



Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementado com captopril

In vitro production of embryos Cattle in medium supplemented with captopril

Viviany de Sousa Rodrigues^{1*}, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco¹, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva¹, Micherlene da Silva Carneiro Lustosa¹, Marlon de Araújo Castelo Branco¹, Antônio de Sousa Júnior², Geraldo Magela Côrtes Carvalho³, José Adalmir Torres de Souza¹

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

*E-mail: viviousarodrigues@hotmail.

Resumo

The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation of maturation medium with captopril, and its consequences in the bovine maturation, fertilization and embryo development *in vitro*. 326 bovine ovaries from a local slaughterhouse were used. 1101 CCOs were recovered and distributed in four groups: G1 (n = 112), that was control group; G2 (n = 322) 20µM of captopril; G3 (n = 367) 40µM of captopril; and G4 (n = 300) captopril 80µM and later submitted to IVM. The matured CCOs were fertilized, and co-incubated. After fertilization, 676 presumptive zygotes were cultured and maintained in the greenhouse for 7 days. The total number of viable embryos was 12; 39; 32 and 31, respectively in the experimental groups. Considering the experimental conditions adopted, it was concluded that the addition of the Captopril in medium of oocytes IVM positively doesn't influence embryonic development, as evidenced by the similar percentages of embryo production.

Palavras chaves: angiotensina, captopril, PIVE.

Keywords: angiotensin, captopril, PIVE.

Introdução

A maior frequência de utilização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) nos últimos anos deve-se a melhora significativa dos meios de cultivo *in vitro*, resultando no aumento da produção quantitativa e qualitativa, apesar das variações relacionadas à taxa de clivagem e produção de mórulas e blastocistos do sistema PIVE (Looney et al., 1994). Uma alternativa para melhorar os índices de produção *in vitro* seriam modificações nos meios usados para maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário. A maturação oocitária é um processo fundamental na produção *in vitro* de embriões visto que as etapas seguintes do processo são dependentes da maturação completa dos oócitos, porém o sucesso na maturação não garante sucesso nos eventos subsequentes (Sirard et al., 2006).

A participação do sistema renina angiotensina a regulação do desenvolvimento folicular foi demonstrada por Costa et al. (2003). A Angiotensina II atuando como um mediador intrafolicular do LH, também previne o efeito inibitório das células foliculares durante a maturação nuclear *in vitro* (Barreta et al., 2008).

Trabalhos utilizando captopril no meio de maturação mostraram que a inclusão de 20 µM de captopril influenciou no desenvolvimento das estruturas embrionárias, produzindo, maior número de embriões viáveis (Sousa Júnior et al., 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação com captopril, e suas consequências na maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* bovino.

Material e Métodos

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

Sob fluxo laminar os CCOs aspirados foram depositado em placa de Petri de 100 x 20 mm (Corning®) para pesquisa sob estereoscópio de oócitos grau I e II (Viana et al., 2004), que posteriormente foram lavados três vezes e colocados em cultura de meio MIV constituído de TCM 199 suplementado, e adicionado captopril em 0 µM, 20 µM, 40 µM e 80 µM constituindo os tratamentos, respectivamente. Foram realizados sete repetições e utilizados 10 a 20 oócitos por 100 µL/gota. Os CCOs foram incubados em atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5 °C por 24 horas.

Para fecundação dos oócitos maduros foi utilizado sêmen congelado em palheta de 0,5 de um único touro CPD (Curraleiro Pé-Duro) de mesma partida, o qual foi preparado segundo a técnica de gradiente de Percoll. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 37°C por 30 segundos, adicionado na porção superior



do gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Bahia, Brasil) com densidade descontínua (90%,45%), em um microtubo de 1,5 mL, centrifugado a 1300 RPM durante 10 minutos. Posteriormente o sêmen foi resuspenso com meio FIV e recentrifugado por 3 minutos a 1300 RPM para lavagem. Para fecundação os oócitos foram retirados do meio MIV, lavados em meio FIV colocados 10 a 20 oócitos para cada 100 µL/gota de meio FIV. As estruturas foram co-incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5 °C por 22 horas.

Os presumíveis zigotos foram retirados do meio FIV, lavados em meio SOF e transferidos para placa de Petri, contendo microgotas de 100 µL de meio SOF, mantidos em estufa à temperatura de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias.

O primeiro e o segundo *feeding* foram realizados no terceiro e quinto dia, respectivamente. No terceiro dia de cultivo foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões. No sétimo dia de cultivo foi avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário.

Resultados e Discussão

Um total de 1101 oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, e avaliados quanto a taxa de clivagem na presença e ausência de captopril. Os resultados foram expressos na Tab. 1. Não houve diferença estatística na avaliação da taxa de clivagem ($P < 0,05$). A clivagem ocorreu independente da presença de captopril no meio de maturação.

Também não se observou diferenças significativas entre os grupos, quando se correlacionou o número de embriões viáveis com o número de CCOs em FIV de acordo com a Tab. 1.

Este estudo avaliou oócitos bovinos cultivados em quatro suplementações distintas de captopril, sendo a eficácia do meio mensurada através do número de oócitos em estágio de metáfase II (maturados), pela taxa de clivagem e produção de embriões. Não houve diferença estatística na avaliação da taxa de clivagem, produção de embriões e maturação oocitária ($P < 0,05$). Giometti (2005) que mostra que a Angiotensina II não atua diretamente no oócito, e seu efeito positivo sobre a maturação só pode ser observado quando as células foliculares estão presentes no sistema de cultivo *in vitro*. No presente trabalho não foi utilizado células da teca em co-cultivo com CCOs, por isso possivelmente não foi encontrado interferência do inibidor seletivo da ECA na clivagem, maturação e produção de embriões.

Em folículos bovinos, ambos os tipos de receptores de Ang II foram detectados em células da teca, mas não em células da granulosa (Acosta et al., 1999) isto explica porque o efeito de Ang II ocorreu apenas quando as células da teca estavam presentes no sistema de cultura de oócitos (Stefanello et al., 2006).

A falta de efeito do inibidor de ECA (captopril) sobre a fecundação e desenvolvimento embrionário, pode ser indicativos de que um peptídeo mais ativo cuja formação não dependa de ECA, como é o caso da Ang-(1-7) atue na maturação nuclear oocitária. Estudos já relataram a presença de Ang-(1-7) nos ovários de rata para um efeito estimulatório desta sobre a produção de estradiol (Costa, 2000), sugerindo a presença de uma via enzimática alternativa que atue na maturação nuclear.

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

Considerando-se as condições experimentais adotadas, concluiu-se que a adição captopril ao meio de MIV de oócitos bovinos não influencia positivamente o desenvolvimento embrionário, como evidenciado pelas porcentagens similares de produção de embriões.

Tabela 1. Efeito do captopril em meio MIV em CCOs nas taxas de clivagem e produção de blastocisto bovino

MIV	TCLIV	TEV	TEV/TCLIV
0 µM	66,67 %	13,33%	20,00 %
20 µM	65,31 %	12,24 %	18,80 %
40 µM	68,00 %	11,07 %	10,86 %
80 µM	66,67 %	11,76 %	18,80 %

*Médianas seguidas de letras iguais não diferem entre-se pelo teste kruskal wallis ($P < 0,05$).

Referências

- Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles *in vitro*: Effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol Reprod*, v. 61, p. 1419-1425, 1999.
- Barreta MH, Oliveira JFC, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, Gonçalves PBD. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2α. *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, p.1942-1948, 2003.
- Costa AP, Reis AM. O sistema renina-angiotensina em ovário. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia &*



Metabologia, v.44, p.306-313, 2000.

Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5-20, 2002.

Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

Giometti IC, Bertagnoli AC, Ornes RC, da Costa LF, Carambula SF, Reis AM, de Oliveira JF, Emanuelli IP, Gonçalves PB. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, p.1014-1025, 2005.

Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v.41, p.67-72, 1994.

SAS. 2002. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

Sousa Júnior A. Utilização do captopril e da angiotensina II na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2014. 75p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Teresina, 2014.

Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, Gonçalves PB. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.66, p.2068-2076, 2006.

Viana JHM, Camargo LSA, Ferreira AM, Sá WF, Fernandes CAC, Marques Júnior AP. Short intervals between ultrasonographically-guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Anim Reprod Sci**, v.84, p.1-12, 2004.



Dopplerfluxometria na avaliação andrológica de bovinos no período peripuberal

Dopplerfluxometry on breeding soundness evaluation of peripubertal bulls

Joaquim Henrique Lima Cunha¹, Itamara Gomes França¹, Hélyda Gomes Pereira¹,
Joaquim de Sousa Lima¹, Bento Douglas Brito Miranda¹, Laryssa Vieira da Silva¹, Diego Luiz Ribeiro¹,
José Ribamar de Souza Torres Júnior^{1*}

¹Universidade Federal do Maranhão-UFMA, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais-CCAA.

*E-mail: jrtoresjr@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the testicular Doppler and sperm traits in young bulls at different age groups (<18 and >24 months of age). Doppler ultrasonography was performed to study testicular blood flow. It was conducted breeding soundness evaluation and physical and morphological characteristics of semen were evaluated. The <18 months old bulls showed lower body weight and lower scrotal circumference. There was no effect of age on body condition score nor on the response to electroejaculation stimulus. The percentage of pubertal animals was higher in >24 months old animals. In pubertal animals, the percentage of normal sperm cells did not differ significantly. The Doppler evaluation of testicular plexus and parenchyma blood vessels showed no significant differences in velocimetry nor flowmetry. It was concluded that there is no significant relationship between scrotal circumference, sperm characteristics and testicular Doppler data in normal bulls during the peripubertal period.

Keywords: testicular doppler, ultrasound, semen.

Palavras-chave: doppler testicular, ultrassonografia, semen.

Introdução

O exame andrológico auxiliado pelo o ultrassonográfico testicular tem se tornado um método rápido e não invasivo, que por meio dos dados obtidos pelo exame clínico pode obter um diagnóstico precoce de desordens presentes nesse órgão (Pechman e Eilts, 1987). Resultados de exame clínico, aliados a análise do sêmen podem ser insuficientes para uma avaliação de um animal com queda de fertilidade, sendo necessária a visualização por meio da ultrassonografia sobre possíveis alterações patológicas como também na escolha de um tratamento efetivo de possíveis anomalias (Cardilli et al., 2010).

A principal causa de degeneração testicular está relacionada com a elevação da temperatura testicular e problemas endócrinos mediados pelo estresse calórico sofrido pelos animais (Freneau. 2011). Qualquer elevação fora do normal na temperatura testicular a demanda e metabolismo de oxigênio aumenta pelas células dos testículos, tornando a principal causa de subfertilidade e infertilidade de touros devido a degeneração testicular (Gabaldi et al., 2002), pois o fluxo sanguíneo é limitado incapacitando de suprir a demanda reduzindo a qualidade seminal (Setchell et al., 1998).

A ultrassonografia Doppler é o princípio físico no qual verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas, este efeito é usado durante o exame dos vasos sanguíneos pois as hemácias em movimento dentro dos vasos ao encontrarem uma onda sonora comportam-se como corpo refletoras, registrando o movimento do sangue no sistema cardiovascular (Feigenbaum, 1986; Vermillon, 1997). Tornando de suma importância a utilização dessa técnica para obtenção de dados fidedignos de velocidade de fluxo sanguíneo (Carvalho et al., 2008).

A avaliação ultrassonográfica em bovinos é uma valiosa ferramenta e de grande importância em casos de desordens subclínicas para um diagnóstico preciso, sobretudo em casos de subfertilidade, auxiliando o exame clínico junto com a análise de motilidade e turbilhonamento do sêmen, tornando-se importante a descrição da ecogenicidade e padrão ultrassonográfico normal do parênquima e mediastino testicular de bovinos (Cardilli et al., 2010). O objetivo geral deste trabalho é estudar a dopplerfluxometria, biometria testicular e características espermáticas em machos bovinos jovens em diferentes faixas etárias.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Buritirana, propriedade localizada na região do Central do Maranhão, a 70km do centro cidade de Tuntum, Maranhão, Brasil. Foram utilizados trinta bovinos machos da raça Nelore (*Bos indicus*) com idade entre 12 e 36 meses. Os animais foram selecionados por faixa etária dois grupos, um de idade menor que 18 meses e outro com idade acima de 2 anos, totalizando 15 animais em cada categoria. Os animais são criados em regime extensivo durante todo período com água e sal mineral *ad libitum*. Para caracterizar o fluxo sanguíneo testicular foi realizado exames ultrassonográficos nos modos Bidimensional e Doppler. Inicialmente o aparelho foi ajustado em modo bidimensional (modo-B; escala de cinza), para localização dos vasos sanguíneos. Em seguida, foi acionado o modo Color Doppler para determinar a perfusão sanguínea, o modo Doppler espectral foi utilizado para monitorar os valores dopplervelocimétricos da artéria

testicular no plexo pampiniforme. A avaliação andrológica foi iniciada com o exame clínico geral: escore de condição corporal, inspeção do prepúcio, escroto, pênis, testículos, epidídimo, simetria, consistência e mobilidade testicular. O perímetro escrotal (PE) foi aferido por métrica flexível na posição mediana do escroto, o sêmen foi coletado pelo método de eletroejaculação, realizado após a devida contenção do animal. Logo após a colheita o sêmen foi avaliado por métodos convencionais de microscopia de luz comum quanto às características físicas (volume, concentração espermática, motilidade espermática progressiva, vigor espermático e turbilhonamento) e morfológicas (anormalidades morfológicas).

Resultados e Discussão

Conforme ilustrado na Tabela 1, os animais da faixa etária abaixo de 18 meses tiveram menor peso corporal ($P=0,001$) e menor perímetro escrotal ($P=0,0003$) quando comparados àqueles > 24 meses. Não houve efeito da faixa etária sobre o escore de condição corporal nem sobre a taxa de resposta à eletroejaculação ($P>0,05$) (Tabela 1). O percentual de animais púberes foi maior na faixa etária > 24 meses ($P=0,005$) (Tabela 1), contudo, dentre os animais púberes, o percentual de espermatozoides normais não diferiu significativamente. Segundo Bastidas-Mendoza et al (1999) Neto et al (2011), Jimenez-Severiano (2002), bovinos das raças Brahman, Simental, Holandesa alcançam a puberdade em média aos 15,9; 13,4 e 11,1 meses respectivamente. Torres-Júnior e Henry (2005), estudando machos da raça Guzará, observaram que o percentual de anormalidades espermáticas decresceu exponencialmente entre a puberdade ($>80\%$ de espermatozoides anormais) e as faixas etárias acima dos 24 meses ($<30\%$). A avaliação ultrassonográfica dos vasos sanguíneos do plexo e do parênquima testiculares não apontou diferenças significativas na dopplerfluxometria nem na dopplervelocimetria (Tabela 2). Este é o primeiro relato científico que aborda comparativamente as variáveis Doppler entre bovinos Nelore de diferentes faixas etárias. Conclui-se que não há relação significativa entre perímetro escrotal, características espermáticas e variáveis Doppler testiculares em bovinos normais no período peripuberal.

Tabela 1. Médias, erros-padrão das médias, valores mínimos e máximos das características físicas e morfológicas de bovinos ($<18, >24$ meses). $*>10 \times 10^6$ espermatozoides no ejaculado.

Variável resposta	Categoria		P
	<18	>24	
Peso (kg)	288,13 \pm 9,63	433,00 \pm 22,92	0,001
Escore Corporal	3,00 \pm 0,05	3,13 \pm 0,07	0,17
Perímetro Escrotal	27,70 \pm 1,04	37,70 \pm 1,02	0,0003
Resposta ejaculatória (%)	0,80 \pm 0,11	0,93 \pm 0,07	0,31
Percentual de animais púberes*	0,13 \pm 0,09	0,73 \pm 0,12	0,005
Espermatozoides normais (%)	88,0 \pm 0,00	82,45 \pm 3,74	0,58

Tabela 2. Médias, erros-padrão das médias, valores mínimos e máximos das características hemodinâmicas testiculares de bovinos ($<18, >24$ meses).

Variável resposta	Categoria		P
	<18	>24	
Pixels total plexo pampiniforme	5667,43 \pm 675,75	7066,33 \pm 558,1	0,12
Escore do plexo pampiniforme	2,95 \pm 0,21	3,16 \pm 0,20	0,74
Pixels total parênquima	215,97 \pm 31,32	242,40 \pm 33,69	0,57
Escore do parênquima	0,15 \pm 0,06	0,18 \pm 0,07	0,82
Pulso sistólico total	30,99 \pm 1,14	29,44 \pm 1,25	0,37
Velocidade diastólica total	17,68 \pm 1,77	17,47 \pm 1,04	0,92
Índice de pulsatilidade total	0,67 \pm 0,10	0,55 \pm 0,04	0,30
Índice de resistência total	0,43 \pm 0,05	0,40 \pm 0,03	0,54

Referências

- Bastidas-Mendoza S.** Pubertad em novillas y toros Brahman. Rev Fac Agron Uni Zulia, v.16, p.690-707, 1999.
- Cardilli DJ, Toniollo GH, Pastore AA, Canola JC, Mercadante MEZ, Oliveira JA.** Padrão ultrassonográfico do parênquima, mediastino e tunicas testiculares em bovinos jovens da raça nelore. Cienc Anim Bras, v.11, p.899-905, 2010.
- Carvalho CF, Chammas MC, Cerri GG.** Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, p.872-879, 2008.
- Feigenbaum H.** Instrumentation. In: _____. Echocardiography. 4.ed. Philadelphia. Lea and Febiger, 1986. cap.1, p.1-49.
- Freneau GE, Chenoweth PJ, Ellis R, Rupp G.** Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. Anim Reprod Sci, v.118, p.176-181, 2010.



Gibaldi SH, Wolf A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do semên em touros. *Ciênc Agr Saúde*. FEA, Andradina, v.2, 2002, p66-70.

Ginther OJ. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography*, Ginther O.J. (ed). Cross Plains: Equiservices Publishing, 258p. 2007.

Jiménez-Severiano H. Sexual development of diary bulls in the Mexican tropics. *Theriogenology*, v.58, p.921-932, 2002.

Miranda Neto T, Castilho EF, Pinho RO, Guimarães SEF, Costa EP, Guimarães JD. Puberdade e maturidade sexual em touros jovens da raça Simental, criados sob regime extensivo em clima tropical. *Rev Bras Zootec*, v.40, p.1917-1924, 2011.

Pechman RD, Eilts BE. B-mode ultrasonography of the bull testicle. *Theriogenology*, v.27, p.431-441, 1987.

Setchell BP. The parkes lecture heat and the testis. *J Reprod Fertil*, 114:179-194, 1998.

Vermillon RP. Basic physical principles. In: SNIDER, A.R. et al. *chocardiography in pediatric heart disease*. 2.ed. Missouri: Mosby, 1997. cap.1, p.1-10.



Avaliação da viabilidade do sêmen bubalino congelado pelos métodos convencional e automatizado (resultados parciais)

Evaluation of viability the buffalo semen frozen by conventional and automated methods (partial results)

Rodrigo dos Santos Albuquerque¹, Rodrigo de Moraes¹, Tomaz Pina Maia², Fábio Trindade Gonçalves^{3*}, Alysson Jorge de Oliveira Sousa⁴, Aluizio Otavio Almeida da Silva⁵, José Silva de Sousa⁵, Adriana Novaes dos Reis⁵

¹Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCAM, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

²REPROGEN – Reprodução e Genética - Castanhal, Pará, Brasil; ³Programa de Residência em Clínica Médica e Reprodução de Ruminantes e Equídeos - Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil; ⁴Instituto Federal do Pará – IFPA, Castanhal, Pará, Brasil; ⁵Central de Biotecnologia de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará – Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: fabio_551v@hotmail.com

Abstract

In the Artificial Insemination it is essential to the use of frozen semen, which causes damage to the structure of sperm. To avoid these cellular damage, there is a need to assess the viability of frozen semen buffalo by conventional and automated methods, and to predict which of the methods retrieve highest number of viable cells post-thawing. The aim of this study was to evaluate the efficiency of these two methods in buffalo semen freezing. Semen was obtained from buffalo breeding and diluted in TES-TRIS. After semen freezing, the samples were evaluated for motility and vigor. There was no difference between the automated and conventional methods, respectively, for motility ($67,5\% \pm 10$ and $69,37 \pm 9,28$), and the vigor ($3,06 \pm 0,57$ and $3,06 \pm 0,68$). Therefore, it is concluded that the freezing methods are effective in cryopreservation the semen buffalo, however, it is suggested that more specific tests are performed to validate the protocols.

Keywords: freezing, semen, buffalo.

Palavras chave: congelação, sêmen, bubalino.

Introdução

Os bubalinos foram introduzidos no Brasil e adaptaram-se com extrema habilidade às condições locais, demonstrando grande importância para o desenvolvimento sócio-econômico da região, principalmente nas áreas de várzeas e de pastagens nativas, onde do ponto de vista econômico, superam qualquer espécie doméstica (Santos, 2012).

Inúmeras biotecnologias têm sido desenvolvidas para o melhoramento animal e para a conservação de material genético de alta qualidade nesta espécie (Baruselli et al., 2013), tais como o uso da Inseminação Artificial (IA), entretanto para a implantação desta técnica é indispensável à utilização de sêmen congelado, o qual passa processos que provocam mudanças deletérias na estrutura e na integridade das membranas espermáticas, comprometendo sua função (Silva e Guerra 2011). Na tentativa de se obter menores danos celulares este experimento avaliou a viabilidade do sêmen bubalino congelado pelos métodos convencional e automatizado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN-UFPa) localizada no município de Castanhal, Estado do Pará. Foram utilizados quatro reprodutores *Bubalus bubalis* adultos das raças Murrah e Mediterrâneo em regime de coleta de sêmen através de vagina artificial.

Após a coleta do sêmen foram realizadas as análises de rotina conforme preconizada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), onde foram avaliados a motilidade, o vigor, a concentração espermática e a morfologia das amostras, sendo pré-requisitos que as mesmas, após a análise, apresentassem motilidade acima de 70%, vigor não inferior a 3 e patologias totais abaixo de 30% para serem consideradas aptas para a congelação.

Os ejaculados considerados viáveis foram diluídos em TES-TRIS (Vale, 2002) e envasados em palhetas de 0,25 ml com 20×10^6 de espermatozoides viáveis. Foram obtidas 16 palhetas/animal/colheita, sendo metade destinada ao congelamento convencional e a outra metade ao automatizado.

Para o congelamento convencional (CC), as doses de sêmen foram submetidas ao equilíbrio por 3 horas a 5°C em posição horizontal, seguido de permanência por 20 minutos no vapor de nitrogênio líquido, para posteriormente as doses de sêmen serem imersas em nitrogênio líquido a -196°C. Para a técnica de congelamento automatizada (TA) foi utilizado um aparelho programável de fabricação nacional (TK-3000[®] Compacta), equipado com uma unidade geradora, ao qual está acoplado um porta-palhetas de aço inox e uma caixa térmica plástica. Como a máquina não possui curva própria para bubalinos, foi selecionada uma curva pré-estabelecida para bovinos, conforme Abud et al. (2014). O resfriamento foi realizado durante 1 hora e 15 minutos até 5°C,

sendo utilizada a curva de 0,25°C/minuto. Após o período de resfriamento as palhetas ficaram por mais duas horas à 5°C para o completo equilíbrio das amostras. Em seguida, as amostras foram transferidas para a uma caixa térmica, contendo nitrogênio líquido, permanecendo até a temperatura de -120°C, com curva de congelamento de -20°C/minuto, quando foram então imersas em nitrogênio líquido a -196°C.

O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos e imediatamente avaliados quanto a motilidade e o vigor espermático, como realizado para o sêmen fresco.

Para análise estatística considerou-se as variáveis de motilidade e vigor pós-descongelção (MPD e VPD) e os tratamentos (automatizado e convencional). Para comparação das médias utilizou-se o teste Tukey (5%). As análises foram realizadas com auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS) versão 9.1.3.

Resultados e Discussão

Nas análises de motilidade e vigor pós-descongelção (MPD e VPD), não foram encontradas diferenças estatísticas entre as médias dos dois grupos ($P > 0,05$) sendo os resultados de motilidade (MPD) 67,50%±10 e 69,37%±9,28, e de vigor (VPD) 3,06±0,57 e 3,06±0,68 para os sistemas automatizados e convencionais, respectivamente (Gráfico 1).

Abud et al. (2014) trabalhando na criopreservação de sêmen bovino pelos dois métodos e, utilizando a máquina TK3000, com duas horas de equilíbrio após a chegada a 5°C, como testado no presente trabalho, também não encontraram diferenças estatísticas entre os dois grupos quando avaliados pelo CASA para motilidade progressiva (MP) 56,50% e 57,00%; velocidade de trajeto (VAP) 34,77 μ /s e 28,17 μ /s; e velocidade progressiva (VSL) 25,75 μ /s e 23,32 μ /s, para os sistemas automatizado e convencional, respectivamente, corroborando com nossos resultados. Gonzalez (2004), congelando sêmen bovino pelos dois métodos e diferentes crioprotetores, também não encontrou diferenças estatísticas entre o método automatizado (36,6%) e convencional (30,5%), apesar dos dados serem bastante inferiores aos encontrados no presente experimento. Resultados inferiores de motilidade (39,5%) e vigor (2,4) também foram encontrados por Castro (2010) utilizando o sistema automatizado na congelação de sêmen bubalino com a máquina TK3000 e utilizando o TES-TRIS como diluidor.

Os dados de motilidade do presente experimento, tanto no sistema convencional, quanto no automatizado, corroboram com os resultados de Miyasaki et al. (2014) e Hashemi (2007) congelando sêmen bubalino pelo método convencional (70% e 71,56%, respectivamente).

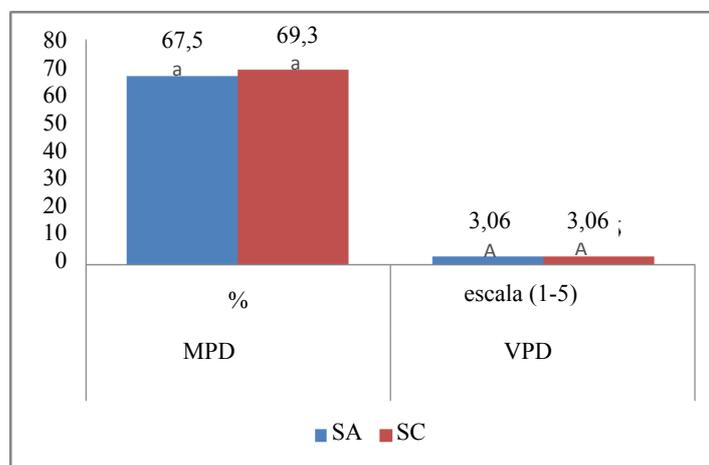


Gráfico 1. Resultados de motilidade (MPD) e vigor (VPD) do sêmen bubalino pós-descongelção pelos sistemas automatizado (SA) e convencional (SC). Valores com diferentes letras sobrescritas nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$)

Conclusão

Conclui-se que os dois métodos de congelação utilizados em relação a avaliação inicial da viabilidade do sêmen criopreservado em TES-TRIS após a descongelção. Diante dos resultados encontrados no presente experimento, sugere-se que testes mais específicos sejam realizados objetivando a validação dos protocolos utilizados para a criopreservação do sêmen bubalino.

Referências

Abud COG, Abud LJ, Oliveira Neto JCO, Dode MAN, Sereno JRB, Martins CF. Comparação entre os sistemas automatizados e convencional de criopreservação de sêmen bovino. *Ciencia Animal Brasileira*, v.15, p.32-37, 2014.



Baruselli PS, Soares JG, Gimenes LU, Monteiro BM, Olazarri MJ, Carvalho NAT. Control of buffalo follicular dynamics for artificial insemination, superovulation and in vitro embryo production. *Buffalo Bulletin*, v.32, p.160-176, 2013.

Castro SRS. Uso de antioxidantes para elevação da qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*). 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará (UFPA), Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Belém, 2010.

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

Gonzalez RAF. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozóide bovino. 2004. 94f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

Hashemi A, Farhoomand P, Pirmohammadi R, Razzaghzadeh S, Nayeopor M. Effect of extender on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buffalo sperm. *Journal Animal Veterinary*, v.6, p.1340-1342, 2007.

Miyasaki MYA, Vale WG, Baía FA, Minervino AH, Ribeiro HFL. Comparação entre o Tris, Lactose/Tris, Ringer-Lactato e Leite Desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino. *Rev Bras Med Vet*, v.36, p.1-10, 2014.

Vale WG. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: *Buffalo Symposium of Americas*, 1., 2002, Belém. *Anais...* Belém: PRODEPA - Governo do Estado do Pará, 2002. p.156-171.

Silva SV e Guerra, MMP. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.370-384, 2011.

Santos KLL. Caracterização do sistema produtivo de búfalos no Estado de Pernambuco. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará Recife, 2012.



Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), durante estação reprodutiva favorável em fêmeas bubalinas na baixada maranhense

Synchronization of ovulation for artificial insemination at fixed time (IATF), during a favorable reproductive season in buffaloes females in the Maranhão state

Danilo Cutrim Bezerra^{1*}, Cícero Soares dos Santos², Aline Saldanha Albuquerque³, Nancyleni Pinto Chaves Bezerra⁴, José Ribamar de Sousa Torres Júnior⁵

¹Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão;

²Doutorando em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí; ³Curso de Zootecnia, Universidade Universidade Estadual do Maranhão, ⁴Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão, ⁵Curso de Zootecnia e Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Maranhão

*E-mail: dcbvet@bol.com.br

Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficacy of ovulation synchronization protocols for artificial insemination at fixed time (IATF) during a favorable reproductive season in buffalo females in Baixada maranhense. The experiment was carried out in July with 100 buffaloes of the Murrah breed. Two protocols for ovulation synchronization were applied: "GnRH / hCG" and "GnRH / BE". Ultrasonographic evaluations were performed to monitor follicular dynamics and ovulation rate and the IATF to evaluate the conception rate. All the females responded to the treatments and there was similar follicular growth from the emergency to the follicular deviation. There was an effect of the ovulation inducer on the diameter of the dominant and ovulatory follicle ($P < 0.05$). The ovulation rate was higher in animals subjected to ovulation induction with hCG. The average design rate was 29%. It was concluded that hCG was more efficient in the induction of synchronized ovulation than BE.

Keywords: buffaloes, ovulatory capacity, reproduction.

Palavras-chave: búfalas, capacidade ovulatória, reprodução.

Introdução

A bubalinocultura do Estado do Maranhão é uma atividade agropecuária em expansão. O rebanho bubalino nesse Estado é composto por 86.648 animais, distribuído em 146 Municípios dos 218 que compõem o Estado e, está concentrado, principalmente, na Baixada maranhense ($n=56.321$; 65% do total). Os 35% restantes ($n= 30.327$) estão distribuídos de forma bastante pulverizada em pequenos criatórios localizados em 125 Municípios maranhenses (Santos et al., 2016). Contudo, apesar dos avanços tecnológicos disponíveis, ainda se observa baixo desempenho reprodutivo desses animais no Estado, principalmente devido a fatores como estresse calórico, déficit nutricional e manejo inadequado. Considerando a importância socioeconômica da bubalinocultura para o Maranhão, há a necessidade premente de desenvolver pesquisas sobre esta temática, com foco no incremento de índices produtivos. Neste contexto, o estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia de dois protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), durante estação reprodutiva favorável em fêmeas bubalinas na Baixada maranhense.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na região da Baixada Maranhense, Maranhão - Brasil. Foram utilizadas 100 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, lactantes, criadas extensivamente em pastagem nativa, com água e sal mineral *ad libitum*. Com base na distribuição histórica retrospectiva dos nascimentos de bubalinos na região, caracterizou-se a estação reprodutiva favorável no mês de julho (Saldanha, 2014). Foram aplicados dois tratamentos/protocolos para sincronização de ovulações: "GnRH/hCG" (protocolo controle para estação favorável); "GnRH/BE" (protocolo proposto para estação favorável). As fêmeas foram submetidas a avaliações ultrassonográficas para acompanhamento da dinâmica folicular e taxa de ovulação e inseminadas artificialmente em tempo fixo para avaliação da taxa de concepção por tratamento. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* Statistical Analysis System for Windows SAS[®] (versão 9.3. SAS Inst. Inc., Cary, NY). A taxa de concepção foi analisada por regressão logística com modelo ajustado para distribuição binomial (PROC GLIMMIX). A dispersão das ovulações foi analisada comparando-se a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett (PROC SUMMARY NWAY do SAS)

Resultados e Discussão

Não houve efeito do protocolo na sincronização da emergência e crescimento folicular inicial. Todas as fêmeas responderam aos protocolos e houve crescimento folicular similar desde a emergência até o desvio folicular.

Os diâmetros dos folículos dominantes no dia 8 (D8) dos protocolos foram similares entre tratamentos e próximos aos identificados por Gimenes et al. (2007) em fase de desvio folicular que foram de $7,2 \pm 0,3$ mm.



Os folículos dominantes apresentaram, em média, diâmetro máximo acima de 9 mm em ambos os tratamentos. Rastegarnia et al. (2004), em um experimento com sincronização da ovulação comparando diferentes doses de gonadorelina em búfalas durante a estação reprodutiva favorável (março a julho), obtiveram diâmetro médio dos folículos dominantes de 12,7 mm, valor aproximado do diâmetro ovulatório observado no presente estudo.

A taxa geral de ovulação variou entre os protocolos, sendo maior nos animais submetidos a indução de ovulação com hCG (70%) quando comparados àqueles tratados com BE (40%). Diversos estudos registram resultados positivos quanto à utilização do protocolo *Ovsynch* com uso de GnRH ou hCG em fêmeas bubalinas na estação reprodutiva favorável, com taxas de ovulação semelhantes ao encontrado no presente estudo (Stella et al., 2005; Weiss et al., 2012).

O protocolo *Heatsynch* (GnRH/BE) representa uma alternativa ao protocolo *Ovsynch*, além de apresentar alta eficiência (Mohan et al., 2009; Mirmahmoudi et al., 2014). Entretanto, a utilização desse protocolo resultou em menor taxa de ovulação (40%) em fêmeas bubalinas no presente estudo.

Houve efeito de protocolo e de indutor no momento da ovulação. O protocolo no qual se utilizou o hCG, este induziu a ovulação em média 21,4 horas mais cedo que o BE. Estes resultados se justificam devido ao hCG atuar se ligando rápida e diretamente a receptores nas células foliculares, sem a necessidade de resposta endógena hipofisária.

Os momentos das ovulações em relação à aplicação da PGF nos diferentes protocolos foram próximos aos encontrados na literatura, sendo de 72,5 a 74 horas no GnRH/BE (*Heatsynch* et al., 2014) e de 71,3 a 81,9 horas no protocolo *Ovsynch* tradicional (Baruselli et al., 2003).

A taxa de concepção não diferiu entre protocolos, com taxa de concepção média de 29% (29/100).

A taxa de concepção obtida na estação favorável encontra-se no quartil inferior em relação aos resultados obtidos em outras pesquisas, as quais reportaram taxas de prenhez que variam de 30 a 75%, usando o protocolo *Ovsynch*, com ou sem o uso de esteróides (Ribeiro et al., 2005; Stella et al., 2005; Ribeiro et al., 2006).

As condições climáticas, nutricionais e sanitárias sob as quais se encontram os bubalinos na região da baixada maranhense, e seus eventuais efeitos, ainda não são totalmente conhecidos e podem, eventualmente, estar envolvidos nos resultados obtidos.

Conclusão

Diante das condições experimentais aqui apresentadas, conclui-se que: (i) os animais submetidos à sincronização e IATF na estação favorável apresentaram taxas de ovulação de concepção moderadas; (ii) o hCG foi mais eficiente na indução de ovulação sincronizada do que o benzoato de estradiol.

Referências

- Baruselli PS, Carvalho NAT.** Artificial insemination in developing countries. In: Congresso Nazionali Sull'Allevamento del Bufalo, 2, 2003b, Monterotondo. Proceedings...2003b, p.177-192.
- Gimenes LU, Beltran MP, Ferreira RM, Kastelic JP.** Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J Reprod Fertil*, v.87, p.223-230, 2007.
- Heatsynch PF, Mirmahoudi R, Souri, EG.** Temporal Changes in Endogenous Estrogens and Expression of Behaviors Associated with Estrus during the Perioovulatory Period in Doublesynch Treated Murrah Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Iranian Journal of Applied Animal Science*, v.4, p.499-504, 2014.
- Mirmahmoudi R, Prakash BS.** Temporal Changes in Endogenous Estrogens and Expression of Behaviors Associated with Estrus during the Perioovulatory Period in Doublesynch Treated Murrah Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Iranian Journal of Applied Animal Science*, v.4, n.3, p.499-504, 2014.
- Mohan K, Sarkar M, Prakash BS.** Efficiency of Heatsynch Protocol in Estrous Synchronization, Ovulation and Conception of Dairy Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Asian-Australian Journal Animal Science*, v.22, p.774-780, 2009.
- Rastegarnia A, Niasari-Naslaji A, Hovareshti P, Sarhaddi F, Safaei M.** The effect of different doses of Gonadorelin on ovarian follicle dynamics in river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, n.62, p.1283-1291, 2004.
- Ribeiro HFL, Picanço NS, Rolim Filho ST, Pinho RO, Araújo CV, Vale WV.** Eficiência da Inseminação Artificial em Tempo fixo com progesterona intravaginal na taxa de prenhez em búfalas criadas em diferentes sistema de produção na Amazônia. In: XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2005, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro, 2005. p.211.
- Ribeiro HFL, Sousa JS, Silva AOA, Vale WG.** Inseminação artificial em bubalinos. In: IX Cong Bras Rep Animal, 1991, Anais... Belo Horizonte, MG, Cong Bras Rep Anim (CBRA), 2006.
- Saldanha AA.** Estudo da dinâmica reprodutiva anual do ciclo estral em fêmeas bubalinas (*Buballus bubalis*), 2014. 89p. Dissertação (Mestrado), São Luis, Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2014.
- Santos CLR, Santos Júnior JB, Cunha MC, Nunes SRF, Bezerra DC, Torres Júnior JRS, Chaves NP.** Nível tecnológico e organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão.



Arquivos do Instituto Biológico, v.83, 1-8, e0022014, 2016.

Stela ED, Oba E, Mota AV, Lima Neto JF, Gioso MM. Taxa de ovulação em búfalas submetidas a Protocolo de Inseminação Artificial Fixo. In: XIX Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2005 Angra dos Reis- RJ. Proceedings... Rio de Janeiro, 2005.

Weiss RR, Rasta WPD, Frares LF, Kozick LE, Muradás PR, Abreu RA. Avaliação do emprego do protocolo ovsynch modificado na taxa de prenhez e mortalidade fetal em *Bubalus bubalis*. *Vet e Zootec*, v.19, p.531-538, 2012.



Imunolocalização de angiotensina-(1-7), angiotensina II e Enzima Conversora de Angiotensina tipo II em ovário de cabra

Immunolocalization of angiotensin-(1-7), angiotensin II and Angiotensin Converting Enzyme II in goat ovary

Lauro César Soares Feitosa^{1*}, Siluana Benvindo Ferreira², Kinulpe Honorato-Sampaio³, Antônio de Sousa Junior⁴, Gregório Elias Nunes Viana⁵, Amilton Paulo Raposo Costa⁵

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UFPI; ²Agência de Defesa Agropecuária do Piauí (ADAPI); ³Faculdade de Medicina de Diamantina (FAMED); ⁴Colégio Técnico de Teresina (CTT); ⁵Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

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

Abstract

There is increasing evidence the participation of ovarian renin-angiotensin system in important reproductive processes. This study aimed to investigate the presence and location of Ang II, Ang-(1-7) and ACE2 in goat ovaries. Ten ovaries from goats killed in slaughterhouse were collected, washed in buffered PBS, perfused with protease inhibitor solution and processed for histology standard protocol. The search of peptides was performed using the avidin-biotin-peroxidase method. A strong immunoreactivity for Ang II in theca cells of antral follicles and corpora lutea was observed. Antral follicles (theca cells), corpora lutea and oocyte cytoplasm in early antral follicles exhibited strong immunoreactivity for Ang-(1-7). There was strong immunoreactivity for ACE2 in the cytoplasm of luteal cells and theca cells of antral follicles. For the first time, the presence and location of Ang II, Ang-(1-7) and ACE2 are reported in goat ovary, can regulate follicular development, oocyte maturation and corpus luteum development.

Keywords: goat, immunohistochemistry, renin-angiotensin system.

Palavras-chave: cabra, imunohistoquímica, sistema renina-angiotensina.

Introdução

Desde a descoberta da renina até a descoberta de novos componentes, o sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido implicado em várias funções além das clássicas como controle eletrolítico e pressão arterial. Componentes do SRA tem sido descritos em vários órgãos como fígado (Grace et al., 2012), coração (Alderman, 2004), cérebro (McKinley et al., 2003) e sistema reprodutivo (Herr et al., 2013) das mais variadas espécies (Schäuser et al., 2001; Costa et al., 2003; Li et al., 2004; Viana et al., 2011). Várias pesquisas tem demonstrado um SRA ovariano ativo e influenciando as funções reprodutivas como maturação oocitária (Honorato-Sampaio, 2012) ovulação (Ferreira et al., 2007; Viana et al., 2011) e desenvolvimento do corpo lúteo (Kobayshi et al., 2002).

Há certa controvérsia na atuação da Angiotensina II (Ang II). Enquanto alguns relatos demonstram sua influência positiva em alguns processos reprodutivos como maturação oocitária e ovulação (Giometti et al., 2005; Portela et al., 2011), alguns autores afirma que ela pode estar diretamente ligada ao processo de atresia folicular (Kotani et al. 1999; Obermüller et al., 2004). Em contrapartida, a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] tem sido descrita no ovário de várias espécies, como coelha (Viana et al., 2011) ratas (Honorato-Sampaio et al., 2012) em suas mais variadas estruturas. De acordo com as localizações relatadas, é possível que a Ang-(1-7) possa regular processos importantes como ovulação (Santos et al., 2011) e foliculogênese.

Apesar de todos os avanços e pesquisas que relacionam o sistema renina angiotensina ovariano e as funções reprodutivas, ainda são escassos os relatos em caprinos. Sendo assim o objetivo deste trabalho é relatar a presença e localização de três de seus componentes mais frequentemente relatados com envolvimento na função reprodutiva, no ovário de cabras.

Material e Métodos

Para determinar a presença e localização de Ang II, Ang-(1-7) e ECA 2 no ovário de cabras, amostras de tecido foram coletados de animais saudáveis abatidos em abatedouro local. A artéria ovariana foi canulada com cateter nº 24, e o ovário inicialmente lavado com solução PBS tamponada, e posteriormente com formaldeído 4% tamponado e depois embebidos em parafina.

Foram realizados cortes de 5µ e depois montado em lâminas gelatinizadas, sendo corados com o método da Avidina-Biotina-Peroxidase, com Kit comercial da Vectastain Elite ABC (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) conforme Honorato-Sampaio et al., (2012). Em seguida, os corte foram desparafinados, reidratados e tratados com peróxido de hidrogênio em metanol por 30 minutos, seguidos por bloqueio com soro normal equino por 30 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpos primários [policlonal de coelho anti-Ang-(1-7) (1:1000), policlonal de coelho anti-Ang II (1:500) e policlonal Anti-ECA2 (1:500) (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)] a temperatura ambiente em câmara úmida por 2 horas (Simões et al., 2004). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo biotilado universal (1:50) com soro normal equino (1:50) por 30 minutos, seguido pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (1:50) por 30 minutos. A imunocoloração foi

realizada com t de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e a contra-coloração com hematoxilina. Os controles negativos foram obtidos pela pré-adsorção do anticorpo primário ou pela substituição por soro não imune.

Resultados e Discussão

Este trabalho relatou pela primeira vez a presença e localização de Ang-(1-7), Ang II e ECA2 no ovário de cabra (Figura 01). Foi observada forte imunoreatividade para Ang II, Ang-(1-7) e ECA2 em diversos compartimentos do ovário de todas as 10 cabras. Para Ang II, foi observada forte imunoreatividade no citoplasma das células luteínicas e moderada no Além disso, observou-se forte imunoreatividade para Ang II nas células da teca de folículos antrais, e em algumas células da granulosa, assim como em vasos sanguíneos. A presença de forte marcação para Ang II nas células da teca e nas células luteínicas estão em conformidade com as possíveis funções realizadas por este peptídeo, visto que Schauser et al., (2001), demonstraram a presença de receptor AT_2 nas células da teca do folículo antral dominante de vacas. Porém em oposição aos achados deste trabalho, não encontraram receptores para Ang II no tecido luteal talvez pela diferença de técnica utilizada na pesquisa dos peptídeos.

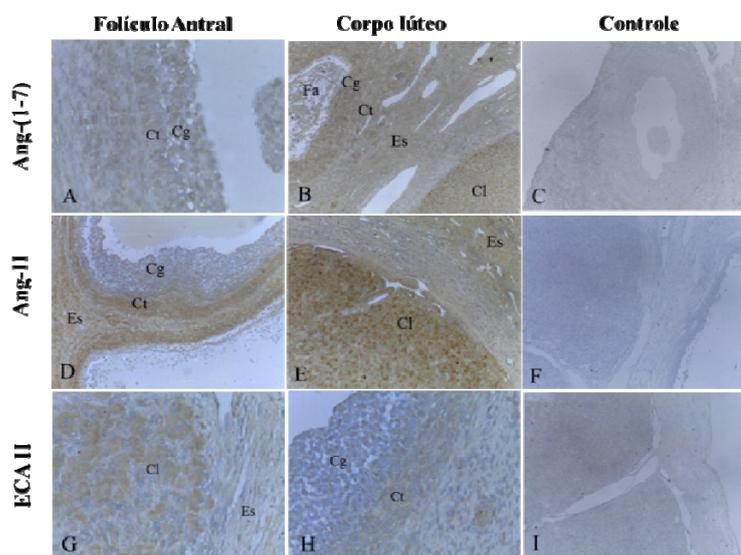


Figura 1. Imunolocalização de Ang-(1-7), Ang II e ECA II em folículos antrais e corpo lúteo em ovário de cabra. Cg: células da granulosa; Ct: células da teca; Es: estroma; Cl: corpo lúteo; Fa: folículo antral.

Para Ang-(1-7), foi observado forte imunoreatividade em células da teca de folículos antrais, corpo lúteo e vasos sanguíneos e, leve imunoreatividade no estroma e células da granulosa. Adicionalmente, foi observada forte imunoreatividade no citoplasma do oócito em folículos antrais iniciais. Não obstante, a forte imunoreatividade para Ang-(1-7) no estroma e células luteais e a fraca marcação nas células da granulosa de folículos antrais, está de acordo com os achados de Reis et al., (2011), os quais relataram a presença de imunoreatividade para estes peptídeos em ovários de mulheres.

Ainda, assim como para Ang II, houve forte imunoreatividade para ECA2 no citoplasma de células luteínicas, mas não no núcleo. Além disso, foi observada moderada imunoreatividade no estroma ovariano e células da teca de folículos antrais. Adicionalmente, percebeu-se leve imunoreatividade para ECA2 em algumas células da granulosa. A presença ECA II nos folículos indica que possa ocorrer produção local de Ang-(1-7), e que juntos, estes peptídeos possam mediar a atuação das gonadotropinas. Adicionalmente, a presença de Ang II, Ang-(1-7) e ECA II na teca indicam a participação destes peptídeos na esteroidogênese, na produção de substratos androgênicos que são convertidos pela granulosa, por meio da ação da enzima P450 aromatase, em estrógeno, importante para a estimulação da mitose das células da granulosa e consequente crescimento folicular.

Conclusão

Portanto, a presença e a distribuição dos peptídeos demonstram uma possível ação nos processos de foliculogênese, maturação oocitária e desenvolvimento do corpo lúteo em ovários de cabras.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES/PROCAD NF 157/2010.



Referências

- Alderman MH.** Renin Angiotensin System and the Hearth. *Circulation*, v.110, p.496-497, 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, p.1942-1948, 2003.
- Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Gonçalves PBD.** The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*, v.134, p.713-719, 2007.
- Grace JA, Herath CB, Mak KY, Burrel LM, Angus PW.** Update on new aspects of the rennin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options. *Clin Sci*, v.123, p.225-239, 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. *Exp Physiol*, v.97, p.642-650, 2012.
- Kotani E, Sugimoto M, Kamata H, Fujii N, Saitoh M, Kubo T, Song K, Miyazaki M, Murakami K, Miyazaki H.** Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.276, p.25-33, 1999.
- Li YH, Jiao LH, Liu RH, Chen XL, Wang H, Wang WH.** Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, v.61, p.447-459, 2004.
- Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretzn, Weigel M, Geigerh, Gassler N.** Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. *J Histochem Cytochem*, v.52, p.545-548, 2004.
- Viana GEN, Pereira VM, Honorato-Sampaio K, Oliveira CA, Santos RAS, Reis AM.** Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. *Exp Physiol*, v.96, p.957-965, 2011.



Dispositivo móvel e software para avaliação andrológica em caprinos

Mobile and software for breeding soundness evaluation in goats

Sergio Barros de Sousa^{1*}, Antonio de Sousa Junior², Antonio Augusto Nascimento Machado Junior²,
Maria Acelina Martins de Carvalho²

¹Univesidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina, PI, Brasil; ²Universidade Federal do Piauí (UFPI) Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: sergiobarros@pq.cnpq.br

Abstract

Computer science is an emerging interdisciplinary instrument of aid, especially in the current precision livestock. This study aimed to develop software for use in assessing the reproductive capacity of goats by parameters used in routine andrological tests, in addition to implementing an automatic mobile device to the analysis campo. O automated device contains a controller card using a logical drive processing with a PIC16F628A microcontroller and microelectronic devices TTL family. The software was coded in C language and recorded in the microcontroller chip. The automated device allowed a proper compilation of data stored. The processing time was adequate to sensitive response to user touch. The automated machine allows a reliable estimation of the parameters andrological goats activities in the field, enabling this analysis using a small mobile device. Becoming a fundamental tool for andrologist and breeder.

Keywords: goat, reproduction, software, automation.

Palavras-chave: caprino, reprodução, software, automação.

Introdução

O exame andrológico completo fundamenta-se na avaliação de todos os fatores que contribuem para a função reprodutiva normal do macho, constituindo uma ferramenta de fundamental importância no processo de seleção genética animal (Oliveira, 2008). É conduzido segundo um roteiro com quatro itens básicos e fundamentais para emissão do certificado de exame andrológico: a identificação do animal e do seu proprietário, o exame clínico, o espermiograma propriamente dito e a conclusão dos achados (Barbosa, 2005). Ao final do exame andrológico, de posse dos resultados do exame clínico geral, do comportamento sexual (avaliação da libido) e da análise seminal quanto às características físicas e morfológicas, o profissional poderá classificar o macho como apto, inapto ou questionável (Oliveira, 2008).

O desenvolvimento tecnológico das ferramentas aplicadas às pesquisas científicas tem obtido uma expressiva evolução à luz da automação e sistematização de processos metodológicos. Na agricultura de precisão a informática tornou-se indispensável. Ademais, novas formas de uso da computação têm sido propostas para apoio às atividades rurais (Kirschner, 2012).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um software para utilização na avaliação da capacidade reprodutiva de caprinos, mediante parâmetros usados na rotina de exames andrológicos, além de implementar um subsistema para circuito eletrônico de um dispositivo móvel automático que possa ser empregado nessas análises a campo, para obtenção de dados referentes à mensuração da aptidão reprodutiva desses animais.

Material e Métodos

Para o desenvolvimento do dispositivo de avaliação da capacidade reprodutiva de caprinos, inicialmente foi normatizado um modelo de aptidão reprodutiva, baseado preliminarmente nos parâmetros estabelecidos pelo exame andrológico sugerido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os dados são processados pelo software estabelecendo-se uma relação entre o criador e o seu rebanho, permitindo a avaliação do reprodutor em diversas coletas para compará-las entre si e com reprodutores de outras propriedades, formando um banco de dados.

Os reprodutores foram avaliados através de um índice intitulado “Indicador de Aptidão Reprodutiva” (IAR) o qual foi calculado mediante equação $IAR = (IAC) + (IAS)$, que tem como parâmetro os resultados dos indicadores de avaliação clínica $IAC = pCONS + pMOBI + pVOLUME + pCLASSE + pBIP$ o qual, na equação, têm o parâmetro pCONS como o peso relacionado a avaliação da consistência, pMOBI correspondente a mobilidade, pVOLUME ao volume, pCLASSE a classe e pBIP à bipartição testiculares do caprino avaliado, e o indicador de avaliação seminal $IAS = (vASP) + (vVOL) + (vTUR) + (vMOT/100) + (PesoDefeitos)$ onde, o parâmetro vASP é o indicador relacionado ao aspecto do ejaculado, vVOL ao volume coletado, vTURB para o indicador de turbilhamento e vMOT ao indicador de motilidade, sendo o peso dos defeitos calculados com a fórmula $PesoDefeitos = (100 - defeitos)/25$, a partir dos dados gerados com a realização dos exames e lançados no sistema

O processamento dos dados foi realizado a partir de um software lógico para controle do dispositivo, consistindo de um subsistema de computação, a fim de captar os dados dos usuários do dispositivo e de lógica de

programação para estabelecer uma relação entre os tipos de dados capturados e os cálculos matemáticos sobre a avaliação da capacidade reprodutiva de caprinos.

O software para circuito microcontrolador codificado foi inicialmente programado em linguagem C no formato estruturado, diferindo do software para dispositivo móvel por ter sido compilado para linguagem de máquina "ASSEMBLER" contendo uma função para cada equação implementada respeitando as entradas e os retornos das funções além do fluxo de execução do programa.

O desenvolvimento da versão definitiva do software autônomo para microcontrolador foi implementada em linguagem C e compilada para instruções de máquina através do compilador CCS que se demonstrou adequado ao desenvolvimento do arquivo hexadecimal gravado na memória ROM do microcontrolador pelo tamanho reduzido do arquivo final que pôde ser armazenado no limitado espaço de 16 KB de dados disponível na memória de programa do microcontrolador PIC 16F628a da Microchip.

Para o funcionamento do software foi desenvolvido um dispositivo que consiste em um aparato eletrônico com um componente de entrada de dados numérico relacionados aos indicadores utilizados nos cálculos e avaliações da capacidade reprodutiva de caprinos que constitui em um teclado numérico com um componente de apresentação de dados e de uma placa controladora eletrônica com software embarcado em microcontrolador, para realização dos cálculos numéricos, estatísticos e qualificação das informações dos animais avaliados. O dispositivo foi acondicionado em um invólucro de plástico de tamanho reduzido que permite seu manuseio no local onde se encontra o rebanho ou sua utilização com os animais em movimento.

Foi implementado ao invólucro de plástico, um sistema de alimentação por baterias de pequeno porte e baixa tensão e carga com tamanho reduzido permitindo assim que o sistema de alimentação do circuito esteja presente dentro do dispositivo evitando desta forma que o mesmo necessite estar conectado a uma fonte de alimentação externa vinculada e rede de distribuição cabeada de energia.

Os dispositivos incluídos no protótipo são da família TTL e funcionam na faixa lógica de tensão entre 0V e 1V para nível lógico "falso" e a faixa de 2V a 6V para nível lógico "verdadeiro". Para alimentação do circuito foi utilizado um soquete com 04 pilhas de 1,5V totalizando 6V de alimentação do circuito. O circuito do teclado foi desenvolvido utilizando uma placa comutada, atribuindo-se a cada tecla um código correspondente ao parâmetro do software.

Resultados e Discussão

Verificou-se para o desenvolvimento do dispositivo automatizado, a partir da placa controladora e das interfaces de entrada e saída, que era necessária à implementação do software a partir do fluxograma proposto para o fluxo de execução dos procedimentos automatizados que seriam realizados para obtenção do indicador de aptidão reprodutiva do caprino, pois o modelo do circuito envolvido no processo deveria estar adequado aos procedimentos a serem realizados, de acordo com Lopes *et al* (2005), que preconiza que a padronização do processo é um importante instrumento de auxílio no planejamento, implementação, direção e controle de atividades na caprinocultura. O desenvolvimento do software inicial serviu como base para a avaliação dos requisitos do hardware para o dispositivo. A partir do que foi observado, o modelo do software deveria funcionar em um dispositivo adequado antes do desenvolvimento do próprio hardware com as funcionalidades especificadas. Assim, foi desenvolvido um protótipo codificado do software em linguagem portátil e dimensionável a dispositivos de hardware disponíveis como celulares e tablets. Destaca-se nessa etapa que o software para o dispositivo automatizado, foi implementado para funcionamento de forma autônoma, sem a necessidade de um SO (sistema operacional) como interpretador das instruções. A primeira versão, desenvolvida em Java para a plataforma do SO Android e a definitiva em linguagem de máquina para a plataforma autônoma. A primeira versão por ser adequada para um SO foi utilizada exclusivamente para análise dos requisitos do software, e a versão definitiva a ser gravada em ROM (memória somente de leitura).

O dispositivo automatizado permitiu uma compilação adequada dos dados armazenados apesar do pequeno tamanho do banco de armazenamento interno. O desempenho do software no dispositivo autônomo foi satisfatório, pois o arquivo hexadecimal resultado do processo de compilação do código fonte, não ultrapassou 1KB (kilobyte) de tamanho, o que foi um diferencial na versão definitiva. Observou-se que o tamanho do arquivo de instruções definitivo seria um fator preponderante, pois o arquivo apk (aplicativo) do software modelo ocupava 207KB o que seria limitador para um dispositivo com memória ROM que foi o microcontrolador que possuía somente 16KB divididos entre 12KB para memória de dados e 4kb de memória de instruções. Palmieri *et al* (2014) relataram a capacidade de memória como fator limitante, sendo discutido o padrão de uso de memória de 16 KB como forma mais adequada de armazenamento em dispositivos voltados para coleta de dados. Assim, o software desenvolvido em linguagem de máquina, por ocupar somente 1KB de memória permite a liberação de um espaço de 15KB na memória interna do microcontrolador PIC16F628a utilizado.

O dispositivo apresentou um bom desempenho quanto ao tempo de processamento e capacidade de armazenamento. Ademais, a sua usabilidade atendeu aos requisitos de portabilidade através da possibilidade de uso do dispositivo em pesquisas de campo. O tempo de processamento foi adequado com respostas sensíveis ao



toque do usuário. Testes realizados demonstraram uma variação pouco expressiva entre um clock de processamento de 4MHz e 20MHz, sendo o de menor ciclo escolhido por demandar menor consumo de energia, comprovado por Katzen (2005) usando clocks de 4 Mhz em testes de desempenho com o microcontrolador PIC 16f628a.

Conclusão

O dispositivo computacional desenvolvido permite a modularização de inúmeras aplicações práticas a serem realizadas em pesquisas e atividades de extensão rural, ampliando as possibilidades de uso e facilitando o trabalho de profissionais da andrologia e melhoramento genético animal.

Referências

- Barbosa RT, Machado R, Bergamaschi MACM.** A importância do exame andrológico em bovinos. Circular Técnica 41. São Carlos: Embrapa, 2005. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37260/1/Circular41.pdf>>. Acesso em: jan. 2014.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Freitas AV, José Neto J.** Linguagens de programação aderentes ao paradigma adaptativo. Revista IEEE América Latina, v.5, p. 522-526, 2007.
- Kirschner SF.** Um sistema de auxílio à coleta de dados na área de agricultura de precisão baseado em aplicações móveis. 2012. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, 2012.
- Katzen S.** The Quintessencial PIC microcontroller. 2ª ed. Springer, 2005, 546p.
- Machado Júnior AAN, Assis Neto AC, Ambrósio CE, leiser R, Lima GS, Oliveira LS, Carvalho MAM.** Goat scrotal-testicular biometry: influence of the season on scrotal bipartition. *Pesqui Vet Bras*, v.31, p.1116-1119, 2011.
- Lopes MA, Campello Rde P, Carvalho FM, Fernandes DC.** Custo Caprino Corte 1.0: software de controle de custos para a caprinocultura de corte. *Ciênc. agrotec*, v.29, pp.1061-1068, 2005.
- Oliveira MEF.** A importância do exame andrológico e avaliação da libido. Artigo Técnico. 2008. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/a-importancia-do-exame-andrologico-e-avaliacao-da-libido-53126/>>. Acesso em: dez. 2014.
- Palmieri AM, Silveira LR, Miranda JH, Miranda KOS.** Sistema automatizado para coleta de dados de umidade relativa e temperatura do ar. *Eng Agríc, Jaboticabal*, v.34, p.636-648. 2014



Redução de gestação gemelar em égua Quarto de Milha

Twin pregnancy reduction in mare Quarter Horse

Valdeci Rodrigues de Sousa Junior^{1*}, Siluana Benvindo Ferreira², Lauro César Soares Feitosa², Gerlan Vieira de Sousa², George Miranda de Sousa Barros³, José Adalmir Torres de Souza²

¹Instituto Brasileiro de Veterinária (IBVET); ²Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI; ³Universidade Estadual do Piauí, Corrente, UESPI.

*E-mail: valdeciju@hotmail.com

Abstract

Twin pregnancies are a serious problem due to the economic losses generated by high abortion rates, embryonic developmental failure with stillbirths and perinatal mortality, as well as a decrease in mare fertility, being considered an unusual event in veterinary medicine and presenting itself as Challenge to the veterinary professional. In view of the above, this work reported the treatment adopted after the diagnosis of twin pregnancy in a mare, through the reduction of one of the embryonic vesicles through the ultrasound guided manual crushing technique. It is concluded that the crushing of one of the vesicles is an effective procedure in reducing twin pregnancy, especially when performed until the 15th day of gestation.

Keywords: equine, reproduction, pregnancy.

Palavras-chave: equídeos, reprodução, prenhez.

Introdução

A presença da gestação gemelar em éguas pode provocar elevadas perdas econômicas aos criadores de cavalos, em virtude do diagnóstico e tratamento. É um acontecimento incomum na medicina veterinária e apresenta-se como desafio ao profissional veterinário, sendo considerada uma das mais importantes causas de perda embrionária na égua, geradas pelos elevados índices de abortos, falhas no desenvolvimento embrionário com natimortos e mortalidade perinatal, assim como, queda de fertilidade da égua (Lima et al., 2013).

As elevadas taxas de gestação gemelar incidem em raças com maior incidência de ovulações múltiplas, como observado em éguas PSI (19%) quando em comparação as éguas da raça Quarto de Milha (9%) e Appaloosa (8%). Além disso, éguas primíparas apresentam maiores chances de aparecimento de ovulação múltipla em comparação com éguas em lactação (Pereira et al, 2014). O período de gestação em éguas é de aproximadamente 11 meses e geralmente ocorre o nascimento de apenas um concepto. Esse período pode ser reduzido devido à presença de mais de um feto durante a mesma gestação e influenciado também pelo tamanho dos conceptos e das respectivas placentas (Macpherson e Reimer, 2000).

O exame de ultrassonografia transretal é de fundamental importância para um correto diagnóstico de gestação gemelar através da identificação de possíveis vesículas embrionárias, aliados ao uso de técnicas que interrompem a esse tipo de gestação contribuem com a redução de abortos e complicações. (Hafez e Hafez, 2004). Dentre os procedimentos adotados, destaca-se a o esmagamento manual de uma das vesículas embrionárias guiada pelo controle ultrassonográfico com a ruptura transretal da vesícula, possibilita o nascimento de um potro com sucesso. Taxas de aproximadamente 90% de redução de um dos conceptos foram relatadas quando os esmagamentos são realizados entre o 15° e o 21° dia de gestação (Fiala et al., 2003).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi relatar o tratamento adotado após o diagnóstico de gestação gemelar em uma égua, através da redução de uma das vesículas embrionárias.

Material e Métodos

Um equino, fêmea, sete anos, da raça Quarto de Milha, pesando aproximadamente 380 kg, primípara, com realização de acompanhamento da ovulação através de palpação retal e ultra-sonografia, após a visualização de um folículo no ovário direito de 37,1 mm e um 36 mm de diâmetro no ovário esquerdo de, foi administrado 01 ml de gonadotrofina coriônica humana - hCG (Vetecor®) e 03 ml Deslorelina (Sincrorelina®) para a indução da ovulação e posteriormente e inseminada.

O diagnóstico de gestação foi feito através de exame ultra-sonográfico no 14° dia após a inseminação quando foram evidenciadas as gestações gemelares (Fig. 1). No 15° dia procedeu-se à eliminação de uma das vesículas embrionárias através da técnica de esmagamento utilizando o dedo polegar e o indicador no local onde ela foi detectada, com o auxílio do ultrassom situou-se o transdutor no local onde as duas vesículas estavam em proximidade, em seguida foi executado um movimento suave para trás e para frente da ponta do transdutor, obtendo-se resultados de pressão nas duas vesículas e separando-as. Em seguida transcorreu a redução manual da vesícula menor antes da fixação (Fig. 2). Associado à técnica de esmagamento foi conduzido o acompanhamento ultra-sonográfico semanal para verificação da eficácia do tratamento.

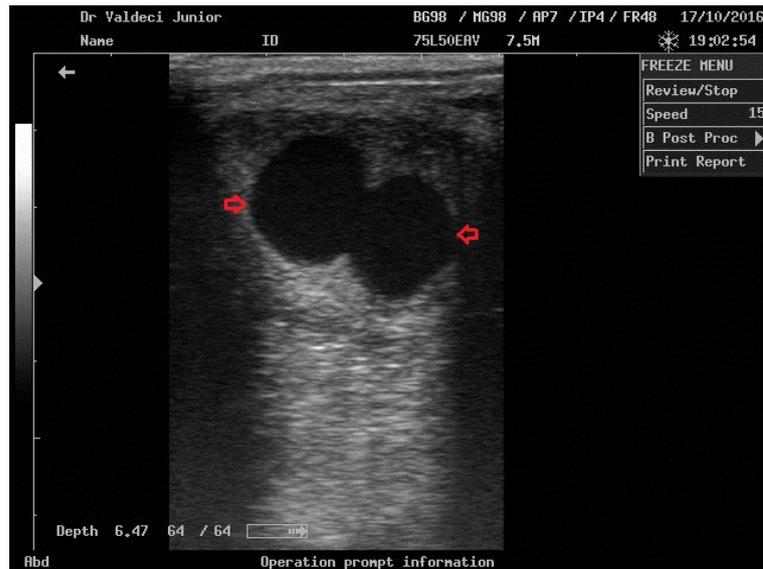


Figura 1. Confirmação da gestação gemelar no 14º dia após a inseminação, evidenciando a presença de duas vesículas embrionárias.



Figura 2. Vestígio da vesícula embrionária na base do útero um dia após a redução manual.

Resultados e Discussão

O processo de redução gemelar através da técnica de esmagamento manual de vesícula foi realizado com êxito concordando com os achados de Fiala et al.(2003), que observaram uma maior eficácia no procedimento de esmagamento quando este foi realizado até o 15º dia de gestação, em virtude da não fixação embrionária.

A perda gestacional precoce ocorre com maior assiduidade, em torno de 48%, entre o 14º e o 28º dia, ou em torno de 20%, ao redor do 42º dia de gestação. Deste modo, a identificação da gestação gemelar precoce ajuda na redução do risco de um resultado desfavorável durante o período gestacional em éguas (Pereira et al., 2014).

Em casos evidenciados com a presença de gestação gemelar a égua poderá ser prejudicada em se preparar para uma nova concepção em virtude da à incapacidade de levar a termo os conceptos ocasionando um retardo na gestação seguinte levando a uma queda de fertilidade da égua, causando perdas econômicas aos criadores (Pascoe, 1983).

Alguns fatores podem contribuir para a maior incidência de ovulação dupla, como fato da égua em questão ser primípara, pois Ginther (1987) relatou que éguas primíparas têm uma maior incidência de ovulação múltipla em comparação com éguas em lactação. Além disso a indução da ovulação com a administração hCG pode ter contribuído para o aparecimento de ovulações múltiplas corroborando com Pereira et al. (2014).



Consideração final

Conclui-se, que o esmagamento de uma das vesículas é um procedimento eficaz na redução da gestação gemelar, principalmente quando realizado até o 15º dia de gestação.

Referências

Fiala SM, Trein CR, Meirelles L, Maschitzky E, Winter G, Garbade P, Gregory RM, Matos RC. Redução da gestação gemelar em éguas puro sangue de corrida antes ou após a fixação uterina da vesícula embrionária. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.145 - 148, 2003.

Ginther OJ. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos and type of embryo fixation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, p.82-88, 1987.

Hafez ESE, Hafez B. Reprodução Animal. Editora Manole. 7ªed. 2004. 513p.

Lima DBC, Boakari YL, Rizzo MDS, Cavalcante TV, Sousa RPB, Neves CA, Arrivabene M. Inviability the development of foals after multiple pregnancy. *PUBVET*, v.7, 2013.

Macpherson ML, Reimer JM. Twin reduction in the mare: current options. *Anim Reprod Sci* v.60, p.233-244, 2000.

Pereira GR, Hodder A, Carneiro GF. Diagnóstico e manejo de gestação gemelar na espécie equina. *Rev Bras Reprod Anim*, v.38, p.202-207, 2014.



Eficiência reprodutiva de éguas submetidas à transferência de embrião no nordeste do Pará

Reproductive efficiency of mares under embryo transfer in Northeast Para

Vanessa do Livramento Aires Paula*, Jonan Souza da Silva, Erika Martins da Silva, Douglas Moacyr Moura de Freitas, Heriberto Ferreira de Figueiredo, Djacy Barbosa Ribeiro

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA, Brasil.

*E-mail: vanessal_avlis@hotmail.com

Abstract

In this paper the influence of the kind of semen and of the female donator in the embryo recuperation and the influence of the receptor female in the pregnancy level. 22 donators, 60 receptors were used and 1 stud for the collection of fresh semen. The donators and the stud were of the American Quarter Horse breed and the receptors were not of any defined breed. The cooled semen was shipped from Sao Paulo and the frozen semen was stored in the stud farm itself. The embryo recuperation level of the donators was of 62,69% (n=42), and there wasn't any statistical difference ($P>0,05$) in the influence of the donator. The level of the pregnancy was of 78,77% (n=33) and there wasn't any influence of the receptor ($P>0,05$). The kind of semen influenced in the embryo recuperation ($P>0,05$), so the fresh semen obtained the best result (90%). So, of all the analysed factors, the only one which influenced on the result of the reproductive efficiency of the donators was the kind of semen.

Key words: equine, embryo, semen.

Palavras-chave: equino, embrião, sêmen.

Introdução

Os equinos são animais de suma importância nas mais diversas modalidades que assumem, realizando várias atividades relacionadas ao trabalho, produção, esporte e diversão.

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas e o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, sendo a transferência de embrião (TE) a ferramenta mais promissora para essa finalidade (Lira et al., 2009).

A TE consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora, geneticamente superior com transferência deste para uma fêmea receptora, encarregada de levar a gestação a termo (McKinnon e Squires, 2007).

O comportamento clássico reprodutivo dos equinos é poliéstrico estacional, com os animais apresentando maior atividade estral essencialmente entre a primavera e o verão (Fitzgerald e McManus, 2000). Nos estados do norte e nordeste, onde ocorrem dias longos com muita luminosidade durante todo o ano, as éguas ciclam normalmente de janeiro a dezembro.

Há diversos fatores que influenciam a TE em equinos como a qualidade da doadora e do sêmen do garanhão, dia da coleta e escolha da receptora (Alonso, 2008). Também influenciam na taxa de gestação da TE a habilidade técnica do operador, sincronia de ovulação entre doadora e receptora, qualidade e idade do embrião no momento da transferência (Caiado et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência reprodutiva de éguas submetidas à transferência de embrião em um Haras no nordeste do Pará, bem como, a influência do tipo de sêmen, da doadora e receptora sobre o índice de recuperação embrionária e taxa de prenhez.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no período de agosto a outubro de 2014 em um haras localizado no município de Castanhal-Pará, na região nordeste do estado, com latitude 1° 18' 54,15"S e longitude 47° 56' 13,94".

Foram utilizados 88 animais, sendo 22 éguas doadoras de embrião, 60 éguas receptoras, um garanhão doador de sêmen fresco, as doadoras e os garanhões eram da raça Quarto de Milha. Cinco garanhões que se encontravam em uma central no estado de São Paulo doaram sêmen resfriado. Eram alimentados com capim Tifton e Tangola, concentrado e suplemento mineral proteinado, água a vontade. As éguas doadoras tinham idade variando entre 3 a 18 anos e com peso variando de 350 kg a 600 kg, mantidas em baias individuais. As éguas receptoras com idade variando entre 3 a 10 anos e com peso variando entre 350 kg a 500 kg. Todas foram selecionadas depois de passarem por exames clínicos, ginecológicos e avaliação de histórico reprodutivo, mantidas nos piquetes. O garanhão tinha 7 anos de idade e peso de 550 kg. O sêmen congelado estava armazenado no próprio haras.

A avaliação da dinâmica folicular nas éguas doadoras e receptoras foi monitorada através de palpação e ultrassom transretal de três a quatro vezes por semana. A identificação do estro nas doadoras foi feita através de



cio natural, quando necessário se fez indução com terapia hormonal, utilizando-se um análogo de PGF2 α 1,5 mL via intramuscular (IM). Ao ser detectado a presença de um folículo dominante com diâmetro igual ou maior que 35 mm, as doadoras foram induzidas com um análogo de GnRH, 2 mL via intravenosa (IV), para estimular a ovulação. A inseminação era feita 24 a 48 horas após a identificação deste folículo. A coleta do embrião foi feita no dia 8 ou 9 após a inseminação, considerando o dia zero (D0) como o dia da ovulação.

O método da coleta foi o não cirúrgico transcervical, onde se introduzia a mão com luvas estéreis e lubrificadas pela vagina da égua levando a sonda pela cérvix até chegar ao corpo do útero, o balonete era inflado com cerca de 40 mL de ar, em seguida era colocado de 1 a 3 litros de solução de Ringer com Lactado sobre pressão no útero da égua. O líquido era retirado por gravidade do útero após massagem via palpação retal. Algumas éguas recebiam doses de 1,5 mL de ocitocina via IM ou IV para auxiliar na drenagem do líquido, e todas as éguas recebiam doses de análogo de PGF2 α para acelerar o ciclo para uma nova coleta. O embrião era lavado e guardado cuidadosamente até o momento da transferência para receptora.

A identificação do estro nas receptoras foi feita através de cio natural, e assim como nas doadoras quando necessário se fez indução com terapia hormonal. As éguas receptoras receberam doses de análogo de GnRH 2 mL via IV, quando identificadas com folículo de 35 mm para estimular a ovulação. A TE foi feita com auxílio de uma pipeta de inseminação vestida com camisa sanitária e acoplada a uma seringa de 3 mL, e o embrião depositado no corpo uterino da égua. A confirmação da prenhez era feita no quinto dia após a transferência.

Todas as receptoras receberam uma dose de progesterona (P4-LA 200) 1,5 mL via IM no dia da transferência. No entanto, éguas que entraram em cio natural receberam somente uma dose de progesterona, ao contrário de éguas que tiveram o cio induzido, que receberam doses semanais de progesterona até completar 120 dias de gestação.

Resultados e Discussão

No presente estudo foram realizadas 67 inseminações de agosto a outubro de 2014, destas inseminações 50 foram com sêmen resfriado, 10 com sêmen fresco e 7 com sêmen congelado. Foram recuperados e transferidos 42 (62,69%) embriões durante o mesmo período e registraram-se 33 receptoras prenhez. Estatisticamente não houve diferença na recuperação embrionária entre as diferentes doadoras ($P > 0,05$). Este resultado provavelmente foi devido ao bom manejo da propriedade relacionado as boas condições nutricionais e de higiene em que as doadoras foram submetidas, somado aos exames clínicos e reprodutivos periódicos, além das condições climáticas da região que favorecem o ciclo estral em qualquer fase do ano. O resultado encontrado neste estudo foi semelhante ao feito por Mortensen et al. (2009), que tiveram taxa de recuperação embrionária de 63% (22/35) e inferior ao encontrado por Kumar et al. (2008), que foram de 81,19% (95/117).

A taxa de prenhez das receptoras foi de 78,77% de positividade ($n = 33$) do total de 42 transferências realizadas. Este resultado foi alcançado provavelmente devido à importância que foi dada as boas condições de manejo geral das receptoras, idade, condições nutricionais e aprovação nos exames reprodutivo e clínico, além da habilidade do técnico que realizou a transferência. O resultado obtido condiz com a afirmação feita por Riera (2000), que cita que éguas receptoras devem estar em balanço energético positivo durante a temporada de transferência, e com a afirmação feita por Meira (2007), que cita que a habilidade do técnico tem sido um dos fatores que mais influenciam na taxa de prenhez, assim como a importância do porte e qualidade reprodutiva da receptora para escolha em programas de TE.

Em relação ao tipo de sêmen sobre o índice de recuperação embrionária, houve influência significativa estatisticamente ($P < 0,05$). O sêmen fresco usado neste estudo para inseminação de doadoras obteve melhores resultados 90% ($n = 9$), em relação ao sêmen resfriado e congelado. Este resultado está acima do encontrado por Squire et al. (1982), que obteve 78% de recuperação embrionária com inseminação utilizando sêmen fresco, e condiz com afirmação feita por Cuervo-Arango (2009), em que o sêmen fresco geralmente produz melhores resultados de recuperação embrionária do que o sêmen refrigerado ou o congelado.

O sêmen congelado usado neste estudo não obteve nenhum resultado positivo, isto ocorreu provavelmente pelo fato de a motilidade espermática do sêmen do garanhão usado ser muito baixa depois do descongelamento. O resultado obtido com sêmen congelado neste estudo condiz com o estudo feito por Camargo et al. (2013), onde as inseminações processadas com sêmen congelado, geraram menor número de embriões do que com o sêmen fresco e refrigerado, sinalizando ainda a necessidade de busca de conhecimentos mais aprofundados, para congelar a célula espermática, de modo a aproximar-se dos índices de prenhez quando se emprega sêmen fresco e resfriado.

Conclusão

Na realização deste estudo concluiu-se que o índice de recuperação embrionária não sofreu influência em relação as doadoras, houve influência no índice de recuperação embrionária pelo tipo de sêmen utilizado para inseminação das doadoras, em que o sêmen fresco apresentou valores superiores ao resfriado e congelado e a taxa de prenhez não sofreu influência das receptoras utilizadas.



Referências

- Alonso MA.** Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhes em éguas receptoras de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v.36, p.s207- s214, 2008.
- Caiado JRC, Fonseca FA, Silva JFS, Fontes RS.** Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. *R. Bras. Zootecnia*. v.36, p.360-368, 2007.
- Camargo CE, Weiss RR, Kozicki LE, Duarte MP, Duarte MCG, Bertol MAF, Gaievski FR, Bastos GM.** Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça brasileiro de hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião. *Vet Zootec*, v.20, p.74-83, 2013.
- Cuervo-Arango J.** Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology*, v.71, p.1267-1275, 2009.
- Fitzgerald BP, Mcmanus CJ.** Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biol Reprod*, v.63, p.335-340, 2000.
- Kumar D, Jhamb D, Kumar N, Badial D.** Foals born through fresh embryo transfer in India. *Proceedings 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, Moscow, Russia, p.567-568, 2008
- Lira RA, Peixoto GCX, Silva AR.** Transferência de embrião em equinos: Revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, p.132-140, 2009.
- Mckinnon AO, Squires EL.** Embryo Transfer and Related Technologies. In: Samper JC, Pycock JF, Mckinnon, A. O. (Ed.). *Current therapy in equine reproduction*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. Cap. 51, p. 319-334.
- Meira C.** Endocrinologia da Reprodução, Dinâmica Folicular, Superovulação e Transferência de Embriões na Espécie Equina, 2007. (Área da Reprodução) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.
- Riera FL.** Equine embryo transfer. In: Samper JC (Ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p.185-199.
- Squires EL, Imel KJ, Iuliano MF, Shideler RK.** Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer program. *J Reprod Fertil Suppl*, p. 409-414, 1982.



Taxa de prenhez em matrizes suínas submetidas aos métodos de inseminação artificial convencional e monta natural em granja comercial no nordeste paraense

Pregnancy rate in sows submitted to the methods of Artificial Insemination Conventional and Natural Monta in commercial farm in northeast Pará

Geyse Maria Machado Lima^{1*}, Wilson Amaro Moreira Conde Sobrinho¹, Marina Bezerra Macedo², Raphael Castro Conde², Gustavo Alighiere Lopes da Silva³, Wilton Figueiredo Lima³, Keitiane Colares de Sousa⁴, Sebastião Tavares Rolim Filho⁵

¹Graduado em Zootecnia, Instituto de Saúde e Produção Animal, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ²Graduando em Med. Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ³Residente do setor de Reprodução Animal, ISPA, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁴Especialista em Reprodução Animal, ISPA, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁵Doutor em Reprodução Animal, ISPA/UFRA, Belém, Pará, Brasil.

*E-mail da autora principal: geyselima.zoo@gmail.com

Abstract

The reproductive planning a squad, using natural breeding (MN), can be carried out to the maximum use of animals (Campos, 2008). However there are practical to provide improvements in the system, such as artificial insemination (AI). twelve were used sows with an average age of two years. Pregnancy diagnosis was performed 30 days after the procedure. The arrays were divided into two groups, six were subjected to the IA-six (MN). The pregnancy rate was 66.67% and the rate of return to estrus was 33.33% for both treatments ($P > 0.05$), with no significant difference. The AI in pigs shows satisfactory results in the northeast of Pará, which provides the producer, recognize that the method is the most profitable because it reduces the number of animals in the herd, reducing environmental impacts and risks of transmission of sexually transmitted diseases.

Keywords: biotechnology, breeding animals, pig farming.

Palavras-chave: biotecnologia, reprodução animal, suinocultura.

Introdução

A eficiência produtiva em um sistema de exploração de suínos está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva, medida pelo número de leitões produzidos por fêmeas por ano (Dial et al., 1992). Um planejamento reprodutivo do plantel, que utiliza a monta natural, pode ser realizado visando o máximo de aproveitamento produtivo dos animais e adequação do sistema (Campos, 2008). Porém existem práticas que proporcionam melhorias significativas dentro de um sistema produtivo, como a Inseminação Artificial (IA), por exemplo. A diminuição de animais em um plantel e manutenção dos índices reprodutivos representa manutenção, ou ainda, elevação de retornos financeiros da produção; diminuição da área de criação, custos, mão de obra e acima de tudo, diminuição dos impactos que a suinocultura representa para o meio ambiente.

O desempenho reprodutivo insatisfatório em geral deve-se a fatores relacionados ao ambiente (climáticos e instalações), genéticos, de sanidade, de nutrição e do manejo na hora da monta (Alvarenga et al., 2011). Por este motivo, buscam-se atualmente alternativas para o manejo reprodutivo dentro das granjas suínícolas, segundo Oberlender et al. (2008), a inseminação artificial em suínos é uma técnica relativamente nova, que vem sendo desenvolvida desde a década de 30 e a partir de 1970 tomou um grande impulso, por constituir um método de reprodução de grande eficiência econômica, possibilitando a diminuição de gastos com o número de reprodutores no plantel e sincronismo no manejo reprodutivo da granja e maior vida útil de reprodutores, possibilitando assim a introdução de machos com bom potencial genético no rebanho. Por este motivo objetivou-se verificar a eficiência reprodutiva de matrizes suínas, testando dois métodos reprodutivos, a monta natural e a inseminação artificial convencional, a fim de possibilitar, aos criadores de suínos, alternativas viáveis e que tragam benefícios econômicos, reprodutivos e sanitários ao plantel.

Material e Métodos

As doze matrizes utilizadas no presente estudo eram das raças Large white, Duroc e mestiças, com idade média de dois anos. Oriundas de granja comercial, todas as matrizes eram múltiparas e foram inseminadores experientes do setor de reprodução animal da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, os responsáveis pelo procedimento. Das doze matrizes, seis foram submetidas a inseminação artificial convencional e seis ao método de monta natural controlada. As matrizes foram retiradas da maternidade cinco dias antes da cobertura e inseminação, esta metodologia é desenvolvida no manejo de gestação em suínos, evidenciando o retorno fisiológico da fêmea à reprodução, segundo a metodologia preconizada por Oberlender et al. (2008). Após a avaliação de cio das fêmeas, através do teste de pressão lombar, foi determinado o momento ideal para realizar a inseminação e a cobertura, e o período para ocorrer à fecundação.

Na inseminação artificial, após ser detectado o cio, ocorreu à higienização da vulva das matrizes com

papel toalha e em seguida foi disponibilizado aproximadamente 200 g de ração de gestação no cocho, para que esta se mantivesse em pé. Foram utilizados dois reprodutores, previamente avaliados, para a coleta de sêmen, um da raça Landrace e outro mestiço (Duroc X Pietrain). A técnica de coleta foi a da mão enluvada. Logo após a coleta do ejaculado foi realizada a avaliação do mesmo e houve o preparo da dose inseminante, que foi de 50 mL de sêmen fresco com duas inseminações, com intervalo de 12 horas, sendo a primeira inseminação após a detecção do cio e a segunda, 12 horas após a primeira inseminação, de acordo com a metodologia preconizada por Oberlender et al. (2008).

A monta natural controlada foi realizada em baia apropriada, como piso contendo areia, para evitar que os animais escorregassem, sendo utilizados dois reprodutores para cada matriz em estro, caracterizando o cruzamento industrial. Foi realizada a higienização na região posterior da matriz, bem como na região do óstio prepucial dos reprodutores. As coberturas tiveram 15h de intervalo, sendo a primeira realizada no final da tarde do primeiro dia e a segunda na manhã do segundo dia. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após as inseminações e as coberturas, com a utilização do Ultrassom DP 2200 com transdutor convexo, como preconiza Knox e Flowers, (2001) e os dados, organizados em planilhas eletrônicas e posteriormente submetidos ao teste de Tukey, através do software Static Analysis Symposium (SAS 2009).

Resultados e Discussão

Dentre as doze matrizes utilizadas no presente estudo, seis foram submetidas ao método de Inseminação Intracervical convencional (IA) e seis ao método de Monta Natural Controlada (MN). A taxa de prenhez foi de 66,67 % e a taxa de retorno ao cio foi de 33,33% para os dois tratamentos ($P > 0,05$), como mostra a tabela 01. Não houve diferença significativa entre os dois métodos. Os dois métodos foram executados com facilidade pelos inseminadores, porém o método de IAIU foi realizado em menor tempo, devido à facilidade em inserir a pipeta e o cateter no trato genital das matrizes.

Candini et al. (2000) avaliaram 799 coberturas em fêmeas das raças Landrace (L), Large White (LW) e mestiças, sendo 539 de Inseminação Artificial e 260 de Cobertura Natural. Reprodutores (L e LW) de comprovada fertilidade foram utilizados tanto para CN quanto para IA. Os índices de fertilidade foram de 72,9% e 75,8%, respectivamente, para inseminação artificial e monta natural, não mostrando diferença significativa.

De acordo com Corrêa et al. (2001), em sistemas de IA esta relação passa a ser de 1:80 e 1:200. Portanto, o emprego da IA, mesmo com uma tecnologia tradicional, permitiu um aumento no número de fêmeas atendidas por macho quando comparada à monta natural. Dentre as principais vantagens da IA, a principal seria a possibilidade de disseminação acelerada de material genético de animais superiores, reduzindo a distância entre os polos extremos da pirâmide genética (Visscher et al., 2000).

Tabela 1. Taxa de prenhez e taxa de retorno ao cio de fêmeas suínas submetidas a dois métodos reprodutivos em granja comercial no nordeste paraense ($P > 0,05$).

Método	Taxa de prenhez	Taxa de retorno ao cio
IA*	66,67%	33,33%
MN**	66,67%	33,33%

(*) IA: Inseminação Artificial; (**) MN: Monta Natural.

Conclusão

A Inseminação Artificial (IA) em suínos evidencia resultados satisfatórios na região nordeste do Pará, não se diferenciando estatisticamente do método de Monta Natural (MN) no presente estudo. O que proporciona ao produtor, reconhecer que o método de IA é o mais rentável, pois durante o estudo foram utilizados apenas dois reprodutores para IA e MN industrial foram utilizados dois reprodutores por cada estro de uma matriz, totalizando doze reprodutores para as seis matrizes em sistema de monta natural. O emprego da IA, mesmo com uma tecnologia tradicional, permitiu um aumento no número de fêmeas atendidas por macho quando comparada à monta natural e mantendo os retornos produtivos. Além de reduzir os impactos ambientais, devido à diminuição de animais no plantel e redução dos riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis entre os animais.

Referências

- Alvarenga ALN, Zangeronimo MG, Oberlender G, Murgas LDS. Aspectos reprodutivos e estresse na espécie suína. *Lavras, Boletim Técnico* - n. 86, p.1-40, 2011.
- Campos PJC. *Melhoramento genético aplicado à produção animal*. 5.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008. p 443-463.
- Candini PH, Viana CHC, Madureira EH, Arruda RP, Celeghini ECC, Assumpção MEOD, Gusmões PPG, Valentin R, Visintin JA. Comparação dos índices reprodutivos com inseminação artificial ou cobertura natural sob influências sazonais em suínos. *Braz J Vet Res Anim Sci*, São Paulo, v.37, n.6, 2000.



- Corrêa MN, Meincke W, Lucia TJR, Descamps JC.** Fisiologia e Manejo Reprodutivo da Fêmea Suína. In: Inseminação artificial em suínos. 1. Ed. [S.I.]: Printpar, p.34-36, 2001.
- Dial GD, Marsh WE, Polson DD, Vaillancourt JP. Reproductive failure: Differential diagnosis.** In: Leman AL, Straw BE, Mengeling WL, d'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of Swine. 7th ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr; 1992. pp. 88-137.
- Knox R, Flowers W.** Using real-time ultrasound for pregnancy diagnoses in swine, 2001. Disponível em: <<http://www.pork.org/pig/NEWfactSheets/08-04-01g.pdf>>. Acesso em: 18 março. 2016, p.1-8.
- Oberlender G, Murgas LDS, Mesquita SP.** Inseminação artificial em suínos. Lavras, Boletim Técnico - n.79, p.1-16, 2008.
- Visscher P, Pon-Wong R, Whittemore C, Haley C.** Impact of biotechnology on (cross) breeding programmes in pigs. *Livestock Production Science*, v.65, p.57-70, 2000.



Taxa de prenhez em matrizes suínas submetidas ao método de Inseminação Artificial Intracervical e Inseminação Artificial Intrauterina em granja comercial no nordeste paraense
Pregnancy rate in sows submitted to the method of Insemination intracervical Artificial Insemination Intrauterine Artificial and in commercial farm

Geyse Maria Machado Lima^{1*}, Wilson Amaro Moreira Conde Sobrinho², Raphael Castro Conde³, Louise Carneiro de Carvalho⁴, Gustavo Alighiere Lopes da Silva⁵, Wilton Figueredo Lima⁶, Keitiane Colares de Sousa⁷, Sebastião Tavaves Rolim Filho⁸

¹Graduada em zootecnia, Instituto de Saúde e Produção Animal – UFRA, Belém, Pará, Brasil; ²Graduado em Zootecnia, Instituto de Saúde e Produção Animal, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ³Graduando em Med. Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁴Graduanda em Med. Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁵Residente do setor de Reprodução Animal, ISPA – UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁶Residente do setor de Reprodução Animal, ISPA/UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁷Especialista em Reprodução Animal, ISPA/UFRA, Belém, Pará, Brasil; ⁸Doutor em Reprodução Animal, ISPA/UFRA, Belém, Pará, Brasil.

*E-mail: geyselima.zoo@gmail.com

Abstract

The Artificial Insemination is a practice that provide significant improvements for breeding due to the decrease of animals and maintenance of the reproductive indices, meaning lifting financial production returns. The six arrays used in this study were the breeds Large white, Duroc and crossbred with an average age of two years. Was performed lumbar pressure test determined the optimal time to perform the insemination. The players were previously evaluated and insemination dose was 50 ml, with two inseminations, with 12 hours. It used the spiral pipette Artificial Insemination intracervical (IAIC) and disposable pipette cap with the aid of Intrauterine Insemination catheter for intrauterine Artificial (IAIU), each model according insemination method, three arrays in each method. The pregnancy rate was 66.67% and the rate of return to estrus was 33.33% for the two methods (P <0.05), so there was no significant statistical difference between the methods of Artificial Insemination.

Keywords: biotechnology; breeding animals; pig farming.

Palavras-chave: biotecnologia; reprodução animal; suinocultura.

Introdução

A eficiência produtiva em um sistema de exploração de suínos está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva, medida pelo número de leitões produzidos por fêmeas por ano (DIAL et al., 1992). Um planejamento reprodutivo do plantel, que utiliza a monta natural, pode ser realizado visando o máximo de aproveitamento produtivo dos animais e adequação do sistema (CAMPOS, 2008). Porém existem práticas que proporcionam melhorias significativas dentro de um sistema produtivo, como a Inseminação Artificial (IA), por exemplo. A diminuição de animais em um plantel e manutenção dos índices reprodutivos representa manutenção, ou ainda, elevação de retornos financeiros da produção; diminuição da área de criação, custos, mão de obra e acima de tudo, diminuição dos impactos que a suinocultura representa para o meio ambiente.

Segundo Oberlender et al. (2008), a inseminação artificial em suínos é uma técnica relativamente nova, que vem sendo desenvolvida desde a década de 30 e, a partir de 1970 tomou um grande impulso, por constituir um método de reprodução de grande eficiência econômica. Possibilitando a diminuição de gastos com reprodutores, sincronismo no manejo reprodutivo da granja e maior vida útil de reprodutores, possibilitando assim a introdução de machos com bom potencial genético no rebanho. Por este motivo objetivou-se verificar a eficiência reprodutiva de matrizes suínas, testando dois métodos de inseminação artificial, a fim de possibilitar, aos criadores de suínos, alternativas viáveis e que tragam benefícios econômicos, reprodutivos e sanitários ao plantel.

Material e Métodos

As seis matrizes utilizada no presente estudo eram das raças Large white, Duroc e mestiças, com idade média de dois anos. Oriundas de granja comercial, todas as matrizes eram múltiparas e foram inseminadores experientes do setor de reprodução animal da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, os responsáveis pelo procedimento. As matrizes submetidas à inseminação artificial convencional foram retiradas da maternidade cinco dias antes da inseminação. Esta metodologia é desenvolvida no manejo de gestação em suínos, evidenciando o retorno fisiológico da fêmea à reprodução, segundo a metodologia preconizada por Oberlender et al. (2008). Após a avaliação de cio da fêmea, através do teste de pressão lombar, foi determinado o momento ideal para realizar a inseminação, e o período para ocorrer à fecundação. Quando foi detectado o cio, ocorreu a higienização da vulva da matriz com papel toalha e em seguida foi disponibilizado aproximadamente 200 g de ração de gestação no cocho, para que esta se mantivesse em pé.

Foram utilizados dois reprodutores, previamente avaliados, para a coleta de sêmen, um da raça Landrace e outro mestiço (Duroc X Pietrain). A técnica de coleta foi a da mão enluvada. Antes da coleta foi realizada a



higienização do animal, incluindo o banho e o corte dos pelos do óstio prepucial. Os reprodutores foram previamente treinados ao salto no manequim em baia apropriada. O ejaculado foi coletado em becker graduado, que foi revestido de papel toalha, para proteger os espermatozoides das radiações solares e possuindo sua borda revestida de gaze, a fim de reter a fração gelatinosa, que fora desprezada. Logo após a coleta do ejaculado foi realizada a avaliação do mesmo e houve o preparo da dose inseminante, que foi de 50 mL de sêmen fresco com duas inseminações, com intervalo de 12 horas, sendo a primeira inseminação após a detecção do cio e a segunda, 12 horas após a primeira inseminação, de acordo com a metodologia preconizada por Oberlender et al. (2008).

Foram utilizados dois modelos de pipetas: pipeta espiral de Inseminação Artificial Intracervical (IAIC) e pipeta descartável com tampão, com auxílio de cateter intrauterino para Inseminação Artificial Intrauterina (IAIU), cada modelo de acordo com método de inseminação utilizado. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após as inseminações, com a utilização do Ultrassom DP 2200 com transdutor convexo, como preconiza Knox e Flowers, (2001) e os dados, organizados em planilhas eletrônicas e posteriormente submetidos ao teste de Tukey, através do software Static Analysis Symposium (SAS 2009).

Resultados e Discussão

Entre as seis matrizes inseminadas, três receberam o método de Inseminação Intracervical (IAIC) e as outras três receberam o método de Inseminação Artificial Intrauterina (IAIU). A taxa de prenhez foi de 66,67 % e a taxa de retorno ao cio foi de 33,33% para os dois tratamentos ($P>0,05$), como mostra a tabela 01. Não houve diferença significativa entre os dois métodos. Os dois métodos foram executados com facilidade pelos inseminadores, porém o método de IAIU foi realizado em menor tempo, devido à facilidade em inserir a pipeta e o cateter no trato genital das matrizes.

Serret (2005) verificou em seu estudo realizado com inseminação artificial convencional, taxas de concepção para a IAIC 98,9% e para a IAIU 87,1%. O volume da dose inseminante era de 100 mL para a IAIC e de 50 mL para a IAIU. Entretanto o presente estudo foi realizado com a padronização da dose inseminante, que foi de 50 mL/inseminação, sendo esta realizada duas vezes.

Hernández Caravaca et al., (2012) em seus estudos mostraram que as taxas de retorno ao estro quanto as técnicas aplicadas, foram: IAIU e IAIC de 20% e 24% respectivamente. Chaves (2014) observou valores de retorno ao estro de 33,33% para a IAIC e 16,7% para o método de IAIU.

Tabela 1. Taxa de prenhez e taxa de retorno ao cio de fêmeas submetidas a dois diferentes métodos de inseminação em granja comercial no nordeste paraense.

Método	Taxa de prenhez	Taxa de retorno ao cio
IAIC*	66,67%	33,33%
IAIU**	66,67%	33,33%

(*) IAIC: Inseminação Artificial Intracervical; (**) IAIU: Inseminação Artificial Intrauterina.

Conclusão

A inseminação artificial é uma técnica simples de ser aplicada, com o mínimo de treinamento. Esta metodologia em suínos evidencia resultados satisfatórios na região nordeste do Pará. Ratificou-se, portanto, não existir diferença estatística significativa entre os métodos de Inseminação Artificial Intracervical (IAIC) e Inseminação Artificial Intrauterina (IAIU).

Referências

- Campos PJC.** Melhoramento genético aplicado à produção animal. 5.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008, p.443-463.
- Chaves RSL. Taxa de retorno ao estro de fêmeas suínas submetidas à inseminação artificial Intracervical e intrauterina sem observação de estro. 42 f. Tese Graduação, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, 2014.
- Dial GD, Marsh WE, Polson DD, Vaillancourt JP. Reproductive failure: Differential diagnosis.** In: Leman AL, Straw BE, Mengeling WL, d'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of Swine. 7th ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr; 1992. pp. 88-137.
- Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico JM, Matás C, Carvajal JA, Vieira L, Abril D, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA.** Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Animal Reproduction Science*, v. 136, p.14-22, 2012.
- Knox R, Flowers W.** Using real-time ultrasound for pregnancy diagnoses in swine, 2001. Disponível em: <<http://www.pork.org/pig/NEWfactSheets/08-04-01g.pdf>>. Acesso em: 18 março. 2016, p.1- 8.
- Oberlender G, Murgas LDS, Mesquita SP.** Inseminação artificial em suínos. *Lavras, Boletim Técnico - n.79*, p.1-16, 2008.
- Serret CG.** Eficiência reprodutiva com inseminação artificial intra-cervical e pós-cervical, em fêmeas suínas, associada à concentração espermática e perfil estral. Pelotas RS, 2005.



Azul de toluidina como método para avaliação da integridade da cromatina de espermatozoides canino extraídos do tecido testicular fresco

Toluidine blue as a method for assessment of chromatin integrity canine spermatozoa extracted from fresh testicular tissue

José Fabson Pinheiro dos Santos*, **Andressa Kathily de Macêdo Siqueira**, **Hian Raphael Rodrigues de Medeiros**, **Roberta Ferreira da Boa Morte**, **Anne Karoline Batista das Montanhas**, **Wandson João da Silva e Souza**, **Jairo de Macêdo Lins e Silva Neto**, **Rita de Cássia Soares Cardoso**

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Recife, PE, Brasil.

*E-mail: fabson_3@yahoo.com.br

Abstract

Conservation of gonadal tissue is important for maintenance of endangered wild species. However, the preservation can lead to cell damage and loss. Thus, it is necessary testicular tissue evaluation before and after storage in order to determine damage. The evaluation of sperm chromatin integrity ensures a better assessment of sperm quality. The toluidine blue is a simple and sensitive test to evaluate the sperm chromatin integrity from several species, but there are not reports in the dog. The aim of this study was evaluating canine spermatozoa extracted from fresh testicular tissue of seven post-pubertal mongrel dogs by toluidine blue and sperm morphology. For statistical analysis, it was used normality test (Shapiro Wilk) and Wilcoxon test ($P < 0.05$). Toluidine blue showed 83% condensed chromatin. Morphological analysis presented 69.34% normal spermatozoa. Toluidine blue was sensitive for the evaluation. However, it still needs some adjustments for a more accurate result for such specie.

Keywords: dog, germoplasm, sperm morphology.

Palavras-chave: cão, germoplasma, morfologia espermática.

Introdução

A conservação de tecido gonadal traz mais uma alternativa para medicina veterinária, principalmente para manutenção de espécies selvagens ameaçadas de extinção (Thuwanut e Chatdarong 2012), onde o tecido preservado permite reestabelecer a espermatogênese após o xenotransplante (Abrishami et al., 2010).

O processo de conservação pode levar a danos e perdas celulares, desta forma, faz-se necessário a avaliação dos fragmentos do tecido testicular previamente à criopreservação objetivando determinar o grau de danos e perdas de espermatozoides após o descongelamento. Esses espermatozoides podem ser avaliados pelas análises rotineiras de um espermograma, como motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas (CBRA, 2013). Entretanto, Nasr-Esfahani et al. (2004) afirmam que a análise de rotina não é capaz de detectar danos na cromatina espermática.

A avaliação da integridade da cromatina do espermatozoide é de extrema importância para assegurar uma melhor avaliação da qualidade espermática, uma vez que essa integridade está diretamente ligada à fertilização e desenvolvimento embrionário (Alves et al., 2015). Na espécie humana, a avaliação da integridade da cromatina espermática é utilizada para justificar casos de infertilidade em espermograma normal (Giwercman et al., 2003). Na espécie bovina, cromatina espermática integra tem apresentado relação com a fertilidade (Oliveira et al., 2013).

Existem vários métodos para avaliar a integridade da cromatina espermática. Na espécie canina, Hidalgo et al. (2015) citam dois métodos utilizados para avaliar esse parâmetro, o teste de estrutura da cromatina espermática e teste de dispersão da cromatina espermática.

O azul de toluidina tem sido reportado na literatura como um teste simples (Erenpreiss et al., 2001) e sensível para análise da integridade da cromatina de espermatozoides de várias espécies (Alves et al., 2015), porém não há relatos de seu uso na espécie canina.

A partir desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a integridade da cromatina de espermatozoides caninos extraídos do tecido testicular fresco através do azul de toluidina, bem como realizar a análise morfológica pela coloração Panótico rápido.

Material e Métodos

Foram utilizados testículos de cães pós-púberes, sem idade e raça definidas (n=7 pares), provenientes de animais do Centro de Controle Ambiental (CCA) de Garanhuns, PE. Após a orquiectomia bilateral, os testículos foram limpos com NaCl 0,9% estéril aquecida (37°C) adicionada de antibióticos, penicilina (100UI/mL) e estreptomomicina (0,1mg/mL), então, foram envoltos em gazes embebidas com a mesma solução e transportados em caixa isotérmica (15°C) até o laboratório, onde foram limpos novamente e dissecados. Cada testículo foi fatiado com lamina de bisturi, e analisados a fresco, sendo o fragmento colocado em uma placa de Petri com 1 mL do meio de manipulação (tampão fosfato-salino) e fatiado em fragmentos menores de aproximadamente 0,4x0,4x0,4 cm para recuperação dos espermatozoides. Após 10 minutos no meio, as suspensões espermáticas foram coletadas



para análise de integridade da cromatina e morfologia espermáticas. Para avaliar a integridade da cromatina foi utilizado o corante Azul de Toluidina. Para esta análise o esfregaço foi fixado em formalina 10%, seguido de lavagem em etanol 70% e corado pelo azul de toluidina 0,025% (em tampão de McIlvaine, pH 4,0). Ao final foram contabilizadas 100 células diferenciando-as pela coloração, sendo que as células com cromatina íntegra (cromatina condensada) coraram em azul claro, enquanto aquelas com alteração na cromatina, ou seja, descondensadas, coraram em azul escuro a violeta. Quanto à análise da morfologia espermática, esta foi realizada pelo método de esfregaço corado. Após realizado o esfregaço espermático e corado pela coloração Panótico rápido, foram então, sob microscopia óptica contadas 100 células, classificando-as em normais ou anormais (defeitos primários ou secundários). Os dados foram expressos em média e desvio padrão através da estatística descritiva. Também foi realizado o teste de normalidade (Shapiro Wilk) e teste de Wilcoxon ($p < 0,05$) em R 3.3.1.

Resultados e Discussão

Na análise da integridade da cromatina espermática, o percentual de espermatozoides extraídos do tecido testicular com cromatina condensada e descondensadas foi $83\% \pm 7,89$ e $17 \pm 7,89$ respectivamente. O azul de toluidina foi considerado um teste sensível para análise da integridade da cromatina de espermatozoides de bovinos (Oliveira et al., 2012), caprinos e ovinos (Kamimura et al., 2010) e, inclusive de humanos (Kim et al., 2013). Contudo, no presente experimento observou-se em algumas amostras dificuldade em encontrar o mínimo de 100 células para avaliação, devendo ser investigado se todos os espermatozoides foram corados adequadamente.

Com relação a análise morfológica dos espermatozoides testiculares, o percentual de células normais e defeitos morfológicos totais foram $69,34\% \pm 23,36$ e $30,66\% \pm 24,14$ respectivamente. Dentre os defeitos mais observados estão, gota citoplasmática, cabeça solta, caudas enrolada e dobrada. O percentual de células morfológicamente normais foi próximo ao estabelecido pelo CBRA (2013) para um ejaculado canino de qualidade aceitável ($>70\%$). Porém, é importante ressaltar que as células em questão são oriundas do parênquima testicular, portanto, não passaram por alguns processos de maturação, como por exemplo a perda da gota citoplasmática. Os dois métodos foram comparados e não houve diferença significativa entre os resultados.

Consideração Final

O teste pelo azul de toluidina se mostrou sensível na avaliação da integridade da cromatina de espermatozoides testiculares caninos. No entanto, ainda necessita de alguns ajustes para uma avaliação mais acurada na espécie.

Referências

- Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A.** Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*, v.73, p.86-96, 2010.
- Alves MBR, Oliveira ML, Lançoni R, Florez-Rodriguez SA, Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC.** Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática – parte I. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.263-269, 2015.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3. ed. Belo Horizonte:CBRA, 104p, 2013.
- Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Janis Z.** Comparative Study of Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Integrity. *J Androl*, v.22, p.45-53, 2001.
- Giwerzman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Froham B, Spano M.** Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fert Steril*, v.80, p.1404-1412, 2003.
- Hidalgo M, Urbano M, Ortiz I, Demyda-Peyras S, Murabito MR, Gálvez MJ, Dorado J.** DNA integrity of canine spermatozoa during chill storage assessed by the sperm chromatin dispersion test using bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, v.84, p.399-405, 2015.
- Kamimura CDF, Jacomini JO, Beletti ME.** Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. *Cienc Agrotec*, v.34, p.212-219, 2010.
- Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Kim SH, Moon SY, Choi YM.** The Utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med*, v.40, p.23-28, 2013.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H.** Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*, v.36, p.95-100, 2004.
- Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Celeghini ECC, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Oliveira CS, Lima VFMH.** Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livestock Science*, v.146, p.38-46, 2012.
- Oliveira RV, Dogan S, Belser LE, Kaya A, Topper E, Moura A, Thibaudeau G, Memili E.** Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction*, v.146, p.263-272, 2013.
- Thuwanut P, Chatdarong K.** Cryopreservation of Cat Testicular Tissues: Effects of Storage Temperature, Freezing Protocols and Cryoprotective Agent. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.777-781, 2012.



Vitrificação de tecido somático de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) usando diferentes crioprotetores

*Somatic tissue vitrification of collared peccaries (*Peccary tajacu* Linnaeus, 1758) using different cryoprotectants*

Alana Azevedo Borges¹, Luiza Bento de Queiroz Neta¹, Maria Valéria de Oliveira Santos¹, Gabriela Pereira de Oliveira Lira¹, Lucas Emanuel Nascimento¹, Alexandre Rodrigues Silva², Moacir Franco Oliveira³, Alexsandra Fernandes Pereira^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia Animal; ²Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal; ³Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

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

Abstract

The somatic tissue cryopreservation of collared peccaries is an interesting alternative as conservation strategies for maintaining the ecosystem and the optimization of breeding management. Therefore, the aim of the study was to evaluate different cryoprotectants in the vitrification solid surface of somatic tissue in collared peccaries. Thus, the tissue fragments were vitrified by solid surface in minimum essential medium modified by Dulbecco supplemented with 10% bovine fetal serum (FCS) and different intracellular cryoprotectants [3.0 M dimethylsulfoxide with 0.25 M sucrose (DMSO-SUC) and 3.0 M ethylene glycol with 0.25 M sucrose (EG-SUC)]. Thus, the combination of 3.0 M EG, 0.25 M sucrose and 10% FCS was adequate to maintain normal tissue characteristics compared with non-vitrified fragments and vitrified with DMSO-SAC, especially for the volumetric ratio of epidermis (34.5 vs. 36.6 vs. 32.1) and dermis (61.2 vs. 58.7 vs. 62.5), respectively.

Keywords: wild animals, cryoprotectants, skin.

Palavras-chave: animais silvestres, crioprotetor, pele.

Introdução

Os catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) possuem alta adaptação a cativeiros e são interessantes economicamente pela apreciação da sua carne e couro (Bodmer et al., 1990). Além disso, esta espécie pode ser utilizada como modelo experimental por ter relação filogenética com animais vulnerável, *Tayassu pecari* Link, 1795, ou em risco de extinção, *Catagonus wagneri* Rusconi, 1930. Por essas razões, a importância da preservação da espécie é proposta, sendo interessante o emprego de estratégias de conservação para a manutenção do ecossistema global (Souza et al., 2012) e a otimização do manejo de criação (Silva et al., 2012). O estabelecimento de bancos de fragmentos de tecido somático para a obtenção de células tem sido indicado como uma abordagem prática para a preservação das espécies (León-Quinto et al., 2009). Quanto à técnica de criopreservação tecidual, tem sido demonstrado que a vitrificação é um método promissor. Em catetos, Borges et al. (2015) compararam o potencial de conservação deste método com a vitrificação convencional em tecidos somáticos e verificaram resultados satisfatórios da vitrificação em superfície sólida. Contudo, alguns fatores podem influenciar na eficiência da vitrificação em superfície sólida, como os tipos de crioprotetores (Carvalho et al., 2011). Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes crioprotetores na vitrificação em superfície sólida de tecido somático de catetos.

Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, no. 23091.001072/2015-92), em conformidade com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, n°. 48633-1). Para tanto, um total de oito animais (3–6 meses), entre machos e fêmeas, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, n°. IBAMA 1478912) foi utilizado. As amostras de pele da região auricular periférica foram recuperadas de maneira asséptica, de acordo com o sistema de manejo de identificação dos indivíduos. Fragmentos teciduais (9,0 mm³) foram criopreservados por vitrificação em superfície sólida em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino e sacarose (0,25 M) e diferentes crioprotetores intracelulares [dimetilsulfóxido (DMSO; 3,0 M) e etilenoglicol (EG; 3,0 M)]. Após duas semanas, fragmentos aquecidos e não criopreservados (controle) foram analisados usando técnicas histológicas. Assim, para a histologia clássica, fragmentos foram fixados em 4% de paraformaldeído, seccionados em 5,0 µm, corados com hematoxilina-eosina (HE) e visualizados usando microscopia de luz (Leica DM500) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD) para a obtenção das imagens. Para a avaliação, 20 campos aleatórios (magnitude 40×) foram selecionados em cada lâmina e analisados usando o software Image J (US National Institutes of Health, EUA) para a quantificação de fibroblastos, halos perinucleares e proporção volumétrica da epiderme e derme pela contabilização dos pontos sobrepostos a estrutura analisada (epiderme ou derme), dividido pela soma de todos os pontos sobrepostos ao tecido [(n° de vezes de sobreposição da estrutura aos pontos/total de pontos do tecido)*100, de acordo com Mota et al. (2014)]. Finalmente, todos os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (1 animal/ repetição) e analisados usando o software 6.0 GraphPad Prisma (Graph-Pad Software Social; La Jolla, CA, EUA) P < 0,05.

Todos os valores foram verificados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo teste de Levene. Nos dados da proporção volumétrica foram realizada a transformação por arco-seno e analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Já os resultados de fibroblastos e halos perinucleares foram analisados por testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

Resultados e Discussão

As características morfológicas foram avaliadas após a vitrificação utilizando duas soluções de vitrificação (EG-SAC e DMSO-SAC) em comparação com o controle (não vitrificado). Para a proporção volumétrica (Fig. 1), os fragmentos vitrificados na solução de vitrificação EG-SAC (epiderme: $34,5 \pm 9,0\%$; derme: $61,2 \pm 9,1\%$) foi similar ao controle ($P > 0,05$). Para a quantificação de fibroblastos e halos perinucleares as soluções de vitrificação EG-SAC (fibroblastos: $90,3 \pm 24,6$; halos perinucleares: $29,3 \pm 16,4$), DMSO-SAC (fibroblastos: $88,2 \pm 25,3$; halos perinucleares: $32,3 \pm 21,8$), diferiram ($P < 0,05$) do controle (fibroblastos: $127,0 \pm 41,1$; halos perinucleares: $14,8 \pm 10,1$). Estes resultados mostraram que a solução de vitrificação mais adequada para a preservação das características normais do tecido somático de catetos foi a EG-SAC. Este resultado corrobora com o já observado para vitrificação em superfície sólida de tecido ovariano caprino que utilizaram a solução de vitrificação contendo 3,0 M de etilenoglicol com 0,25 M sacarose e 10% soro fetal bovino (Carvalho et al., 2011).

Conclusões

O presente estudo, concluiu que o melhor resultado para a vitrificação em superfície sólida para tecido somático de *P. tajacu* foi a solução de vitrificação composta por 3,0 M de EG, 0,25 M de sacarose e 10% de SFB que permitiu a preservação máxima das características normais do tecido após o aquecimento. Assim, essas amostras podem ser empregadas em outras técnicas de reprodução e conservação da espécie.

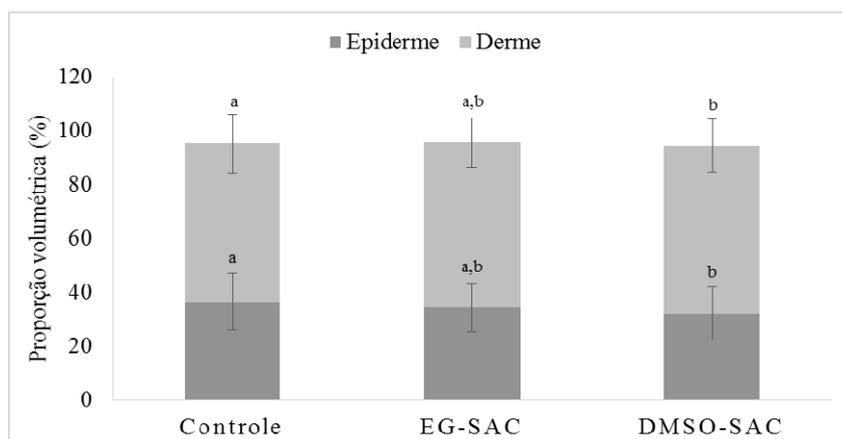


Figura 1. Proporção volumétrica da epiderme e derme de tecido somático vitrificado com soluções constituídas com distintos crioprotetores permeáveis. Controle, EG-SAC, DMSO-SAC. Barras indicam desvio padrão. ^{a,b}diferem ($P < 0,05$) na mesma camada da pele (epiderme ou derme).

Referências

- Bodmer, RE, Bendayan NY, Moya L, Fang TG.** Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. Boletín de Lima, v. 70, p. 49-56, 1990.
- Borges AA, Queiroz Neta LQ, Santos MVO, Santos MLT, Lima GL, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Isolation of somatic cell derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) submitted to different vitrification techniques. Anim Reprod, v.12, p.842, 2015.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Luz HKM, Rossetto R, Lopes CAP, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.** Influence of vitrification techniques and solutions on themorphology and survival of preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. Theriogenology, v.76, p.933-941, 2011.
- León-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Martínez-Hernandez FJ, Moreno JM, Soria B.** Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the *Iberian lynx* bank as a model for other endangered species. Anim Reprod Sci, v.112, p.347-361, 2009.
- Mota CA, Leão RAC, Xavier PR, Júnior AM.** Volumetric proportions of placentome structural components of the crossbred Holstein-Zebu according to the delivery order. Rev Bras Reprod Anim, v.38, p.165-169, 2014.
- Silva MA, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JAB, Campos LB, Paiva ALC, Paula VV, Silva AR.** Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. Theriogenology, v. 78, p. 605-611, 2012.
- Souza JMG, Batista RITP, Melo LM, Freitas VJF.** Reproductive biotechnologies applied to the conservation of endangered ruminant – Past, Present and Future. Rev Port de Ciên Vet, v. 110, p. 31-38, 2012.



Obtenção de embriões clones de Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) pelo uso da Transferência Nuclear de Células Somáticas interespecíficas (TNCSi)

Obtention of brown brocket deer (Mazama gouazoubira) embryos by interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer (iSCNT)

Lívia Correia Magalhães^{1*}, Jenin Cortez Polanco², Maajid Hassan Bhat³, Dárcio Ítalo Alves Teixeira⁴,
Luciana Magalhães Melo⁵, Vicente José de Figueirêdo Freitas⁶

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil; ²Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético, Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Perú

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

Abstract

Aiming to produce clone embryos from brown brocket deer (Mazama gouazoubira) and to evaluate their in vitro development, bovine oocytes were used as cytoplasts. Fibroblasts from brown brocket deer and bovine were used as carioplasts. After 20-22 hours of in vitro maturation the oocytes were denuded and then enucleated. Embryos were reconstructed and then activated using ionomycin-DMAP protocol. The reconstructed embryos were cultured for seven days (38.5°C with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) and the differences between iSCNT (deer-bovine) and SCNT (bovine-bovine) development rates were compared by unpaired t test (p < 0.05). No differences were observed in the cleavage (65.5% and 72.8%) and blastocyst (11.3% and 5.9%) rates to iSCNT and SCNT embryos, respectively. In conclusion, bovine oocytes may be used in brown brocket deer conservation programs through iSCNT technique.

Key words: cloning, deer, iSCNT.

Palavras-chave: clonagem, cervídeo, TNCSi.

Introdução

O último século presenciou uma dramática redução no número de espécies animais, incluindo grandes mamíferos, causada por ações ligadas às atividades humanas (Andrabi e Maxwell, 2007). Em algumas espécies de mamíferos, existe uma necessidade urgente de ações de conservação por meio da aplicação de tecnologias de reprodução assistida, tais como a transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Na região Nordeste, encontra-se o veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), o qual não é considerado em risco de extinção, todavia tem seu habitat reduzido consideravelmente, o que o coloca em situação delicada em futuro próximo. Esta espécie pode ser beneficiada pelo uso de técnicas reprodutivas, tais como a Transferência Nuclear de Células Somáticas interespecífica (TNCSi). Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência da TNCSi para obtenção de embriões clones de veado-catingueiro.

Material e Métodos

Este estudo está aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob número 45727-1. Foram obtidos ovários bovinos em abatedouro local que, após punção folicular, foram colhidos e avaliados os oócitos para maturação *in vitro* (MIV) por 20-22 h em TCM-199 suplementado em atmosfera umidificada a 38,5°C e 5% de CO₂. Logo após, os oócitos foram desnudados e corados (Hoechst 33342) para a enucleação, em microscópio invertido (Nikon TE2000, Tóquio, Japão) equipado com micromanipuladores (Narishige, Tóquio, Japão) e sob luz UV. Anteriormente, fibroblastos bovinos e cervídeos, obtidos por biópsia auricular, foram cultivados até 95% de confluência e privados de soro, para serem utilizados como carioplastos para TNCS (bovino-bovino) e TNCSi (cervídeo-bovino). Os embriões foram reconstruídos por eletrofusão (Multiporator, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e ativados utilizando procedimento ionomicina-DMAP. Nas estruturas em que foi confirmada a reconstrução, foi realizado cultivo *in vitro* (CIV) por sete dias em SOF (fluido sintético de oviduto) modificado e suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino em atmosfera umidificada a 38,5°C com 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% de N₂ (Estufa Eve, WTA, Cravinhos, Brasil). Foram verificadas as taxas de clivagem e de blastocistos, as quais foram avaliadas pelo teste t não pareado (P < 0,05).

Resultados e Discussão

Foram realizadas 10 sessões, nas quais 777 oócitos foram selecionados, e que, após MIV, resultaram em uma taxa de maturação de 89,7%. Um total de 430 estruturas foram utilizadas para distribuição nos grupos TNCS (bovino-bovino) e TNCSi (cervídeo-bovino). O oócito bovino foi capaz de reprogramar o núcleo da célula somática de cervídeo. Não foram observadas diferenças estatísticas (P > 0,05) no desenvolvimento embrionário em embriões clones bovinos comparados com os embriões interespecie (Tab.1). A TNCSi costuma ser mais eficiente quando se utiliza células doadoras e receptoras de núcleo que são de espécies estreitamente relacionadas, uma vez que a produção natural de descendentes híbridos vivos mostra maior compatibilidade



núcleo-citoplasma entre as duas espécies (Mastromonaco et al., 2007). No caso de espécies em risco de extinção, o embrião pode ser reprogramado utilizando-se oócitos de animais de produção, sobretudo bovinos e suínos, que são a maior fonte de obtenção dos citoplastos (Lagutina et al., 2013).

Tabela 01 - Desenvolvimento *in vitro* de embriões clones.

Grupo	Embriões reconstruídos	Taxa de	
		clivagem (%)	blastocisto (%)*
Bovino-bovino	206	150 (72,8) ^a	17 (11,3) ^a
Cervídeo-bovino	232	152 (65,5) ^a	9 (5,9) ^a

*A taxa de blastocisto foi calculada em relação ao número de embriões clivados. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Conclusão

Oócitos bovinos demonstraram que podem ser utilizados como citoplastos para produção de embrião de veado-catingueiro por TNCSI, mostrando futuro potencial em programas de conservação da espécie.

Referências

- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive technologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v.99, p.223-243, 2007.
- Lagutina I, Fulka H, Lazzari G, Galli C.** Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems. *Cell Reprogram*, v.15, p.374-384, 2013.
- Mastromonaco GF, Favetta LA, Smith LC, Filion F, King WA.** The influence of nuclear content on developmental competence of gaur cattle hybrid *in vitro* fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biology of reproduction*, v.76, p.514-523, 2007.



Efeito pró-erétil em ratos tratados com extrato etanólico das vagens de *Senna spectabilis*

Pro-erectile effect in rats treated with ethanol extract of pods of *Senna spectabilis*

Dalvan Fortaleza Alencar^{1*}, Emanuela Ribeiro Moura², Jamylla Mirck Guerra de Oliveira³, Marina Rebeca Soares Carneiro de Sousa², Marina Silva Carvalho¹, Moema Sousa de Oliveira², Paulo Alex Bezerra Sales², Amilton Paulo Raposo Costa⁴

¹Graduando da Universidade Federal do Piauí, Campus Teresina; ²Pos-Graduando da Universidade Federal do Piauí, Campus Teresina; ³Docente da Universidade Federal do Piauí, Campus Bom Jesus; ⁴Docente da Universidade Federal do Piauí, Campus Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: dalvanfortaleza@hotmail.com

Abstract

This study aimed analyze the Pro-erectile effect of rats trated with ethanol extract os pods of Senna spectabilis (EEVSs), a native plant from Savana, predominant on brazilian northwest. Compreendendo que The feed is an important aspect for the development of good breeders and reproductive risk of failures caused by empirical use of native plants in the feeding of cattle can not be ignored Were used 40 Wistar rats separated in three groups treated with EEVSs and one group treated with apomorphine and another treated with distilled water. After each treatment the animals were observed In a transparent chamber. The rats that received the EEVSs showed no significant alterations. However at presence of apomorphine there was an increase of penile erection, for it is an dopaminergic agonist.

Key-words: reproduction, phitotherapy, native plants.

Palavras-chave: reprodução, fitoterapia, plantas nativas.

Introdução

Composta por uma diversidade de espécies nativas, com alto potencial forrageiro, a caatinga vem sendo utilizada de forma empírica pelos criadores, sem o devido conhecimento do seu potencial produtivo, uso irracional do solo e com pouca ou nenhuma preocupação ambiental (Silva et al., 2004). O uso aleatório dessas plantas pode provocar distúrbios não apenas no solo, mas também nos animais. Em estudos com algumas plantas, foi observado nos resultados casos de toxicidade, entre outros efeitos colaterais, relacionados ao comportamento sexual. Algumas espécies, tais como *Tribulus terrestris* (Gauthaman et al., 2002) e *Massularia acuminata* (Yakuba et al., 2007), possuem efeito androgênico e afrodisíaco, e a *Curcuma aeruginosa* Roxb (Suphron et al, 2012) com efeito antiandrogênico comprovado. A espécie em estudo, *Senna spectabilis*, é semelhante às espécies citadas, encontrada na mesma região (nordeste brasileiro), as quais são utilizadas vastamente tanto na alimentação como na terapia, sendo que, além de seu potencial farmacológico, podem apresentar efeitos tóxicos. Sendo assim, a sua utilização pode culminar no desenvolvimento de efeitos como a diminuição de peso ou até mesmo na alteração dos padrões reprodutivos normais (Guimarães Filho & Soares, 1999). Este estudo tem como objetivo analisar o efeito pró-erétil causado pela *Senna spectabilis*.

Materiais e Métodos

As vagens de *Senna spectabilis* foram coletadas e secas em estufa a 45 °C, por cinco dias. Em seguida foram moídas em moinho de facas e o pó obtido foi macerado em álcool absoluto 99,5%, por 15 dias. O extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo e liofilizado. Foram utilizados 40 ratos machos divididos em cinco grupos de oito animais, sendo dois grupos controle e três de tratamento. Os ratos receberam o extrato etanólico das vagens de *S. spectabilis* (EEVSs) por via oral em três doses diferentes (250, 500 e 1000 mg/kg). O grupo controle positivo recebeu apomorfina (1,1µg/kg/sc) e o grupo controle negativo solução salina via oral 1mL por 100g de peso corporal. Os animais foram habituados por 10 minutos em uma câmara transparente (30 cm x 30 cm x 15 cm) e, após a ambientação, foram observados por 30 minutos, registrando-se as seguintes respostas:

I - Ereção: o animal permanece somente sobre as patas traseiras, inclinando o corpo para frente e levando a cabeça ao encontro da área genital lambendo o pênis. O pênis ereto fica visível, porém por pouco tempo. Em seguida foram eutanasiados com Tiopental sódico, via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg associado à lidocaína na concentração de 10 mg/mL.

Resultados e Discussão

Os grupos tratados com extrato não apresentaram alteração se comparados com o grupo controle, porém diferindo significativamente ($P > 0,05$) do grupo controle positivo, tratado com apomorfina (Fig. 1), que é uma droga agonista dopaminérgica, que facilita a ereção peniana e pode ser usada como um controle positivo (Barros, 2005). Os animais que receberam EEVSs não apresentaram ereção durante o tempo de observação, equiparando-se ao grupo controle. Portanto, não atuando sobre o processo fisiológico de ereção peniana.

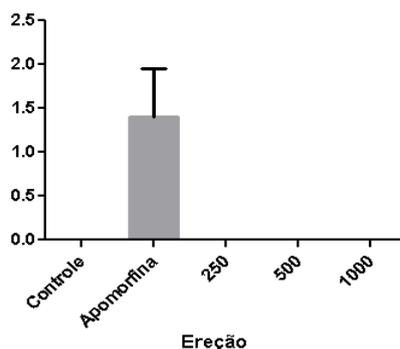


Figura 1. Efeito pró-erétil em ratos tratados com extrato etanólico das vagens *Senna spectabilis*.

Conclusão

Os animais tratados com extrato etanólico das vagens *Senna spectabilis* não apresentaram alteração significativa, possuindo, no entanto, um efeito pró-erétil positivo na presença de apomorfina.

Referências

- Barros ARC.** Efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides isolada de *aspidosperma ulei* markgr.: estudo in vivo e in vitro. 2005. 199p. Tese (Doutorado em farmacologia). Universidade Federal do Ceará.
- Gauthaman K, Adaikan PG, Prasad RNV.** Aphrodisiac properties of *Tribulusterrestres* extract (protodioscin) in normal and castrated rats. In: *Live Science*. v.71 p.1385-1396, 2002.
- Guimarães Filho C, Soares JGG.** Sistema CBL para recria e engorda de bovinos no semi-árido. Embrapa meio-norte (instruções técnicas). Petrolina (PE): 1999.
- Silva DF, Silva AMA, Lima AB, Melo JRM.** Exploração da caatinga no manejo sustentável de pequenos uminantes. In: *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte, 2004.
- Suphrom N, Pumthong G, Khorana N, Waranuch N, Limpeanchob N, Ingkaninan K.** Anti androgenic effect of sesquiterpenes isolated from the rhizomes of *Curcuma aeruginosa* Roxb. *Fitoterapia*, v.83, p.864-871, 2012.
- Yakubu MT, Akanji MA, Oladiji AT.** Effects of oral administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* (Schweinf-Ex Hierm) stem on some testicular function indices of males rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008.



Atividade antiandrogênica no tratamento da hiperplasia prostática benigna com nanocarreadores transdérmicos de dose combinada (tansulosina e dutasterida)

Antiandrogenic activity in Benign Prostatic Hyperplasia treatment with combined nanocarriers transdermal dose (tamsulosin and dutasteride)

Ana Paula Gomes Pereira Cunha¹, Shayara Lopes Ciriaco², Ykro Talvanis Duarte Cavalcante¹, André Luiz Meneses³, Rozeverter Moreno Fernandes⁴, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro⁵, Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes^{6*}

¹Graduados em Medicina Veterinária/Universidade Federal do Piauí (UFPI); ²Mestre em Ciências Farmacêuticas, UFPI; ³Coordenação do Curso de Farmácia/Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFPI; ⁴Depto. Morfofisiologia Veterinária/Centro de Ciências Agrárias (CCA), UFPI; ⁵Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI; ⁶Departamento Bioquímica e Farmacologia/CCS/UFPI, Teresina, PI, Brasil.

*E-mail: zenaidemoreno@gmail.com

Abstract

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is one of the most common diseases of the urogenital tract. This study aimed to obtain one transdermal microemulsion of dutasteride and tamsulosin, drugs used in the treatment of BPH, characterize them and study your in vitro release, evaluating through in vivo studies the antiandrogenic activity of transdermal microemulsion. The preparation of the formulation involved obtaining the microemulsion with Dutasteride and Tamsulosin in the equivalent percentage of 0.2% for each drug. To carry out the antiandrogenic activity, were used 32 rats (Wistar) in four groups experimental. The characterization performed all formulations showed good results, in which the evaluation of anti-hyperplastic the microemulsion demonstrated one reducing the organs testosterone-dependent (prostate and seminal vesicles) corroborated for the study in question enabling then obtaining promising transdermal formulations for BPH treatment, presenting thus a therapeutic alternative to conventional treatments.

Keywords: antiandrogenic activity, dutasteride, tamsulosin.

Palavras-chave: atividade antiandrogênica, dutasterida, tansulosina.

Introdução

A Hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma doença urológica caracterizada pelo aumento benigno da próstata, os mecanismos não são totalmente elucidados, mas relaciona-se com mudanças hormonais e não-hormonais que ocorrem durante o envelhecimento. O tratamento medicamentoso atualmente dá-se pela via oral e a indicação envolve a combinação de inibidores da 5 α -redutase como dutasterida (DU) e inibidores α -adrenérgicos como tansulosina (TA) (Pinheiro; Pisco, 2012). Com isso um nanocarreador cada vez mais utilizado são as microemulsões, que oferecem uma estabilidade termodinâmica e a capacidade de solubilização de vários solutos com diferentes solubilidades, sendo assim um sistema de entrega de drogas no tratamento de inúmeras doenças (Fanun, 2012). Estudos que viabilizem o desenvolvimento de sistema de liberação transdérmico que sirva como uma potencial forma farmacêutica no tratamento desta doença tão prevalente na atualidade é de grande importância.

Metodologia

Para a realização deste trabalho foram utilizados 32 ratos machos, adultos com 2 a 3 meses de idade, com peso variando de 200 a 300 g.

Grupos experimentais:

Grupo 1 - Controle negativo - veículo da microemulsão (0,1ml/ cm²).

Grupo 2 - Controle positivo (HPB) - Testosterona (T) (5000ug/ml, i.m.)

Grupo 3 –Grupo teste - Testosterona (T) (5000ug/ml, i.m.) associado a microemulsão com TA (0,2%) e DU (0,2%) por via transdérmica.

Grupo 4 – Grupo Teste – apenas a microemulsão de TA (0,2%) e DU (0,2%) via transdérmica

Os animais foram divididos em 4 grupos com 8 animais por grupo experimental, eles foram submetidos à orquiectomia e 30 dias após a recuperação do processo cirúrgico. Os animais foram tratados por 07 dias e depois eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100mg/kg) de acordo com o protocolo nº 029/14 aprovado pelo comitê de ética desta IES. Após pesagem a próstata e a vesícula seminal foram retiradas, seccionadas e preservadas em solução de formol a 10% e então submetidos ao processamento histopatológico e examinados microscopicamente para a verificação de possíveis alterações (Tolosa et al., 2003).

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e as análises foram realizadas com o programa estatístico, Graphpad Prism® versão 5.0, seguida do teste de Tukey e teste de Newman-Keuls vitro, com nível de significância $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados demonstram que houve um aumento significativo no peso da próstata e das vesículas seminais no grupo G2 em comparação com o G1 confirmou a indução bem sucedida da HPB. Observou-se também a indicação de que os fármacos sozinhos sem que haja a indução prévia de HPB não inferem significativamente alterações nos pesos e morfologia dos órgãos. Ainda é possível observar que, a utilização de 5-ARI como a dutasterida foi capaz de suprimir os níveis na próstata e circulares de DHT o que resultou na redução dos pesos e diminuição do tamanho de tais órgãos tratados (Fig. 1).

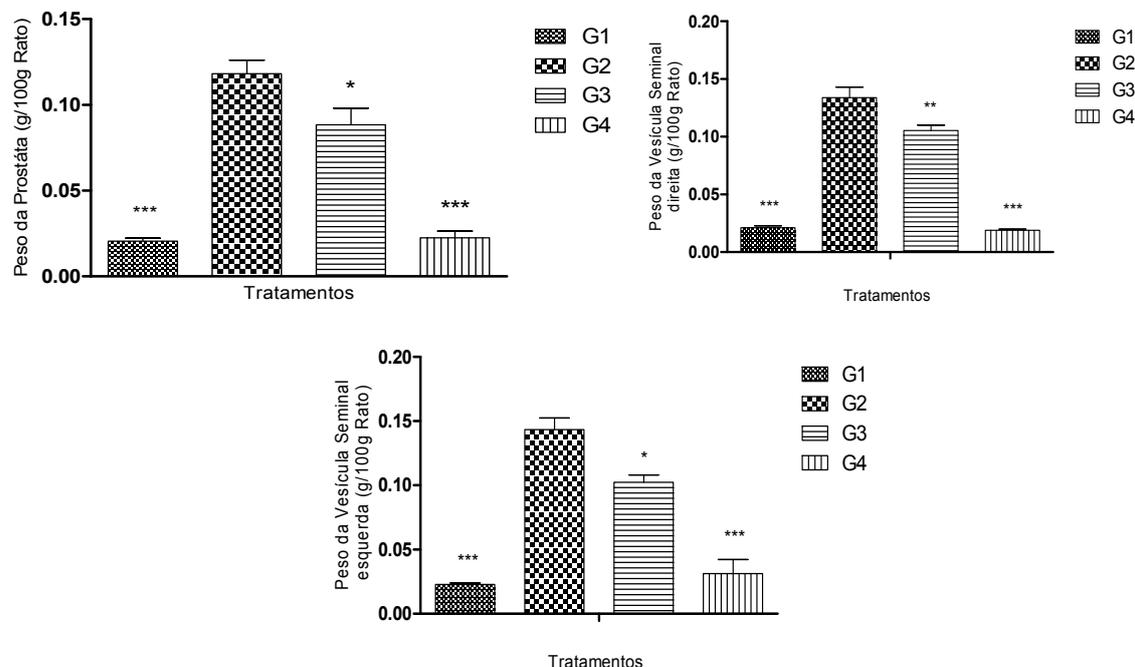


Figura 1. Comparações dos pesos da Próstata, vesícula seminal direita e esquerda (g/100g) de ratos Wistar dos grupos experimentais. Resultados expressos em médias±EPM.

Legenda: G1- Veículo da Microemulsão (ME); G2- Testosterona (i.m.); G3- Testosterona (i.m.) + ME 0,2% de DU e TA; G4- ME 0,2 % de DU e TA).

Tabela 1. Avaliação histopatológica da próstata na atividade anti-hiperplásica dos animais tratados com (Grupo 1- Veículo da Microemulsão (ME); Grupo 2- Testosterona i.m.; Grupo 3- Testosterona i.m. + ME 0,2% de DU e TA; Grupo 4- ME 0,2 % de DU e TA).

Grupos	Próstata	Percentual (%)
Veículo da Microemulsão	Normal	87,5
	Dilatação dos túbulos prostáticos	12,5
Testosterona i.m.	Hiperplasia prostática	100
	Hiperplasia vascular	25
	Hiperemia vascular	25
Testosterona i.m. + Microemulsão 0,2% de DU e TA	Hiperplasia prostática	100
	Hiperemia vascular	62,5
	Infiltrado inflamatório	25,0
	Hiperplasia prostática	37,5
Microemulsão 0,2% de DU e TA	Infiltrado inflamatório	37,5
	Hiperemia vascular	25,0
	Normal	25,0

Quanto ao estudo histopatológico entre os achados estão hiperplasia prostática, hiperemia e infiltrado inflamatório (Tab. 1). Na figura 2 observa-se uma próstata normal com padrões estromais e epiteliais característicos no G1 (A), no G2 (B) onde houve a administração de Testosterona exógena, como era o esperado ocorreu a indução à HPB com proliferação organizada de células epiteliais; no G3 (C) quando administrada a dose exógena de Testosterona juntamente com a Microemulsão de DU e TA ainda ocorre a presença de hiperplasia porém, observa-se uma regressão da mesma, demonstrando que o tecido estava em recuperação,

portanto indica que o tempo de uma semana de tratamento tenha sido inferior ao necessário para completa regressão do tecido; no G4 (D) observa-se uma próstata normal como era o esperando quando ocorre apenas a administração dos fármacos DU e TA sem a indução da hiperplasia por administração de Testosterona exógena.

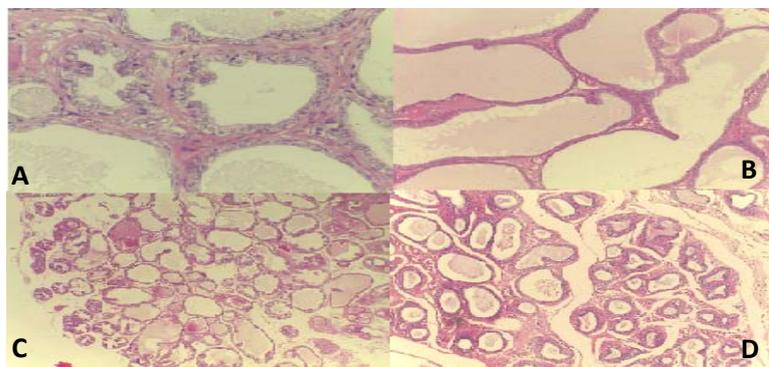


Figura 2. Estudo histopatológico da Próstata. (A) Próstata normal - G1; (B) Hiperplasia prostática - G2; (C) Hiperplasia prostática em recuperação - G3; (D) Próstata normal - G4.

Conclusão

No estudo da atividade antiandrogênica pode-se concluir que a Microemulsão de DU e TA foram capazes de induzir a regressão da próstata e vesículas seminais na HPB induzida pela testosterona. Quanto a absorção transdérmica esta demonstrou-se satisfatória o que é possível comprovar com o estudo histopatológico, onde houve a regressão da hiperplasia, porém o tempo de tratamento acredita-se ter sido inferior ao necessário para a completa recuperação dos tecidos.

Apoio: UFPI.

Referências

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. Manole, São Paulo, Brasil, 331pp, 2003.

Fanun M. Microemulsions as delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.17, p.306-313, 2012.

Pinheiro LC, Pisco JM. Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *Tech Vasc Interventional Rad*, v.15, p.256-260, 2012.



Nível da coluna de água na reprodução de *Betta splendens*

Level of the water column in breeding Betta splendens

Adriana de Sousa Amorim^{1*}, José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta², Luis Ricardo Romero Arauco³,
Eliane Nunes de Miranda Nazário⁴

¹Graduanda em Medicina Veterinária, UFPI/CPCE; ²Graduando em Zootecnia, UFPI/CPCE; ³Professor adjunto do curso de Bacharelado em Zootecnia, UFPI/CPCE; ⁴Graduanda em Medicina Veterinária, UFPI/CPCE.

*E-mail: adrianaSA2015@gmail.com

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of the water column in the survival of larvae of *Betta splendens*. The experiment was conducted in zoology laboratory of the Universidade Federal do Piauí, Campus Professor Cinobelina Elvas, in the city of Bom Jesus. They used 15 couples *Betta splendens* of reproductive age and 15 plastic circular tanks translucent with conical bottom with a capacity of 10L of water being measured at 28, 12 and 8 cm of water column. The experiment was conducted in a completely randomized design with 3 treatments and 5 replicates per treatment, the results were submitted to variance analysis at the level of 5.0%, and the averages compared by Tukey test through BIOESTAD 5.0. The results show that for reproduction *Betta splendens* can be used water column 8 cm in this experiment.

Keyword: *Betta splendens*, ornamental fish, reproduction.

Palavra chave: *Betta splendens*, peixe ornamental, reprodução.

Introdução

Betta Splendens é originário do sudeste asiático, mais precisamente no Camboja, Vietnã, Tailândia e da Malásia. Podendo ser encontrado em pequenas poças d'água e lagoas de baixa profundidade com alagamentos ocasionados nas culturas de arroz.

O primeiro peixe ornamental domesticado foi *Carassius auratu*, conhecido também como peixe-japonês. O *Betta splendens* foi o segundo a ser domesticado.

A criação de *Betta splendens* é importante no Brasil por constituir uma atividade rentável para pequenos proprietários sob regime de agricultura familiar. Esta espécie também tem sido utilizada como controle biológico de mosquitos vetores, como os das espécies *Aedes aegypti*, no Ceará, e o da *Culex quinquefasciatus* em Pernambuco (Pamplona et al. 2004).

A movimentação das larvas de beta se inicia a partir do terceiro dia de vida, quando as larvas começam a nadar em busca de alimento. Este peixe não se movimenta por longas distâncias à procura de alimento, dificultando assim sua alimentação em cativeiro. As condições ótimas para a reprodução do beta são: 26-28°C; ph:6,8-7,2; e 5mg/L de oxigênio dissolvido.

Visto que na larvicultura comercial de *Betta splendens* existem diversas formas de reproduzir e não havendo um consenso sobre o substrato e a altura da coluna de água entre os produtores, fazem-se necessários estudos nesta área. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da coluna de água na sobrevivência de larvas de *Betta splendens*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de zoologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Professora Cinobelina Elvas, situada na cidade de Bom Jesus.

Foram adquiridos de uma loja de comercial, 15 casais de *Betta splendens* em idade reprodutiva e feito a biometria do peso e comprimento dos reprodutores. Os machos e as fêmeas foram mantidos em caixas de água de 4,5L.

No experimento foram usados 15 tanques circulares de plásticos translúcido com fundo cônico com capacidade para 10L de água, sendo aferidos com 28, 12 e 8 cm de coluna de água.

Nos tanques, as fêmeas foram colocadas dentro de cestas de plástico, construídas de garrafas pet transparentes separadas dos machos, uma vez que se observou a construção do ninho pelos machos e o aparecimento de um ponto branco no orifício urogenital e o ventre avultado das fêmeas, se precedeu a liberação da fêmea para o acasalamento.

Os peixes reprodutores foram alimentados duas vezes ao dia a vontade com ração comercial *Betta float* para *Betta splendens*.

Após a liberação dos ovos das fêmeas, os machos recolheram os ovos e colocaram sobre o ninho, e uma vez que terminou a desova as fêmeas foram retiradas dos tanques de reprodução para evitar o ataque do macho e assim também evitar a destruição do ninho.

Os machos foram retirados dos tanques de reprodução evitando a destruição dos ninhos, após três dias,



quando as larvas começavam a se movimentar na coluna de água.

A contagem das larvas foi realizada 4 dias após da eclosão dos ovos, com a ajuda de uma pipeta de 10 mL, acoplada a uma seringa de 20 mL por uma mangueira de 0,5cm de diâmetro.

Diariamente, foi avaliada a temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD mg/L), condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e pH.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos os níveis da coluna de água dos tanques de reprodução Nível 1 = 12cm; Nível 2 = 28cm e nível 3 = 8cm de coluna de água e 5 repetições por tratamento, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 5,0% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, através do programa BIOESTAD 5.0.

Resultados e Discussão

As características físicas e químicas da água foram adequadas para a manutenção e reprodução dos peixes em todos os tratamentos.

As temperaturas da água em todos os tratamentos oscilaram entre 27,8 a 27,2°C de acordo com as recomendações de Wolfsheimer (2003), o qual determina como zona ótima para produção de larvas de peixes entre 25 e 28°C. Pode-se afirmar que as temperaturas mantidas no período experimental não interferiu na reprodução dos peixes. As concentrações de oxigênio dissolvido não atingiram valores críticos para a sobrevivência das larvas e oscilaram entre 3,1 e 4,2.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da análise de variância das médias do número de larvas produzidas por *Betta splendens* em diferentes alturas de coluna de água nos tanques de reprodução.

Ouve diferencia significativa ($P > 0,05$) entre o número de larvas produzidas a altura de coluna de água de 8cm com o número de larvas produzidas a 12 e 28 cm. E não se observou diferença entre o número de larvas produzidas a 12 e 28 cm de coluna de água.

Esta indiferença pode ser devido a profundidade da coluna de água (Paulo et al., 2006) indica que a reprodução de *Betta splendens* deve ser a uma coluna de água de 10 a 15 cm e como substrato pode ser usado diferentes tipos de substratos pedaço de isopor o folhas de alface. Kim (2002) indica que maiores alturas de coluna d'água representam um aumento no volume de produção em uma mesma área, contudo, podem influenciar negativamente na sobrevivência das larvas.

Neste experimento o maior número de larvas obtido 845 foi para os peixes reproduzidos a 8 cm de coluna de água este resultado está em concordância com o resultado encontrado por Kim (2002) que obteve maior sobrevivência no cultivo de larvas de *Betta splendens* a uma altura de coluna de água de 5 e 8cm.

Tabela 1. Médias do número de larvas produzidas por *Betta splendens* em diferentes altura de coluna de água de 12 cm, 28 cm e 8 cm nos tanques de reprodução.

Alturas da coluna de água (cm)	Número de larvas
Nível 12cm	269,00 ^B
Nível 28cm	302,25 ^B
Nível 8cm	845,00 ^A

Médias seguidas de mesma letra nas linhas e nas colunas não diferem entre si (Tukey, $\alpha=5\%$).

Conclusão

Para a reprodução de *Betta splendens* pode ser utilizada coluna de água de 8 cm nas condições deste experimento. Para a obtenção de maior número de larvas *Betta splendens* o piscicultor pode usar reprodutores de maior tamanho ou peso.

Referências

Kim CY. Efeito de Dietas e Altura da Coluna d'Água na Sobrevivência de Larvas de *Betta splendens* e o Aporte de Nitrogênio e Fósforo. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

Pamplona GC, Lima JWO, Cunha JCL. Evaluation of the impact on *Aedes aegypti* infestation in cement tanks of the municipal district of Canindé, Ceará, Brazil after using the *Betta splendens* fish as an alternative biological control. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.37, p.400-404. 2004.

Paulo MC. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens*, p.135-148. 2006.

Wolfsheimer G. The guide to owning Bettas. Neptune City: T.H.F. Publications, 2003. 63p.



Efeito do peso das fêmeas de *Betta splendens* na reprodução em tanques

Effect of the weight of Betta splendens female reproduction tanks

Adriana de Sousa Amorim^{1*}, José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta², Luis Ricardo Romero Arauco³,
Arléia Medeiros Maia⁴, Gabriela Gomes da Silva⁵

¹Graduanda em Medicina Veterinária, UFPI/CPCE; ^{2,4,5} Graduandos em Zootecnia, UFPI/CPCE; ³ Professor adjunto do curso de Bacharelado em Zootecnia, UFPI/CPCE.

*E-mail: adrianaSA2015@gmail.com

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of weight Betta splendens females and the number of eggs and larvae from breeding tanks. The experiment was conducted in zoology laboratory of the Universidade Federal do Piauí, Campus Professor Cinobelina Elvas, in the city of Bom Jesus. We used 15 couples Betta splendens of reproductive age and made you biometrics weight and meeting the players. The experiment was conducted in a completely randomized design with 3 treatments the levels of the water column of breeding tanks and 5 replicates per treatment, the results were submitted to variance analysis at the level of 5.0%, and the averages were compared by Tukey test through BIOESTAD 5.0. The greater the weight of the female greater the number of larvae Betta splendens. To obtain more larvae Betta splendens the farmer can use breeding greater size or weight.

Keywords: ornamental fish, weight, reproduction.

Palavra chave: peixe ornamental, peso, reprodução.

Introdução

Por ser a espécie mais popular entre os aquaristas, o *Betta splendens* passou por várias seleções genéticas, culminando com a obtenção de muitas variedades tanto de cor como de nadadeiras (Maurus, 1987).

Segundo Wolfsheimer (2003), o peixe-de-briga (*Betta splendens*), assim como muitos outros peixes, precisa de um cuidado maior em relação à alimentação durante a larvicultura, pois essa fase determina a boa formação das nadadeiras e labirinto. Além disso, a sobrevivência é um fator de grande importância para a lucratividade da produção.

Nos dois primeiros dias de vida, as larvas de peixes beta não apresentam um bom controle de natação, seja vertical ou horizontalmente, podendo ocorrer o desprendimento ao ninho provocando seu afundamento e mortalidade (Wolfsheimer, 2003). Essa é outra responsabilidade do macho, que se encarrega de auxiliar na fixação das larvas ao ninho de bolhas (Wolfsheimer, 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do peso de fêmeas de *Betta splendens* e o número de ovos e larvas obtidas nos tanques de reprodução.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de zoologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Professora Cinobelina Elvas, situada na cidade de Bom Jesus.

Foram adquiridos de uma loja de comercial, 15 casais de *Betta splendens* em idade reprodutiva e feito a biometria do peso e comprimento dos reprodutores. Os machos e as fêmeas foram mantidos em caixas de água de 4,5L.

No experimento foram usados 15 tanques circulares de plásticos translucido com fundo cônico com capacidade para 10L de água, sendo aferidos com 28, 12 e 8 cm de coluna de água.

Nos tanques, as fêmeas foram colocadas dentro de cestas de plástico, construídas de garrafas pet transparentes separadas dos machos, uma vez que se observou a construção do ninho pelos machos e o aparecimento de um ponto branco no orifício urogenital e o ventre avultado das fêmeas, se precedeu a liberação da fêmea para o acasalamento.

Os peixes reprodutores foram alimentados duas vezes ao dia a vontade com ração comercial Betta float para *Betta splendens*. Sempre evitando a poluição da água, após de cada alimentação os restos de ração e as fezes foram retiradas com a ajuda de um sifão.

Após a liberação dos ovos das fêmeas, os machos recolheram os ovos e colocaram sobre o ninho, e uma vez que terminou a desova as fêmeas foram retiradas dos tanques de reprodução para evitar o ataque do macho e assim também evitar a destruição do ninho.

Os machos foram retirados dos tanques de reprodução evitando a destruição dos ninhos, após de três dias, quando as larvas começavam a se movimentar na coluna de água.

A contagem das larvas foi realizada 4 dias após da eclosão dos ovos, com a ajuda de uma pipeta de 10 mL, acoplada a uma seringa de 20 mL por uma mangueira de 0,5cm de diâmetro.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamento os níveis da coluna de água dos tanques de reprodução Nível 1 = 12cm; Nível 2 = 28cm e nível 3 = 8cm de coluna de água e 5 repetições por tratamento, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA)

ao nível de 5,0% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, através do programa BIOESTAD 5.0.

Resultados e Discussão

As características físicas e químicas da água foram adequadas para a manutenção e reprodução dos peixes em todos os tratamentos.

As temperaturas da água em todos os tratamentos oscilaram entre 27,8 a 27,2°C de acordo com as recomendações de Wolfsheimer (2003), o qual determina como zona ótima para produção de larvas de peixes entre 25 e 28°C. A temperatura para criação de *Betta splendens* pode variar de 23°C a 34°C, sendo a temperatura ideal em torno de 27,5°C (Paulo, et al, 2006), pode-se afirmar que as temperaturas mantidas no período experimental não interferiu na reprodução dos peixes. As concentrações de oxigênio dissolvido não atingiram valores críticos para a sobrevivência das larvas e oscilaram entre 3,1 e 4,2. De acordo com Kubitzka (2004) o teor de oxigênio dissolvido nas incubadoras de peixes tropicais deve oscilar numa faixa de 4 a 6mg/L. Não entanto as larvas de peixes além de respirar pelas brânquias respiram pela pele e no caso do *Betta splendens* apresenta uma respiração auxiliar realizada pelo labirinto, órgão formado no peixe aproximadamente após duas semanas de vida.

Os valores de pH da água oscilaram entre 6,2 a 7,0 e não afetaram os peixes no experimento. O pH ideal para o cultivo de *Betta* está entre 6,8 e 7,2; porém o *Betta* resiste muito bem a choques de pH, podendo inclusive reproduzir-se em escalas diferentes da citada. Os valores de condutividade mantiveram-se entre 15 e 44,5 mV/cm. A análise da condutividade elétrica é de suma importância para a aferição das condições de estresse dos animais mantidos em viveiro, devido ao fato de que em qualquer condição de estresse há perda de sais pelas brânquias dos peixes, aumentando os valores de condutividade elétrica. Já neste experimento, devido ao pouco tempo dos peixes ficarem nos tanques de reprodução não houve modificações fora da faixa considerada normal para o cultivo de peixes.

Neste experimento o maior número de larvas obtido foi de 845 para *Bettas Splends* reproduzidos a 8cm de coluna de água, e este resultado está em concordância com o resultado encontrado por Kim (2000) que obteve maior sobrevivência no cultivo de larvas de *Betta Splends* a uma altura de coluna de água de 5 e 8cm.

Segundo Paulo et al. (2006) geralmente são expelidos de 100 a 600 ovos, dependendo da idade e do tamanho da fêmea, já Pimenta (2004), indica que as fêmeas podem depositar de 100 a 1000 ovos, os resultados obtidos neste experimento estão em concordância com os resultados obtidos por outros pesquisadores.

Na fig. 1 observasse a relação do peso das fêmeas de *Betta splendens* e o número de larvas obtidas nos tanques de reprodução.



Figura 1. Relação do peso das fêmeas de *Betta splendens* e o número de larvas obtidas nos tanques de reprodução.

Houve correlação positiva entre o peso das fêmeas e o número de larvas obtidas nos tanques de reprodução ($r=0.6456$), ou seja, quanto maior o peso da fêmea maior o número de larvas de *Betta splendens*.

Segundo Vazzoler (1996) a fecundidade das fêmeas de peixes varia com o tamanho aumentando com o crescimento, e está mais relacionada com o peso e o comprimento que com a idade do peixe, assim como os resultados obtidos na análise de regressão neste experimento, onde as fêmeas que apresentavam maior tamanho foram as que obtiveram maior número de larvas.

Conclusão

Quanto maior o peso da fêmea maior o número de ovos ou larvas de *Betta splendens*. Para a obtenção de maior número de ovos ou larvas *Betta splendens* o piscicultor pode usar reprodutores de maior tamanho ou peso.



Referências

- Maurus W.** Bettas a complete introduction. New jersey-EUA, t.f.h., 1987.
- Vazzoler AEAM.** Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá, EDUEM, 1996, 169p.
- Wolfsheimer G.** The guide to owning Bettas. Neptune City: T.H.F. Publications, 2003. 63p.
- Kim CY.** Efeito de Dietas e Altura da Coluna d'Água na Sobrevivência de Larvas de *Betta splendens* e o Aporte de Nitrogênio e Fósforo. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- Kubitza F.** Reprodução, larvicultura e produção de alevinos de peixes nativos. Jundiaí, SP. 2004.73p.
- Paulo MC.** Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens*, p.135-148. 2016.
- Pimenta RE.** Manual do criador de *Betta Splendens*. Ribeirão Preto, Sp.2004.