a suplementação alimentar com o fornecimento mínimo de concentrado contendo o máximo de ingredientes que possam ser produzidos pelo próprio produtor (Torreão et al, 2008).

Tem havido uma constante busca por alimentos alternativos ao milho e também por alternativas de alimentação que reduzam o custo de produção. Dessa forma, a indicação da utilização de óleos alimentares usados e óleos não comestíveis como matéria-prima para produção do biodiesel são de grande importância.

A nutrição influencia os índices de fertilidade e produtividade do rebanho, sendo que a mobilização de lipídeos no organismo pode ser alterada pela distribuição e processamento dessas substâncias. Para Fernandes et al. (2012), o metabolismo energético dos ruminantes é avaliado através do lipidograma, e a dosagem das concentrações séricas/plasmáticas de colesterol, triglicérides, associados à glicemia podem expressar com determinado grau de segurança o estado energético dos animais.

O trabalho teve por objetivo avaliar a inclusão de níveis crescentes de resíduo lipídico na dieta, em substituição às fontes energéticas comumente utilizadas, nos parâmetros bioquímicos sanguíneos de ovelhas deslanadas durante a estação de monta.

### Material e Métodos

Utilizou-se 24 ovelhas da raça Santa Inês, entre 1 e 6 anos de idade, com peso médio de 40 kg, sendo 12 nulíparas e 12 múltíparas, não gestantes e com hígidez atestada. O projeto está cadastrado sob o número: CEA 016/14. O experimento foi realizado no Módulo Didático de Pequenos Ruminantes do Colégio Técnico de Bom Jesus-PI.

O período experimental foi de nove semanas, onde nas seis primeiras os animais receberam o *flushing* (onde há um maior suprimento de nutrientes, que influencia o peso e a condição corporal durante a fase reprodutiva), iniciando a estação de monta apenas na quarta semana.

As ovelhas permaneceram durante a fase experimental em baia coletiva provida de comedouro e bebedouro, onde receberam água e silagem de milho *ad libitum* pela manhã e a tarde. Ao final da tarde foram confinadas em baias individuais, e suplementadas com ração concentrada, constituída pela mistura de farelo de soja, milho moído e suplemento vitamínico e mineral. As dietas foram formuladas com níveis crescentes de inclusão de resíduo lipídico em substituição ao milho e ao farelo de soja, sendo a dieta controle (T1) sem adição de resíduo e as demais com níveis crescentes de inclusão do mesmo em substituição aos alimentos energéticos, a fim de prover 5% e 10%, respectivamente nos tratamentos (T2) e (T3), por um período de seis semanas. A suplementação foi de 1,5% do peso vivo/dia, durante o *flushing*, tendo como base o preconizado pelo NRC (2007) com consumo médio de 3,0 Mcal de EM e 120 g de PB.

O sangue para realização da bioquímica sérica foi coletado uma vez por semana durante todo o período experimental, após prévia desinfecção do local e as amostras foram mantidas em isopor com gelo até sua chegada ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da CPCE-UFPI, Bom Jesus, onde foram procedidas as análises de glicose, colesterol total e triglicérides.

Utilizou-se Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com três tratamentos (T1, T2 e T3) e oito repetições. Para diagnóstico dos contrastes entre as médias dos tratamentos foram utilizado o teste de Tukey,  $0,01 \leq p < 0,05$ , utilizando o programa estatístico ASSISTAT (Silva e Azevedo, 2016).

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os parâmetros estudados em diferentes concentrações de resíduo lipídico, bem como as interações estatísticas podem ser observados na Figura 1.

A utilização de suplementação a base de resíduo lipídico em diferentes concentrações não alterou os resultados das análises bioquímicas (colesterol, triglicérides e glicose), que permaneceram dentro dos valores de referência propostos por (Kaneko et al., 2008).

Para Suttle (1986), nos casos em que há desequilíbrio de nutrientes, as dosagens bioquímicas refletem perturbação da homeostase sanguínea, fazendo com que o organismo retire nutrientes dos órgãos estoque para mantê-la, tais alterações não foram observadas no presente trabalho.

Cerca de 90% dos lipídios ligados a lipoproteínas são transportados aos tecidos na forma de fosfolipídios e colesterol, que é um precursor da síntese de hormônios esteróides, (Fernandes et al., 2012). A referência para o parâmetro metabólico colesterol, segundo Kaneko et al. (2008), é 52-76mg/dL, corroborando com os dados obtidos neste experimento, o que ajudou a manter um adequado aporte nutricional, um bom escore corporal, auxiliando na função reprodutiva das ovelhas.

Os triglicérides são a principal forma de armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo, que são compostos por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos (Fernandes et al., 2012). Os níveis séricos/plasmáticos de triglicérides em ruminantes são baixos, devido a sua baixa capacidade de síntese hepática, porém, não há um valor de referência na literatura, portanto, não há como comprovar a sua influência na reprodução.

Os valores obtidos após a suplementação com resíduo lipídico para glicose encontraram-se dentro do valor de referência proposto por Kaneko et al. (2008), que varia entre 50-80mg/dL. A concentração de glicose sanguínea é relativamente constante no organismo animal, em razão de um eficiente mecanismo hormonal destinado à sua manutenção, e somente uma subnutrição muito severa, seria capaz de alterá-la significativamente (Peixoto et al., 2010).

Nesse sentido, observa-se que os níveis de colesterol, triglicérides e glicose no sangue são consequência do equilíbrio nutricional, sendo importante assegurar o aporte de nutrientes, principalmente, de energia, para conseguir manter o nível de produção dentro dos parâmetros desejados sem afetar a função reprodutiva dos animais.

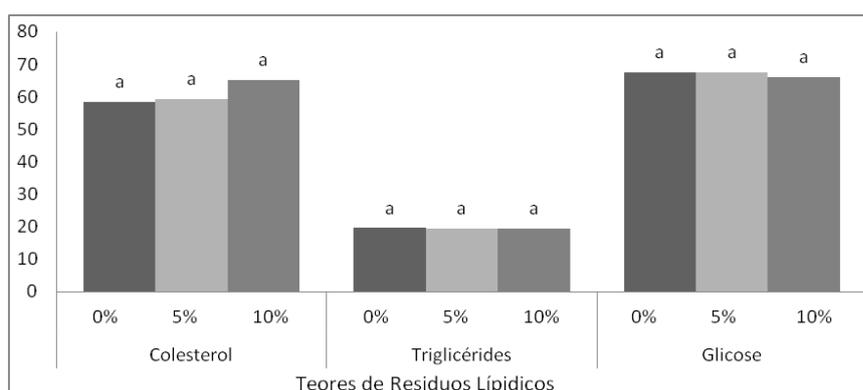


Figura 1. Efeito dos teores crescentes de resíduo lipídico, adicionado na ração, nos parâmetros bioquímicos, colesterol (mg/dl), triglicérides (mg/dl) e glicose (mg/dl) de ovinos. Barras com mesma letra, em cada variável estudada, não diferem estatisticamente entre si, a  $0,01 \leq p < 0,05$  de probabilidade, pelo teste de Tukey. (dms de 11,14; 3,37; e 6,64, respectivamente, para Colesterol, Triglicérides e Glicose).

## Conclusão

Conclui-se que a inclusão de níveis crescentes de resíduo lipídico na dieta, em substituição às fontes energéticas comumente utilizadas, não alterou os parâmetros bioquímicos sanguíneos de ovelhas deslanadas durante a estação de monta.



#### **Referências**

**Fernandes SR, Freitas JA, Souza DF, Kowalski LH, Dittrich RL, Junior PR, Silva CJA.** Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.18, n.1-4, p. 21-32, 2012.

**Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML.** *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6a.ed. San Diego: Academia Press, 2008. 916p.

**National Research Council (NRC).** *Nutrient requirements of small ruminants*. Washington: National Academy Press, 2007. 362p.

**Peixoto LAO, Osório MTM, Osório JCS, Nornberg JL, Pazini M.** Desempenho reprodutivo e metabólitos sanguíneos de ovelhas Ile de France sob suplementação com sal orgânico ou sal comum durante a estação de monta. *Rev Bras Zootec*, v.39, n.1, p.191-197, 2010.

**Silva FAS, Azevedo CAV.** Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assistat. *African J Agric Res*, v.11, n.37, p.3527-3531, 2016.

**Suttle NF.** Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Veterinary Records*, p. 148-152, 1986.

**Torreão JNC, Pimenta Filho EC, Medeiros AN, Gonzaga Neto S, Catanho MTJA, Barreto LMG, Silva JO.** Retorno da atividade cíclica reprodutiva em ovelhas da raça Morada Nova submetidas a diferentes níveis de energia metabolizável. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, v.9, p.621-630, 2008.



## Uso do diluidor ACP102<sup>®</sup> com e sem gema de ovo no sêmen resfriado de ovinos

*Use of ACP102<sup>®</sup> extender with and without egg yolk in sheep cooled semen*

Felipe Pereira da Silva Barçante<sup>1,\*</sup>, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>, Micherlene da Silva Carneiro Lustosa<sup>1</sup>, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro<sup>2</sup>, Janaina de Fátima Saraiva Cardoso<sup>1</sup>, José Ferreira Nunes<sup>3</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina, PI; <sup>2</sup>ACP Biotecnologia; <sup>3</sup>Universidade Estadual do Ceará-UECE, Teresina PI, Brasil.

\*E-mail: felipebarcantevet@gmail.com

### Abstract

*This study aims to evaluate the fertility rate of sheep semen diluted and cooled to 4°C in powder coconut water (ACP-102<sup>®</sup>) with and without egg yolk in artificial insemination by cervical route in sheep. Two ram lambs and 72 ewe lambs were used, divided into 3 groups: ACP-102<sup>®</sup> without egg yolk and cooled to 4°C for 12 hours, ACP-102<sup>®</sup> with 2,5% egg yolk also cooled as the first group and a control group with fresh semen diluted in ACP-102<sup>®</sup> without egg yolk. Pregnancy diagnosis was performed 30 days later. Pregnancy rates were significantly different ( $P < 0.05$ ) between ACP-SGF (58,3%) and ACP-SG4 (20,8%) groups. The ACP-CG4 (37,5%) group did not differ in relation to the ACP-SGF. Therefore, the addition of egg yolk to ACP-102<sup>®</sup> extender favors the viability of sheep semen, cooled to 4°C for 12 hours and fertility of artificially inseminated sheep by cervical route.*

**Keywords:** small ruminants, artificial insemination, coconut water.

**Palavras-chave:** pequeno ruminante, inseminação artificial, água de coco.

### Introdução

Com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluente, visto que é um produto perecível, foi estabilizada e transformada em pó, processo este oriundo da liofilização do líquido endospermico do coco e subsequente formulação de meios específicos para a conservação e criopreservação de células e tecidos, denominado ACP<sup>®</sup> (*Água de Coco em Pó*) (Nunes e Salgueiro, 2011). Após sua ressuspensão, apresenta características bioquímicas muito similares àquelas encontradas no fruto *in natura* (Neves et al., 2008). Além disso, a ACP<sup>®</sup> pode ser facilmente armazenada e enviada para regiões onde o coco não é produzido e também propiciando longa vida de estocagem (Cardoso et al., 2005).

O diluente à base de ACP<sup>®</sup> teve suas características físico-químicas adaptadas ao sêmen de cada espécie recebendo uma denominação específica. Em ovinos, por exemplo, o diluente é chamado de ACP-102<sup>®</sup> (Salgueiro e Gondim, 2005; Nunes e Salgueiro, 2011).

O princípio ativo dos fatores de crescimento presentes na água de coco é uma substância com propriedades semelhantes às auxinas e citocininas, fitohormônios, que agem regulando o crescimento e promovendo a divisão em diversos tipos de células (Nunes e Salgueiro, 1999). Essa substância é denominada ácido 3-indol acético (IAA), uma auxina de origem vegetal (Toniolli et al., 1998; Nunes e Salgueiro, 1999; Neves et al., 2008). O IAA promove uma maior motilidade espermática, aumentando consequentemente os índices de gestação (Azevêdo e Toniolli, 1999).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso de sêmen ovino diluído em ACP-102<sup>®</sup> com e sem gema de ovo e refrigerado a 4°C por 12 horas sobre a taxa de fertilidade “in vivo” após inseminação artificial (IA) cervical de ovelhas mestiças.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Nova Vista, município de Santa Cruz dos Milagres, localizada a 210 km da capital Teresina, Piauí, Brasil. A região apresenta clima semiárido, com vegetação predominante de caatinga.

Foram utilizados dois reprodutores, sendo um Santa Inês e outro Dorper e 72 matrizes mestiças destas raças, com escore corporal entre 2,5 e 4,5. As ovelhas em idade reprodutiva foram selecionadas com auxílio de ultrassonografia, a fim de excluir aquelas gestantes e/ou com problemas reprodutivos. O rebanho foi submetido a sistema de criação semi-intensivo, onde os animais foram conduzidos para pastejo durante o dia e recolhidos durante a noite, momento em que receberam água de boa qualidade e sal mineral específico para ovinos *ad libitum*. As matrizes foram alojadas em aprisco e o reprodutor em baia individual a 150 metros de distância. A infraestrutura de pastejo para o manejo alimentar dos animais foi fundamentada na vegetação nativa e gramíneas cultivadas, sendo nove piquetes com capim Tanzânia (*Panicum maximum*) e capim Mombaça (*Panicum maximum*). Como complementação ao manejo nutricional, as matrizes foram suplementadas com 200 g por animal de concentrado, a base de milho, soja e farelo de trigo, e o reprodutor com ração comercial de manutenção ovina (Fri-ovicapri 20/70, Fri-Ribe, Nutreco Fri-Ribe Nutrição Animal S.A., Teresina- PI).

As matrizes foram divididas em três grupos de 24 animais e a sincronização do estro foi realizada com a utilização de esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP; Progespon<sup>®</sup>, Syntex, Argentina) que permaneceram na porção cranial da vagina por 14 dias. Logo após a retirada das esponjas foi aplicada uma injeção com 300 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Intervet, Holanda) por via intramuscular para estimular a atividade ovariana.

O sêmen foi coletado com o uso de uma vagina artificial adaptada para a espécie e, em seguida, os ejaculados avaliados quanto ao volume, aspecto, motilidade massal, motilidade total, concentração espermática e defeitos morfológicos maiores e menores, de acordo com o Manual de Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Somente foram utilizados os ejaculados que apresentaram morfologia espermática dentro dos padrões do CBRA (2013), volumes superiores a 0,8 ml e concentração espermática superior a  $1,8 \times 10^9$  spz/ml. Foram realizadas duas coletas consecutivas do reprodutor, com intervalo de uma semana, para a inseminação de lotes de ovelhas.

O meio à base de água de coco em pó para sêmen ovino (ACP-102<sup>®</sup>; pH 7.0; 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O; ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil) foi diluído conforme especificação do fabricante. Foram realizados três tratamentos: ACP-102<sup>®</sup> sem gema de ovo e refrigerado a 4°C por 12 horas (ACP-SG4); ACP-102<sup>®</sup> com 2,5% de gema de ovo e refrigerado a 4°C por 12 horas (ACP-CG4); e ACP-102<sup>®</sup> sem gema de ovo e sem refrigeração (controle; ACP-SGF). O sêmen foi diluído até alcançar uma concentração final de um bilhão de espermatozoides/ml, com dose inseminante de 200 milhões de espermatozoides por palheta de 0,25 ml. As IA foram realizadas via cervical, 55 horas após a retirada das esponjas, sendo 24 ovelhas com ACP-SG4, 24 com ACP-CG4 e 24 com ACP-SGF. No tratamento ACP-SGF o tempo decorrido entre a diluição do sêmen e a IA foi de no máximo 30 minutos.

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 dias após a IA, com a utilização de aparelho de ultrassom (Pie Medical 100<sup>®</sup>, Pie Medical, Maastricht, Holanda) equipado com transdutor trans retal de 5,0 MHz.

Para a análise dos dados foi utilizado o estudo de dispersão de frequência com o uso de Qui-Quadrado.

## Resultados e Discussão

Observou-se que a taxa de gestação aos 30 dias foi significativamente superior no tratamento ACP-SGF (controle) em comparação ao ACP-SG4 ( $P < 0,05$ ), contudo não observou-se diferença entre o grupo ACP-CG4 e os tratamentos ACP-SGF e ACP-SG4 ( $P < 0,05$ ) (Tab. 1). As menores taxas de gestação apresentadas com o sêmen diluído em ACP-102<sup>®</sup> sem a adição da gema de ovo e refrigerado a 4°C por 12 horas (20,8%) podem ser explicadas pela ocorrência de danos estruturais na membrana acrossomal com a perda de enzimas decorrente da redução da temperatura no processo de refrigeração (Salamon e Maxwell, 2000; Medeiros et al., 2002). Resultados de fertilidade semelhantes foram encontrados por Machado et al. (2006), que obtiveram 48% de taxa de gestação utilizando ACP-102<sup>®</sup> adicionado de gema de ovo em sêmen refrigerado a 4°C por até 6 horas. Esses resultados demonstram que a gema de ovo apresentou efeito positivo como crioprotetor (Figueirêdo, 2006) adicionada ao ACP-102<sup>®</sup> principalmente em baixas concentrações. Fato este, observado também por Bispo et al. (2011) estudando duas concentrações de gema de ovo (20 e 2,5%) em sêmen caprino, demonstrando uma melhor eficiência na crioproteção, com maiores índices de fertilidade, quando utilizado uma concentração menor de gema de ovo (2,5%).

Tabela 1. Taxas de gestação e prolificidade de ovelhas submetidas a inseminação artificial com sêmen diluído a base de ACP-102<sup>®</sup> em três tratamentos.

Parâmetro	Tratamentos		
	ACP-SG4	ACP-CG4	ACP-SGF
Taxa de gestação aos 30 dias (%)	20,8 <sup>a</sup>	37,5 <sup>ab</sup>	58,3 <sup>b</sup>
Índice de Prolificidade	1,6 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) pelo teste qui-quadrado; ACP-SG4, sêmen diluído em ACP-102<sup>®</sup> sem gema de ovo e resfriado a 4°C por 12 horas; ACP-CG4, sêmen diluído em ACP-102<sup>®</sup> contendo 2,5% de gema de ovo e resfriado a 4°C por 12 horas; ACP-SGF, sêmen fresco diluído em ACP-102<sup>®</sup> sem gema de ovo.

## Conclusão

A adição de gema de ovo ao diluente ACP-102<sup>®</sup> favorece a viabilidade do sêmen ovino refrigerado a 4°C por 12 horas e incrementa a fertilidade de ovelhas inseminadas artificialmente por via cervical.

## Agradecimentos

A empresa ACP Biotecnologia pelo fornecimento do diluente ACP-102<sup>®</sup> e à Fazenda Nova Vista pela disponibilização das instalações e animais experimentais.



### Referências

- Azevêdo DMMR, Toniolli R.** Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácido 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos Marota. *Ciência Animal*, v.9, n.1, p. 37-42, 1999.
- Bispo CAS, Pugliesi G, Galvão P, Rodrigues MT, Ker PG, Filgueiras B, Carvalho GR.** Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v.100, p.54-58, 2011.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM.** Use of the powdered coconut water (ACP-106<sup>®</sup>) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod*, v.2, n.4, p.257-262, 2005.
- Colegio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3a. ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Figueirêdo EL.** Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no Estado do Ceará. 2006. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.
- Machado VP, Nunes JF, Araújo AA, Fernández DRP, Cordeiro MA, Medeiros CHN, Medeiros ALN, Monteiro AWU.** Fertilidade após a inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intrauterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v. 43, p. 43-49, 2006.
- Medeiros, C. M., Forell, F.; Oliveira, A. T. D.; Rodrigues, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, p. 327-344, 2002.
- Neves JP, Nunes JF, Moraes JCF, Souza CJH, Salgueiro CCM, Almeida JL.** Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. (Eds.). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, 2a. ed., São Paulo: Roca, 2008, p. 83-101.
- Nunes JF, Salgueiro CCM.** Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminants Research*, v.98, p.176-184, 2011.
- Nunes JF, Salgueiro CCM.** Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. *Rev Cient Prod Anim*, v.1, n.1, p.17-26, 1999.
- Salamon, S.; Maxwell, W. M. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- Salgueiro CCM, Gondim JM.** Beneficiamento do líquido endospermico do coco para produção de água de coco em pó (ACP). *Revista de Propriedade Industrial*, Rio de Janeiro, p.85, 2005.
- Toniolli R, Bussiére J, Courot M, Combarous Y.** Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on boar sperm motility and pregnancy and prolificacy rates after freezing and thawing. *Reprod Domest Anim*, v.33, p.33-38, 1998.



## Uso do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Baill (Marmeleiro vermelho) na colheita transcervical de embriões de ovelhas Rabo Largo

*Use of the essential oil of Croton nepetaefolius Baill (red quince) in transcervical embryo recovery of Rabo Largo ewes*

**Laisa Gomes Medeiros Ribeiro\***, **Aionne de Souza Leite Guimarães<sup>1</sup>**, **Ana Arlete de Amorim Silva**, **George Antonio Maciel Mudo**, **Hélder Anderson Lima Silva**, **Eldo Gonçalves de Souza Silva**, **Mabel Freitas Cordeiro**, **Edilson Soares Lopes Júnior**

Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Brasil.

\*E-mail: laisamedeiros@hotmail.com

### Abstract

*With the objective of evaluating the Croton nepetaefolius Baill in the transcervical harvest of ovine embryos, we used twelve sheep and two rams of Rabo Largo breed. After estrus synchronization and superovulation, the females were submitted to the embryonic transcervical harvest, being randomly distributed into three groups (n = 4). The PGF<sub>2α</sub> group received 75 µg of cloprostenol (IM), twenty four hours before harvest; and groups OECn100 and OECn300 received in the background of the vaginal sac, five minutes before harvest, 100 µg / mL and 300 µg / mL of the oil, respectively. We used ANOVA and the Tukey test for the results analysis, at a probability of 5%. There was no significant difference for all parameters, between the treatment groups (P > 0.05). Croton nepetaefolius Baill essential oil did not facilitate cervical transposition of all harvested animals and did not result in embryo recovery.*

**Keywords:** cervix, dilatation, sheep.

**Palavras-chave:** cérvix, dilatação, ovino.

### Introdução

Nos programas de Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões em ovinos, a colheita de embriões pode ser feita pelo método Transcervical, reduzindo os riscos de aderência, gastos com equipamentos e aumentando a vida útil reprodutiva das doadoras (Fonseca et al., 2012). Todavia, por conta da complexidade anatômica da cérvix ovina, é necessário usar um dilatador cervical (Gusmão et al., 2009). No semiárido do nordeste brasileiro, há plantas que possuem óleos essenciais com ação miorelaxante na cérvix, como o *Croton nepetaefolius* Baill, conhecido como Marmeleiro vermelho (Pereira, 2006). No entanto, essa ação ainda não foi avaliada na cérvix ovina *in vivo*. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do óleo essencial *Croton nepetaefolius* Baill na obtenção de embriões ovinos, pela via transcervical.

### Material e Métodos

Foram utilizadas 12 ovelhas da raça Rabo Largo, como doadoras de embriões, e dois carneiros da mesma raça para monta natural. A sincronização estral foi realizada, durante 14 dias, com a inserção do dispositivo intravaginal liberador de progesterona. Quarenta e oito horas antes da remoção do dispositivo, foi iniciado o tratamento superovulatório com pFSH, em seis doses intramusculares e decrescentes (32/32; 16/16; 16/16 mg), intervaladas por 12 horas. Após 12 horas da retirada do CIDR, iniciou-se a detecção de estro, com intervalos de 4 horas, seguida de monta natural. No dia 6, as fêmeas foram submetidas à colheita transcervical embrionária, sendo distribuídas ao acaso em três grupos (n = 4). O grupo PGF<sub>2α</sub> recebeu 75 µg de cloprostenol (IM), 24 h antes da colheita; e os grupos OECn100 e OECn300 receberam no fundo do saco vaginal, 5 minutos antes da colheita, 100 µg/mL e 300 µg/mL do óleo, respectivamente. Para a colheita transcervical, foi feita a administração de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor, pela via epidural alta. Foi inserido um espéculo de Collins vaginal para localização da cérvix. Com duas pinças Allis (26 cm), foi feito o pinçamento das bordas do óstio cervical e sua tração. Introduziu-se uma sonda nasogástrica curta n° 10, equipada com o êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos no canal cervical que permitiu duas vias de comunicação: uma das vias comunicou-se com o filtro coletor de embriões e a outra se ligou à mangueira do meio de lavagem. Uma seringa de 60 mL contendo DMPBS, a 37°C, foi conectada a este dispositivo para iniciar a lavagem uterina, sendo o lavado recuperado em filtro coletor de embriões, vertido em placas de Petri e submetido à procura, identificação e quantificação das estruturas em estereomicroscópio. Para análise dos resultados, foi utilizada a ANOVA e o teste de Tukey, a uma probabilidade de 5%. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher e Qui-quadrado, a uma probabilidade de 5%.

### Resultados e Discussão

Três animais não foram submetidos à colheita embrionária por apresentarem defeitos congênitos no trato reprodutivo, e com exceção deles, a passagem cervical foi possível em todos os animais (n = 9). Não houve



diferença significativa entre nos grupos de tratamento para os parâmetros tempo de passagem, taxa de recuperação, número de corpos lúteos e taxa de recuperação embrionária. Nenhum embrião foi recuperado, dado contrário ao de Gusmão et al. (2007), que recuperaram  $6,02 \pm 3,61$  (média  $\pm$  erro padrão) embriões na coleta transcervical de embriões em ovelhas Santa Inês superovuladas com pFSH. Isso pode ser justificado pela baixa taxa de recuperação do líquido infundido. Além disso, na época da seleção dos animais, num plantel de 200 matrizes, apenas as 12 utilizadas nesse trabalho estavam vazias, ficando evidente uma seleção negativa do rebanho. Houve, ainda, a presença de conteúdo uterino purulento em três animais que foram submetidos à colheita, o que é incompatível com o desenvolvimento embrionário.

#### **Conclusão**

O óleo essencial do *Croton nepetaefolius* Baill nas concentrações 100  $\mu\text{g/mL}$  e 300  $\mu\text{g/mL}$  não facilitou a transposição cervical de todos os animais submetidos à colheita e não promoveu recuperação embrionária.

#### **Referências**

- Fonseca JF, Viana JHM, Barros PMC.** Sonda para coleta de embriões pela via transcervical em caprinos e ovinos. Embrapa, 2012.
- Gusmão AL, Silva JC, Quintela A, Moura JCA, Resende J, Gordiano H, Chalhoub M, Ribeiro Filho AL, Bittencourt TCBSC, Barbosa LP.** Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no Semiárido Nordeste. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.8, p.1-10, 2007.
- Pereira AF.** Caracterização farmacológica parcial da cérvix ovina (*Ovis aries*): influência da fase do ciclo estral na resposta tecidual e atividade miorrelaxante do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Baill. 2006. 74f: Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2006.



## Validação de primers para análises quantitativas por PCR em tempo real dos genes *FSHR*, *LHR* e *HAS2* em tecidos caprinos

*Primers validation for quantitative real-time PCR analysis of FSHR, LHR and HAS2 genes in caprine tissues*

Jeferson Lucas Sousa Freitas, Kalil Andrade Mubarak Romcy\*, Ana Clara Negreiros Parente Capela Sampaio Viana, Vicente José de Figueirêdo Freitas, Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Luciana Magalhães Melo

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

\*E-mail: kakkd12@gmail.com

### Abstract

*This study aimed to validate primers to amplify FSHR, LHR and HAS2 genes for quantitative analysis in goat. Thus, total RNA samples were extracted from both goat and bovine cumulus cells and reverse transcribed to obtain cDNA. Specific primer pairs were designed using Primer-BLAST software. First, primer concentrations were adjusted to achieve the lowest Ct (threshold cycle). Subsequently, standard curves were constructed by serial dilution of cDNA. After primers concentrations adjustment, all primer pairs produced specific amplicons in the presence of the target DNA. The optimized concentration of primer pairs was 1.0  $\mu\text{M}$  and 0.8  $\mu\text{M}$  for primers HAS2-1 and HAS2-2, and 3.0  $\mu\text{M}$  for FSHR and LHR pair of primers. The primer efficiencies accessed by standard curves were: 1.01 for HAS2-1; 1.15 for HAS2-2; 1.02 for FSHR and 0.98 for LHR. In conclusion, all primers designed were appropriate for quantitative gene expression analysis purposes.*

**Key words:** Goat, qPCR, reference gene.

**Palavras-chave:** Caprino, qPCR, genes de referência.

### Introdução

Biotécnicas da reprodução animal têm sido crescentemente utilizadas nas últimas décadas. A produção *in vitro* de embriões é uma das principais ferramentas que, no cenário mundial, contribuem para a pesquisa reprodutiva e melhoramento genético do rebanho (Hyttel et al., 2001), sendo que o avanço desta biotécnica reprodutiva acompanha o passo do progresso das técnicas biomoleculares modernas (Assou et al., 2013).

Assim, sabe-se que na fisiologia reprodutiva de diversas espécies animais são expressos numerosos genes correlacionados à maturação oocitária, cujos produtos e mecanismos bioquímicos, provindos desta expressão gênica, são interdependentes entre si (Crocomo et al., 2011). Um exemplo são os genes de receptores de hormônio foliculo-estimulante (FSHR), receptores de hormônio luteinizante (LHR) e da enzima ácido hialurônico sintase-2 (HAS2), todos atuantes no processo de maturação oocitária (Santos et al., 2016).

Porém, apesar de bem descritos algumas rotas bioquímicas da fisiologia reprodutiva, ainda são necessários estudos sobre a análise da expressão gênica destes genes. E a aplicação de técnicas biomoleculares modernas, no contexto reprodutivo, vêm, muito rapidamente, acrescido conhecimento neste campo (Wang et al., 2009). Dentre as técnicas moleculares, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) mostra-se como recurso de análise específica e sensível, com inúmeras aplicações em estudos voltados à reprodução animal.

### Material e Métodos

O RNA total foi extraído a partir de amostras de células do *cumulus* de bovinos e caprinos por meio do kit RNeasy Micro Kit (Qiagen Inc., Valencia, USA), e do córtex ovariano através do kit ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, USA) seguindo as instruções dos fabricantes. Foi realizada, em seguida, a transcrição reversa para obtenção de cDNA. O material resultante foi armazenado em freezer -80°C até a realização do experimento.

Foram desenhados pares de primers para cada um dos genes usando o software Primer-BLAST (Ye et al., 2012) e por alinhamento das sequências bovinas e caprinas usando o software ClustalW2 ((Larkin et al., 2007). Foi feito um ajuste na concentração dos primers para se obter a menor Ct (*threshold cycle*). As concentrações ótimas de cada par de primer foram determinadas nas reações de qPCR. Em seguida, para avaliar a eficiência de amplificação dos primers, foram construídas curvas-padrão por diluição seriada de cDNA, em triplicata. O cDNA de células do *cumulus* bovinas foi utilizado para os ensaios dos primers de HAS2, e o cDNA de córtex ovariano foi destinado às reações de amplificação dos genes *FSHR* e *LHR*.

### Resultados e Discussão

Todos os pares de primers geraram produtos específicos na presença de DNA alvo. Tiveram como concentração ótima de 3,0  $\mu\text{M}$  os primers para amplificação de *FSHR* e *LHR*, ao passo que os primers HAS2-1 e HAS2-2, ambos para amplificação de *HAS2*, tiveram como melhor concentração 1,0  $\mu\text{M}$  e 0,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

No que diz respeito às curvas-padrão, as eficiências das amplificações obtidas foram: 1,02 para FSHR (linearidade 0,991 e Ct variando de 22,54 a 34,14); 0,98 para LHR (linearidade 0,990 e Ct de 22,17 a 33,63);



1,01 para HAS2-1 (linearidade 0,993 e Ct de 19,88 até 33,12) e 1,15 para HAS2-2 (linearidade 0,987 e Ct de 20,86 até 30,96).

O presente estudo visou a validação de primers para abordagens de quantificação da expressão gênica por qPCR dos genes *FSHR*, *LHR* e *HAS2*. Adicionalmente, os primers foram desenhados para amplificarem regiões conservadas de duas espécies, caprina e bovina, para possíveis análises comparativas.

Inicialmente, os primers foram testados quanto a especificidade (amplificação de produto alvo designado por pico único na curva de *melting*). Assim, todos os pares de primers produziram produtos específicos, significando que, na presença do DNA molde, ocorre a polimerização da região ao qual foi desenhado para amplificar, sem a presença de produtos inespecíficos ou dímeros.

O par de primers gbFSHR demonstrou uma ótima eficiência de 1,02 em de tecido ovariano caprino. Essa amostra apresenta ampla variedade de tipos celulares, e o achado de uma Ct relativamente baixa (22,17) aponta a presença de receptores de FSH em elevada concentração. O resultado era esperado pois a expressão de RNA mensageiro de FSHR ocorre desde folículos primários, até secundários e pequenos pré-antrais (Saraiva, et al., 2009; Marelli, et al., 2014). De maneira similar, teve ótimo desempenho a curva padrão para o gene *LHR* com o par de primers gbLHR, cuja eficiência alcançou 0,98, e Ct 22,17, equiparando-se ao obtido com o primer gbFSHR. Tal similaridade de resultados pode ser explicada devido à presença de ambos receptores no mesmo tipo celular presente na amostra de tecido ovariano, mesmo em condições hormonais distintas (Santos, et al., 2016).

Para o primer HAS2-1 obteve-se a menor Ct (19,88) e melhor eficiência 1,01, quando comparado ao primer HAS2-2 (Ct 20,86 e eficiência 1,15), em ensaios que fizeram uso de cDNA de células do *cumulus*. Os discrepantes resultados refletem o diferente desenho de primers como tentativa de achar a melhor região amplificável para o gene de ácido hialurônico sintase-2. Foi denotado então, que o melhor primer para essa amplificação é o HAS2-1, dados os parâmetros dos ensaios executados.

### Conclusão

Os pares de primers avaliados no presente estudo servem para análises quantitativas por qPCR dos genes *FSHR*, *LHR* e *HAS2*. Entretanto o primer HAS2-2 demonstrou ser pouco eficiente no que diz respeito à amplificação, não podendo ser aplicado para propósitos quantitativas.

### Referências

- Assou S, ALET, Haouzi D, Philippe N, Lecellier CH, Piquemal D, Commes T, Ait-Ahmed O, Dechaud H, Hanamah S. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod*, v.28, n.11, p.3038-3049, 2013.
- Crocomo LF, Marques Filho WC, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD. Biochemical and ultrastructural aspects of oocyte maturation. *Veterinária e Zootecnia*, v.18, n.4, p.542-552, 2011.
- Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen P. D, Callesen H, Vos P. L, Hendriksen P. J, Dieleman S. J, Schellander K, Besenfelder U, Greve T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Anim Reprod Sci*, v.122, n.1, p.21-30, 2001.
- Marelli BE, Diaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Science direct*, v.14, n.4, p.133-139, 2014.
- Santos JDR, Batista RI, Magalhães LC, Paula AR, Souza SS, Salamone DF, Bhat DM, Teixeira DI, Freitas VJ, Melo LM. Overexpression of hyaluronan synthase 2 and gonadotropin receptors in cumulus cells of goats subjected to one-shot eCG/FSH hormonal treatment for ovarian stimulation. *Anim Reprod Sci*, v.170, p.1-36, 2016.
- Saraiva MVA, Celestino JJ, Araújo VR, Chaves RN, Almeida AP, Lima VIB, Duarte AB, Silva GM, Martins FS, Bruno JB, Matos MH. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. *Zygote*, v.19, n.3, p.205-214, 2010.
- Wang HX, Tong D, El-Gehani F, Tekpetey FR, Kidder GM. Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. *J Cell And Mol Med*, v.13, n.5, p.972-984, 2009.



## Validação de primers para análises quantitativas por PCR em tempo real dos genes *GJA1*, *GJA4*, *UXT* e *18S* em tecidos caprinos

*Primer validation for quantitative real-time PCR analysis of GJA1, GJA4, UXT and 18S genes in caprine tissues*

Jeferson Lucas Sousa Freitas\*, Ana Clara Negreiros Parente Capela Sampaio Viana, Kalil Andrade Mubarak Romcy, Vicente José de Figueirêdo Freitas, Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Luciana Magalhães Melo

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

\*E-mail: jefersonlucaspa@gmail.com

### Abstract

*This study aimed to validate primers to amplify GJA1, GJA4, UXT and 18S genes for quantitative analysis in goats. Thus, total RNA was extracted from goat brain samples and reverse transcription was performed. Primer pairs were designed using Primer-BLAST software. First, primer concentrations (0.3, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu$ M) were adjusted to achieve the lowest Ct (threshold cycle) value in qPCR reactions. Subsequently, standard curves were constructed by serial dilution of cDNA. After primer concentrations adjustment, all primer pairs produced specific amplicons in the presence of the target DNA. The optimized concentration of primer pairs was 0.6  $\mu$ M to amplify most of the genes. At the standard curves, the following primer efficiencies of amplification were found: 0.92 for gb18S; 1.03 for gbUXT; 1.03 for gbGJA1; 1.05 for gGJA1; 2.27 for gbGJA4; 1.83 for gGJA4. In conclusion, for quantitative gene expression analysis, only the primers designed for UXT and GJA1 were appropriate.*

**Key words:** Goat, qPCR, reference gene.

**Palavras-chave:** Caprino, qPCR, genes de referência.

### Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem alcançado significativos avanços nos últimos anos. Na espécie caprina, no entanto, esta biotecnologia ainda necessita de estudos para obtenção de melhores resultados. Um aspecto relevante é obtenção de oócitos competentes ao desenvolvimento, e consequentemente boas taxas de maturação oocitária *in vitro* (Watson, 2007).

No ambiente folicular, a comunicação direta entre o oócito e as células do *cumulus* ocorre via junções *gap*, canais transmembrana formados por subunidades proteicas chamadas conexinas (Santiquet et al., 2013). Essa comunicação é importante para o controle da maturação oocitária, uma vez que regula a passagem de pequenas moléculas (< 1 kDA), como substâncias inibitórias da meiose, entre as células (Isobe et al., 1998).

Nessa perspectiva, investigações abordando a expressão gênica de conexinas em animais de produção, como caprinos, são especialmente úteis pois fornecem informações cruciais que podem refletir na competência ao desenvolvimento do oócito e, portanto, aumentando o sucesso das técnicas reprodutivas.

### Material e Métodos

RNA total foi extraído a partir de amostras de cérebro caprino usando reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, USA) e a partir de células do *cumulus* caprinas usando RNeasy micro kit (Qiagen Inc., Valencia, USA), seguindo as instruções dos fabricantes. Subsequentemente, a transcrição reversa foi realizada para obter cDNA e os produtos resultantes foram armazenados a -80°C.

Pares de primers foram desenhados para amplificação dos genes *GJA1*, *GJA4*, *UXT* e *18S* (Tab. 1) usando o software Primer-BLAST (Ye et al., 2012) e por alinhamento múltiplo das sequências de caprino (*Capra hircus*) e bovino (*Bos taurus*) usando o software ClustalW2 (Larkin et al., 2007). Para os genes *GJA1* e *GJA4* foram desenhados dois pares de primers para cada. Os primers com a sigla “gb” (*goat* e *bovine*) foram desenhados para amplificar em ambas as espécies; os primers com a sigla “g”, amplificar somente na espécie caprina.

Tabela 1. Pares de primers desenhados para amplificação por qPCR dos genes *GJA1*, *GJA4*, *UXT* e *18S*.

Sigla	Descrição	GenBank*	Primers**	Tamanho do produto (pb)
<i>GJA1</i>	Conexina 43	XM_005684517.2	gbGJA1-F/gbGJA1-R	94
		NM_174068.2		
		XM_005684517.2	gGJA1-F/gGJA1-R	137
<i>GJA4</i>	Conexina 37	XM_005678725.2	gbGJA4-F/gbGJA4-R	240
		NM_001083738.1		
		XM_005678725.2	gGJA4-F/gGJA4-R	157
<i>UXT</i>	Proteína de transcrição ubiquamente expressa	XM_005700842.2 NM_001037471.2	gbUXT-F/gbUXT-R	129
<i>18S</i>	Subunidade ribossomal	AM711869.1 AF176811.1	gb18S-F/gb18S-R	169

\*Na coluna “Genbank”, o primeiro código refere-se à espécie caprina; o segundo, à espécie bovina. \*\*Primers com prefixo “g” foram desenhados somente para a espécie caprina; com prefixo “gb”, ambas as espécies.



Inicialmente, a concentração dos pares de primers foram ajustadas para alcançar o menor valor de Ct (*threshold cycle*) possível. Assim, cada par de primer foi testado em reações de PCR em tempo real (qPCR) para as concentrações de 0,3, 0,6, 0,8 e 1,0  $\mu\text{M}$ , usando molde de cDNA oriundo de amostras de cérebro. Também nesses ensaios, curvas de *melting* foram geradas para analisar a especificidade de amplificação dos primers com relação aos seus respectivos moldes de cDNA. Subsequentemente, curvas padrão foram construídas por diluição seriada de cDNA, em triplicata, para avaliar a eficiência de amplificação dos primers. O molde de cDNA usado para todos os genes foi obtido a partir de amostras de cérebro excetuando-se no ensaio com o gene *GJA4*, que usou cDNA originário de células do *cumulus*.

## Resultados e Discussão

O objetivo desse trabalho foi desenhar e validar primers para serem utilizados em análises quantitativas de expressão gênica por qPCR dos genes das conexinas 43 (gene *GJA1*) e 37 (gene *GJA4*) e dos genes de referência *UXT* e *18S*. Para tanto, foi determinado a concentração ótima de primers para cada gene a ser amplificado, assim como foi avaliado a capacidade desses primers de gerar produtos de amplificação (*amplicons*) específicos na presença de DNA alvo através de curvas de *melting*. Além disso, a eficiência de amplificação desses mesmos primers foi avaliada em ensaios de curva padrão. Os primers usados nesse trabalho foram desenhados levando em consideração regiões conservadas entre as espécies caprina e bovina devido a perspectivas de investigações futuras comparando as duas espécies.

A concentração ótima dos primers gbGJA1, gGJA4, gbUXT e gb18S, senso e antisenso, foi 0,6  $\mu\text{M}$ . Já para gGJA1 e gbGJA4, a melhor concentração foi 0,3 e 0,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Todos os pares de primers geraram *amplicons* específicos na presença de DNA alvo, como é demonstrado por um único pico nas curvas de *melting*. Significa dizer que as regiões para quais os primers foram desenhados estão sendo amplificadas corretamente e que não há formação de produtos inespecíficos.

No tocante às curvas-padrão, os primers desenhados para amplificação do gene *18S* apresentaram uma eficiência de apenas 0,92 (linearidade 0,988 e Ct variando de 12,37 até 26,28). Em trabalho realizado com a mesma espécie, porém em tecido distinto (Zhu et al., 2015), esse mesmo gene obteve eficiência de amplificação de 0,98. Assim, é possível que a região do gene que foi amplificada com os primers do presente estudo não é a mais adequada. Com relação ao gene *UXT*, esse obteve eficiência de amplificação de 1,03 (linearidade 0,996 e Ct variando de 22,20 até 33,82). O trabalho de Bonnet et al. (2013) aponta esse gene como sendo o mais adequado para ser usado utilizado como gene de referência em, pelo menos, dois tecidos na espécie em questão. Os primers para o gene *GJA1* apresentaram eficiências de amplificação elevadas, ou seja, 1,03 para o par gbGJA1 (linearidade 0,996 e Ct variando de 18,62 até 32,27) e 1,05 para o par gGJA1 (linearidade de 0,996 e Ct variando de 17,87 até 29,34). Por fim, os primers desenhados para amplificar o gene *GJA4*, geraram as piores eficiências, 2,27 para o par gbGJA4 (linearidade 0,933 e Ct variando de 23,82 até 32,19) e 1,83 para gGJA4 (linearidade 0,949 e Ct variando de 22,07 até 31,12). Esses valores são inadequados para análises quantitativas e podem ser oriundos da formação dímeros de primers ou estruturas secundárias indesejáveis.

## Conclusão

Todos os pares de primers avaliados nesse estudo demonstraram especificidade suficientes para validá-los para uso em análises qualitativas. Todavia, combinado os resultados de especificidade com as análises de eficiência das curvas-padrão, concluímos que somente os pares de primers desenhados para amplificar os genes *UXT* e *GJA1* mostraram características compatíveis com abordagens quantitativas, como aquelas envolvendo análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

## Referências

- Bonnet M, Bernard L, Bes S, Leroux C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in adipose tissue, muscle, liver and mammary gland from ruminants. *Animal*, v.7, p.1344-1353, 2013.
- Isobe N, Maeda T, Terada T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. *J Reprod Fertil*, v.113, p.167-172, 1998.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v.23, p.2947-2948, 2007.
- Santiquet N, Robert C, Richard FJ. The Dynamics of Connexin Expression, Degradation and Localisation Are Regulated by Gonadotropins during the Early Stages of In Vitro Maturation of Swine Oocytes. *PLoS One*, v.8, p.e68456, 2013.
- Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci*, v.85, (E. Suppl.):E1-E3, 2007.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, v.13, p.134, 2012.
- Zhu W, Lin Y, Liao H, Wang Y. Selection of Reference Genes for Gene Expression Studies Related to Intramuscular Fat Deposition in *Capra hircus* Skeletal Muscle. *PLoS ONE*, v.10, p.e0121280, 2015.