



***Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH associated with metoclopramide**

*Reprodução induzida de *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) por extrato bruto de hipófise de carpa ou GnRH associado a metoclopramide*

**Sergio Ricardo Batlouni<sup>1,\*</sup>, Thiago Scremin Boscolo Pereira<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pesquisador do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>2</sup>Pós-doutorando da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, SP, Brasil.

\*Email: batlouni@caunesp.unesp.br

In recent years, several studies have been developed to support the replacement of the crude carp pituitary extract (CPE) by synthetic products for induced reproduction of migratory fish. However, the results have been quite heterogeneous and there is no consensus or routine use of synthetic products in these species. In this concern, in this study we focused on obtaining information about ovulatory process in *L. elongatus* with different protocols using CPE or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists metoclopramide (mGnRHa + MET). To that, fifteen mature females were submitted to three different hormonal treatments routinely used in fish farms: 1-) CPE – two doses (0.5 and 5.0 mg kg<sup>-1</sup>, 12h interval); 2-) mammalian analogue gonadotropin-releasing hormone (mGnRHa - 3.5) – single dose (3.5 µg mGnRHa kg<sup>-1</sup> + 10 mg kg<sup>-1</sup> metoclopramide) and 3-) mGnRHa – 5.0 – single dose (5.0 µg mGnRHa kg<sup>-1</sup> + 10 mg kg<sup>-1</sup> metoclopramide). The reproductive performance (latency period, spawning rate, absolute fecundity and fertilization and hatching success) was compared among treatments. Details of the meiotic process were compared among treatments by histologic evaluation (volume density) and blood samples were collected for quantifying 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) and 17α-hydroxyprogesterone (17α-OHP) along the hormonal treatment. Student t test was used to analyse all parameters of reproductive performance, except for the percentage of spawning, which was analysed through the Chi - square test (X<sup>2</sup>). The volume density was analysed by comparing different treatments with a one-way analysis of variance (ANOVA). In order to analyse the gonadal steroids, two-way ANOVA for repeated measures was used. The Tukey's test was used as a post hoc analysis. A threshold of P ≤ 0.05 was set to infer statistical significance. The highest latency time was observed for CPE. The spawning rate was similar among CPE (80.00% ± 25.08) mGnRHa - 3.5 (100%) and mGnRHa – 5.0 (100%) treatments. The absolute fecundity (oocyte/fish) was also similar among treatments: 84.334 ± 32.98 (CPE), 97.239 ± 12.45 (mGnRHa - 3.5) and 95.338 ± 15.23 (mGnRHa – 5.0). Although females ovulated in all treatments, none of them provided viable embryos, showing low fertility rates and hatching rates close to zero. According to the volume density evaluation, both mGnRHa treatments were more potent for inducing ovulatory process, promoting a significant increase in the amount of postovulatory follicles (POF) and reduced densities of GVBD oocytes in post spawning ovaries compared to CPE. Accordingly, E<sub>2</sub> and 17α-OHP plasma levels were higher for mGnRHa treatments in comparison to CPE. Taken together these findings showed that all applied treatments may have caused some toxicity to *L. elongatus* eggs, regardless of the different steroid levels observed. These findings can be considered as unusual since the CPE doses applied here has been used for decades for diverse fish species and the mGnRHa doses applied here were quite low compared with those applied for most species. Therefore, it is possible that *L. elongatus* present a higher sensibility to CPE and mGnRHa and/or metoclopramide (or derived substances). Thus, the standardization of the use of synthetic products in this species still depends on new studies using lower doses of this substance, testing combinations with several doses and several types of dopamine inhibitors and considering the possibility of obtaining different responses with the same treatment in different periods within the breeding season.

**Keywords:** aquaculture, gonadal steroids, induced spawning, reophilic fish, viable embryos.

**Palavras-chave:** aquicultura, esteróides gonadais, desova induzida, peixes migradores, embriões. viáveis.



## **Avaliação da cinética espermática do sêmen de *Brycon orbignyanus* criopreservado em solução contendo melatonina**

*Sperm kinetics evaluation in semen of *Brycon orbignyanus* cryopreserved in solution containing melatonina*

**Priscila Cotta Palhares<sup>2,\*</sup>, Isadora de Lima Assis<sup>1</sup>, Gilmara Junqueira Machado<sup>1</sup>, Thales de Souza França<sup>1</sup>, José Gilmar da Silva Souza<sup>1</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, IFET Sudeste MG, Campus Rio Pomba, MG, Brasil.

\*E-mail: priscila.palhares@ifesudestemg.edu.br

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849) é uma espécie de peixe reofílica que despertou grande interesse pelas instituições de pesquisa principalmente pelo seu rápido crescimento e ganho de peso. A criopreservação de sêmen é uma técnica que permite o armazenamento dos gametas em longo prazo. Porém essa biotecnologia pode causar injúria celular e molecular. A adição de antioxidantes na solução de criocongelamento protege os espermatozoides contra os danos causados por radicais livres. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho a avaliação da ação da melatonina sobre a motilidade do sêmen criopreservado de Piracanjuba. Utilizou-se o sêmen de dez machos adultos de Piracanjuba. Os animais foram induzidos hormonalmente à espermição com duas doses (0,5 e 5,0mg/Kg de peso vivo) de extrato hipofisário de carpa, com intervalo de 12 horas entre as doses. Após cerca de 8 horas, foi feita a coleta do sêmen através de uma leve massagem celomática e as amostras coletadas em tubos de ensaio graduados. A motilidade espermática foi mensurada subjetivamente com o auxílio de microscopia óptica utilizando aumento de 400X, depositando-se uma alíquota de sêmen sobre a lâmina e ativado com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 0,7%, sendo usada apenas as amostras com motilidade superior a 80%. O sêmen foi diluído na proporção 1:9 (sêmen:diluidor) nos seguintes tratamentos: (T1) 10% metilglicol (MG) + 5% Beltisville Thawing Solution (BTS); (T2) 10% metilglicol (MG) + 5% Beltisville Thawing Solution (BTS) + 2mM de melatonina. Após a diluição, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5mL e colocadas em botijão de vapor de nitrogênio (Dry Shipper), onde foi congelado a -170°C a uma taxa de congelamento de -35,6°C/min durante 24h. As amostras foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido a -196°C, até o momento das análises. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 60°C por 5 segundos e a motilidade foi mensurada com o auxílio do software Sperm Class Analyser (SCA). Os parâmetros de motilidade avaliados foram, motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média de deslocamento (VAP), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e oscilação (WOB). Foi mensurado também o tempo de motilidade com o auxílio de um cronômetro, que foi acionado a partir do momento da ativação do sêmen e desativado quando o mesmo apresentou 10% de motilidade. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso de Animais (nº039/13). Os dados foram analisados usando o programa R. Para testar a normalidade foi utilizando o teste de Shapiro-Wilks, em seguida efetuou-se a análise de variância (one-way ANOVA). Sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan quando constatado efeito significativo ( $P < 0,05$ ). Apenas os parâmetros de motilidade total, tempo de motilidade e motilidade progressiva apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos, onde o T1 apresentou os menores valores ( $32,15 \pm 1,9\%$ ,  $44,3 \pm 1,2$  segundos e  $5,79 \pm 0,8\%$ , respectivamente). O fato de T2 ter apresentado os maiores valores ( $64,63 \pm 8,3\%$ ,  $84,22 \pm 11,4$  segundos;  $17,01 \pm 1,2\%$ , respectivamente), mostra que o tratamento com melatonina a 2mM é capaz de manter uma melhor motilidade por maior tempo quando comparada ao congelamento sem o uso desse antioxidante. Conclui-se então que a melatonina exerceu influência sobre a motilidade dos espermatozoides de Piracanjuba.

**Palavras-chave:** Sperm class analyser, motilidade, peixe, criopreservação, antioxidante.

**Keywords:** *Sperm class analyser, motility, fish, cryopreservation, antioxidant.*

**Agradecimentos:** FAPEMIG, FUNDECC, CEMIG e CNPq.



**Análise estereológica da placenta de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*)**  
*Stereological analysis of the New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) placenta*

**Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda<sup>1</sup>, Luciano César Pereira Campos Leonel<sup>1</sup>, Luciana Senna Simões<sup>1</sup>, Tais Harumi de Castro Sasahara<sup>1</sup>, Joana Larissa Barbosa Born<sup>2</sup>, Daniele dos Santos Martins<sup>3</sup>, Phelipe Oliveira Favaron<sup>1</sup>, Maria Angelica Miglino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, SP, Brasil; <sup>2</sup>Universidade de Santo Amaro, SP, Brasil; <sup>3</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP, SP, Brasil.

\*E-mail: carlacarvalhovet@gmail.com

Os coelhos são modelos animais frequentemente usados para estudar a placentação humana, em condições normais e patológicas. O início da gestação é marcado pelo crescimento acelerado da placenta para suprir as necessidades nutricionais e permitir o desenvolvimento do conceito, enquanto que na metade da gestação cresce mais lentamente que o feto, sofrendo alterações morfológicas e aumento da funcionalidade. No entanto, muitas características morfoquantitativas das fases da placentação ainda são pouco elucidadas; assim, objetiva-se avaliar estereologicamente os compartimentos placentários em coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), haja vista que o tamanho da placenta está diretamente relacionado com a funcionalidade do órgão e, conseqüentemente, com o crescimento fetal. Placentas nas idades de 12, 16, 20 e 24 dias gestacionais fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 48 horas, foram pesadas, mensuradas, seccionadas (área fetal e materna mantidas juntas) e amostradas aleatoriamente para a análise estereológica. Secções histológicas de 5µm de espessura foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e escaneadas em microscópio para estimar o volume dos compartimentos: fetal (labirinto e zona juncional) e materno (decídua). O volume total das placentas para as idades de 12, 16, 20 e 24 dias foi respectivamente: 350,0 mm<sup>3</sup>, 854,3 mm<sup>3</sup>, 1370 mm<sup>3</sup> e 2650,0 mm<sup>3</sup>. O volume do labirinto foi 74,05 mm<sup>3</sup>, 249,97 mm<sup>3</sup>, 535,04 mm<sup>3</sup> e 1001,78 mm<sup>3</sup>, respectivamente. O volume da zona juncional foi: 83,35 mm<sup>3</sup>, 287,87 mm<sup>3</sup>, 265,26 mm<sup>3</sup>, 645,07 mm<sup>3</sup>, respectivamente. O volume da decídua foi: 192,60 mm<sup>3</sup>, 316,44 mm<sup>3</sup>, 569,70 mm<sup>3</sup> e 1003,14 mm<sup>3</sup>, respectivamente. Resumidamente, o volume do labirinto de 12 a 16 dias aumentou 237%, de 16 a 20 dias aumentou 114% e de 20 a 24 dias aumentou 87%. O volume da zona juncional de 12 a 16 dias aumentou 245%, de 16 a 20 dias reduziu 8,5% e de 20 a 24 dias aumentou 143%. E, finalmente, o volume da decídua de 12 a 16 dias aumentou 64,3%, de 16 a 20 dias aumentou 80% e de 20 a 24 dias aumentou 76,08%. O volume dos compartimentos placentários de coelho varia de acordo com o período gestacional, e aumentaram continuamente ao longo dos 24 dias gestacionais avaliados, porém, no início do desenvolvimento da placenta a decídua apresentou crescimento mais acelerado, enquanto que após os 20 dias de desenvolvimento, o labirinto desenvolveu-se mais rapidamente, comparando-se à decídua.

**Palavras-chave:** placentação, decídua, labirinto, zona juncional.

**Key words:** *placentation, decidua, labyrinth, junctional zone.*



## **Gossypol promotes degeneration of mice ovarian follicles on short time *in vitro* culture**

*Gossypol promove degeneração de folículos ovarianos de camundongos fêmeas em cultivo in vitro de curta duração*

**Valesca Barreto Luz<sup>1\*</sup>, Carla Michele Pereira de Souza<sup>1</sup>, Ivana Cristina Nunes Gadelha Lelis<sup>1</sup>, Gabriela Liberalino Lima<sup>3</sup>, Luiz Augusto Vieira Cordeiro<sup>1</sup>, Benito Soto-Blanco<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Boa Vista, RR, Brasil.

\*E-mail: valesca\_barreto@hotmail.com

Gossypol is part of the composition of cottonseed, used in animal feed and causes harmful effects on male fertility. Therefore, the objective of this study is to evaluate if there is influence of gossypol in the folliculogenesis, using mice as an experimental. This study was approved by Institucional Animal Care and Use Committee at the UFERSA (process 23091.003576/2014-66). Ovaries (n=32) were obtained from adult female Balb-C Nude mice. One ovary was fixed for 24 hours (*in situ* control) for histological analysis. The other ovaries were cultivated in 24 well cell culture plates containing 1 ml of culture medium ( $\alpha$ -MEM medium supplemented with 2mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/ml bovine serum albumin-BSA and 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid). It was tested four concentrations of gossypol in the medium: 0, 5, 10 and 20  $\mu$ g/mL. Plates were incubated at 39°C and 5% CO<sub>2</sub> for 7 days. After culture, the ovaries were fixed for histological analysis and stained with hematoxylin and eosin. Follicles were classified according to the stage of development as primordial, transition, primary, secondary, or antral; also as viable or atretic. Viable follicles presented a regular shape and well-organized granulosa cells, without signs of atresia. Atretic follicles were characterized by retracted oocytes, a pyknotic nucleus, discontinued basement membrane, and disorganized granulosa cells. A total of 120 follicles were analyzed per treatment and the frequencies of viable and atretic were compared using the Fisher's Exact Test ( $P < 0,001$ ). A total of 62.5% of viable follicles was observed at control group (0  $\mu$ g/mL). A significant reduction of viable follicles was observed after the IVC in all treatments (gossypol concentration of 5, 10 and 20  $\mu$ g/mL was, respectively, 31.8; 29.2 e 21.7%). It demonstrate the toxic effect of gossypol irrespective of the concentration used, leading to a decrease on the percentage of viable follicles. Deleterious effect of gossypol on ovarian follicles may be due to the interaction of cytotoxic and hormonal factors. In conclusion, the gossypol may affect the normal morphology of Balb-C Nude mice ovarian follicles, even in low concentration (5  $\mu$ g/mL), that might interfere in the female fertility.

**Keywords:** follicles, ovary, fertility.

**Palavras-chave:** folículos, ovário, fertilidade.



## **Efeito do ômega 3 e vitamina B12 nas temperaturas com termografia infravermelha da superfície do escroto e globo ocular de ratos Wistar machos**

*Effect of omega 3 and vitamin B 12 on temperatures with infrared thermography of the scrotum surface and ocular globe of male Wistar rats*

**Luci Mara Miura Yamada<sup>1\*</sup>, Camila D. Souza<sup>1</sup>, Paulo Felipe I. Goiozo<sup>1</sup>, Guilherme P. Bastos<sup>1</sup>, Giovana Jose G. Estanho<sup>2</sup>, João Victor R. Amoris<sup>2</sup>, Tânia Mara M. Pereira<sup>2</sup>, Isabela T. Branco<sup>2</sup>, Jailine G. Silva<sup>3</sup>, Lucas Yukio Yamada<sup>2</sup>, Camila Pires Cremasco<sup>4</sup>, Marcelo George Mungai Chacur<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Pós-Graduandos em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente, Prudente, SP, Brasil; <sup>2</sup>Graduandos da UNOESTE; <sup>3</sup>Responsável Técnica (UNOESTE); <sup>4</sup>Docente, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Tupã, SP, Brasil; <sup>5</sup>Docente, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente, Prudente, SP, Brasil.  
\*E-mail: luciyanutri@yahoo.com.br; e-mail: chacur@unoeste.br

A termografia infravermelha é um exame de imagem não invasivo e de acurácia para mensurar a temperatura da superfície do corpo, minimizando o estresse em relação aos demais métodos de aferição de temperatura corpórea. Objetivou-se estudar o efeito da suplementação com ômega 3 (n3) e vitamina B12 (vitB12) na temperatura mensurada por termografia infravermelha nas áreas da bolsa escrotal e globo ocular em ratos Wistar machos. O experimento foi aprovado pela CEUA da Universidade do Oeste Paulista sob o número 2995. Utilizou-se 16 ratos machos Wistar, sexualmente maduros, divididos em 4 grupos, recebendo água e ração *ad libitum* e permaneceram no Biotério da Universidade, em um ciclo de claro e escuro em foto período de 12/12 horas. Diariamente, todos os animais receberam tratamentos com administração de injeção via subcutânea: o Grupo Controle recebeu solução salina; Grupo Ômega, óleo de peixe (Equaliv®) na dose de 1g/kg; Grupo B12, vitB12 (Monovin B12®) na dose de 3µg; Grupo Ômega + B12 receberam óleo de peixe 1g/kg e vitB12 3µg. As variáveis relacionadas à temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram mensuradas diariamente ao iniciar e finalizar os tratamentos com termômetro digital Thermo Hygro TA218C. Durante 7 dias consecutivos entre 7:00 e 8:30h, antes dos tratamentos, os animais eram retirados da caixa, coletava-se a uma distância focal de 30cm imagens termográficas digitais por infravermelho com a câmera FLIR E-40 (Suécia) da bolsa escrotal e globo ocular. Os termogramas foram analisados pelo programa *Flir Tools 2.1*®. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5%. As médias de temperaturas mensuradas com termografia infravermelha para o escroto foram: GControle: 27,2 ± 1,8°C; Gn3: 27,8 ± 2,2°C; GvitB12: 28,5 ± 2,2°C e Gn3VitB12: 27,8 ± 1,8°C. Com relação às médias de temperaturas do globo ocular, os valores foram de: GControle: 33,0 ± 0,9°C; Gn3: 33,8 ± 0,6°C; GvitB12: 33,3 ± 1,0°C e Gn3VitB12: 35,0 ± 0,8°C. A temperatura da superfície do escroto foi superior no grupo da vitamina B12 (P < 0,05), em relação aos demais grupos. Não houve diferenças entre grupos (P > 0,05) para temperaturas do globo ocular. Conclui-se que a vitamina B12 influencia de forma significativa na elevação da temperatura da superfície do escroto em ratos. A termografia infravermelha foi eficaz e prática na mensuração de temperaturas do escroto e globo ocular de ratos.

**Palavras-chave:** roedores, óleo de peixe, cianocobalamina, termograma escrotal.

**Keywords:** rodents, fish oil, cyanocobalamin, scrotal thermogram.



## Primeiro serviço de fêmeas bubalinas após sincronização trinta dias pós-parto

*First service of female's buffalo after synchronization thirty days postpartum*

**Cláudio Coutinho Bartolomeu<sup>1\*</sup>, Antonio Jorge Del Rei<sup>2</sup>, Caio Tácito Alvares<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia Rural e Animal – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; Itapetinga, BA, Brasil;

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais – Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil.

\*E-mail: ccbartol@gmail.com.br

A bubalinocultura tem cada vez mais ganho espaço na pecuária brasileira por sua rusticidade, capacidade de produção e por agregar valor aos seus produtos. A exploração leiteira, principalmente para confecção de queijos, tem buscado melhor eficiência de produção o que pode interferir prolongado o intervalo entre partos, levando a uma baixa eficiência reprodutiva em búfalos. É sabido que os primeiros 90 dias pós-parto são particularmente importantes para a otimização dos processos reprodutivos. As altas concentrações de esteroides placentários e ovarianos durante a fase gestacional tardia têm um impacto no hipotálamo-hipófise e, posteriormente, na recuperação da atividade ovariana. Após acompanhamento da involução uterina observou-se que, não havendo alterações durante o parto, aos trinta dias pós-parto o útero já se apresenta próximo de suas características anteriores à gestação. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi avaliar o emprego de um protocolo de indução do estro para inseminação artificial em tempo fixo iniciando trinta dias pós-parto. Para tanto, foram utilizadas 98 búfalas pesando entre 490-530 kg, com idade entre 3-5 anos, todas clinicamente saudáveis, com parto normal, placenta expulsa normalmente, sem sinais clínicos de endometrite durante todo o período experimental. As búfalas foram divididas em 2 grupos: controle (n = 48) e tratado (n = 50). As Búfalas primíparas e múltíparas foram proporcionalmente distribuídas em ambos os grupos. O grupo tratado, aos trinta dias pós-parto, recebeu um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, onde no D0 foi colocado um dispositivo intravaginal de progesterona e 0,2mg de Gonadorelina, no D7 foram administradas 500UI de eCG e 530mg de cloprostenol sódico. No D8 foi removido o dispositivo intravaginal e no D10 foram aplicados 0,25mg de Gonadorelina e foram inseminadas no D11. Aos 71 dias pós-parto foi realizado o diagnóstico de gestação. As fêmeas diagnósticas vazias foram re-sincronizadas e inseminadas aos 82 dias pós-parto, sendo realizado o diagnóstico de gestação aos 112 dias pós-parto. O grupo controle foi acompanhado com rufião para registro de estro e aquelas fêmeas em estro foram submetidas à cobertura controlada. Durante o período voluntário de espera de 71 dias, no grupo controle, quatro, 8,3% haviam apresentado estro e foram cobertas, e aos 82 dias o número acumulado de 25%, 12 fêmeas haviam apresentado estro, tendo sido cobertas. Ao final dos 112 dias, no grupo controle, 7 fêmeas, 14,58% foram diagnosticadas gestantes. No grupo tratado, aos 71 dias, 26 fêmeas, 52% foram diagnosticadas gestantes e aos 112 dias mais 14 fêmeas foram diagnosticadas gestantes, perfazendo um total de 40 fêmeas gestantes, 80%. Os primeiros trinta dias pós-parto dos ruminantes estão relacionados a um período de balanço energético negativo o que dificulta o restabelecimento da ciclicidade, e após os trinta dias a demanda por energia aumenta até a fêmea atingir o pico de lactação. Como as búfalas atingem o pico de lactação entre 60 e 75 dias pós-parto, o uso de protocolos já aos trinta dias pós-parto contribuiu para se obter resultados satisfatórios, uma vez que foi possível se promover duas inseminações nos primeiros 82 dias pós-parto, obtendo-se uma taxa de concepção acumulada de 80%. Assim, é possível concluir que a utilização de protocolos de IATF a partir dos 30 dias pós-parto contribui efetivamente para diminuir o período de serviço e o intervalo entre partos de fêmeas bubalinas.

**Palavras-chave:** búfalo, IATF, pós-parto.

**Keywords:** buffalo, TAI, post-partum.



## Effect of dimethyl sulfoxide on buffalo sperm motility refrigerated at 5°C

*Efeito do dimetilsulfóxido na motilidade espermática de búfalo refrigerado a 5°C*

**Verónica Alexandra Becerra Becerra<sup>1,\*</sup>, Beatriz Parzewski Neves<sup>2</sup>, Mayara Ferreira Brito<sup>2</sup>, Patricia Alencar Auler<sup>2</sup>, Jaci de Almeida<sup>2</sup>, Marc Henry<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>2</sup>Doutorandos em Ciência Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>3</sup>Professor do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*E-mail: mvz.veronicabecerra@gmail.com

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is an organic solvent with a low molecular weight and is used as a penetrating cryoprotectant or a carrier of substances such as antioxidants for the process of cooling/freezing sperm. The aim of this study was to observe the effect of adding DMSO to buffalo sperm during liquid storage at 5°C with the perspective of adding it as an antioxidant solvent. Semen was collected from six Murrah buffalo bulls maintained continuously on a weekly seminal collection regimen. DMSO was added 5; 0.5; 0.1 and 0.0% (control) to a tris extender containing 10% low density lipoprotein. Characteristics required to proceed cooling was total motility  $\geq 70\%$ , abnormal sperm morphology  $\leq 30\%$  and  $\geq 1 \times 10^9$  sperm cells per ejaculate. Semen was diluted to  $50 \times 10^6$  sperm/ml, cooled (average 0.25°C/min.) and stored at 5°C, for up to 72 hours (h). Sperm motility was evaluated at 0, 24, 48 and 72 h. of storage using a Sperm Class Analyzer SCA@v.4.0. Functional integrity of the sperm membrane was evaluated at 0 and 72 h of storage using a hypo-osmotic stress test (HOST). Progressive motility was better sustained during incubation in all DMSO concentrations at 24 and 72 h., and additionally for 5 % DMSO concentration at 48 h. in comparison to the control extender. Values for progressive motility were  $55 \pm 12$ ,  $53 \pm 10$ ,  $58 \pm 14$ ,  $38 \pm 13$  at 24 h. and  $43 \pm 18$ ,  $39 \pm 14$ ,  $38 \pm 7$ ,  $32 \pm 12$  at 72 h. for DMSO 5%, 0,5%, 0,1% and control treatments ( $P < 0.05$ ), respectively. Sperm curvilinear velocity was better ( $P < 0.05$ ) for control treatment versus all DMSO concentrations at 0 h. ( $110 \pm 13$ ), 24 h. ( $119 \pm 15$ ) and 48 h. ( $110 \pm 12$ ). Straight line velocity and average path velocity was less for DMSO treatments only at 0 h. ( $P < 0.05$ ). Sperm linearity was higher for 0,1% DMSO at 24 h. ( $50 \pm 11$ ), and for 5% DMSO at 48 h. ( $45 \pm 10$ ) ( $P < 0.05$ ). Beat cross frequency was superior ( $P < 0.05$ ) for 0,1% DMSO at 0 h. ( $12 \pm 1$ ), for 5% ( $12 \pm 1$ ) and 0,1% ( $12 \pm 1$ ) at 48 h. versus control treatment at 0 h. ( $10 \pm 1$ ) and 48 h. ( $11 \pm 1$ ). Total motility and rapid sperm was not affected by the presence of DMSO ( $P > 0.05$ ). Average HOST for fresh semen was  $87 \pm 8$ , values at 72 h. for 5%, 0,5%, 0,1% DMSO and control treatments was  $53 \pm 9$ ,  $53 \pm 8$ ,  $46 \pm 4$  and  $50 \pm 3$  respectively. Functional integrity of the sperm membrane was better preserved by the presence of 5% and 0,5% DMSO at 72 h., ( $P < 0.05$ ). It can be concluded that adding DMSO to an extender, even in very low concentrations, affects the pattern of buffalo sperm motility such as progressive motility, sperm linearity and beat cross frequency during incubation at 5°C. Special care should be taken to interpret the effect of other components added to the extender when DMSO is used as carrier.

**Keywords:** cryopreservation, extenders, antioxidant, spermatozoa.

**Palavras-chave:** criopreservação, meios diluidores, antioxidante, espermatozoide.

The authors would like to thank to INCT da Pecuária, FAPEMIG and CNPq.



## Effect to cysteamine and $\beta$ -mercaptoethanol on *in vitro* culture of buffalo embryos

*Efeito da cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol no cultivo in vitro de embriões bubalinos*

**Vanessa Cunha de Brito<sup>1,\*</sup>, Nathália Nogueira da Costa<sup>2</sup>, Eduardo Baia de Souza<sup>1</sup>, Mauro Andrey Rodrigues Moraes<sup>1</sup>, Marcielly de Fátima da Costa Lobato<sup>1</sup>, Moisés Moreira Lima<sup>1</sup>, Marcela da Silva Cordeiro<sup>3</sup>, Thiago Velasco Guimarães<sup>4</sup>, Arnaldo Algaranhar Gonçalves<sup>5</sup>, Henry Daniel Manrique Ayala<sup>5</sup>, Simone do Socorro Damasceno Santos<sup>6</sup>, Otávio Mitio Ohashi<sup>6</sup>,**

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil; <sup>2</sup>Bolsista da Capes Projeto 88881.0681/2014-01,

<sup>3</sup>Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará; <sup>4</sup>Professor da escola da aplicação da UFPA, Belém, PA, Brasil; <sup>5</sup>Bolsista do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPA, Belém, PA, Brasil; <sup>6</sup>Professor

Titular da Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

\*E-mail: vanessacunhadebrito@outlook.com

The efficiency of *in vitro* embryo production is associated with several factors that depend on both oocytes and embryo culture systems. When working with embryo production systems, in which oocytes and embryos undergo *in vitro* conditions, the production of ROS (reactive oxygen species) is highly accentuated. This is because excessive manipulation, exposure to sources of light and heat, presence of spermatozoa and especially high oxygen is commonly found on *in vitro* cultures, that increases the ROS production. Thus, suboptimal culture conditions may represent one of the main reasons for the low rates of PIVE in buffaloes and one of the main factors that can reduce the efficiency of oocyte and embryo culture systems *in vitro* is oxidative stress. For *in vitro* production the buffalo ovaries were obtained from local slaughterhouse and in the laboratory, the CCOs were selected and fertilized 20 hours after maturation. Approximately 24 hours after IVF, the probable zygotes were transferred to drops with SOF medium ("Synthetic fluid oviduct") according to the following experimental groups: Control group (SOF medium without the addition of no antioxidant agents)  $\beta$ -ME group (SOF medium plus 50 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol); 25 Cys Group (SOF medium plus 25  $\mu$ M cysteamine); 50 Cys group (SOF medium plus 50  $\mu$ M cysteamine). The embryos were cultured for six days. The cleavage was analysed on day 2, blastocyst rate and total number of embryonic cells on day 6. The embryonic development and embryo quality were analyzed by ANOVA, using Bio Estat program 5.0 with a significance level of 5%. There was no significant difference in relation to the Blastocyst, Cleavage and Blastocyst/Cleaved rates on the sixth day between the Control Group and the other experimental groups and neither of them. There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) in the qualitative evaluation about total number of cells between the 25  $\mu$ M cysteamine ( $267.5 \pm 39.9$ ) and  $\beta$ -mercaptoethanol groups ( $173.25 \pm 60.5$ ). The first showing a higher number of cells than the second, showing the superior quality of the embryos cultured with 25  $\mu$ M of cysteamine. Our results suggest that the best concentration of cysteamine to be added in buffalo embryo culture media is 25  $\mu$ M. Moreover, the use of cysteamine as an antioxidant in the *in vitro* embryo culture system is the best alternative when compared to the use of  $\beta$ -mercaptoethanol in relation to embryonic quality.

**Palavras-chave:** cisteamina,  $\beta$ -mercaptoetanol, *bubalus bubalis*, produção *in vitro* de embriões.

**Keywords:** cysteamine,  $\beta$ -mercaptoethanol, *bubalus bubalis*, *in vitro* production of embryos.





## **DNA viral do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em Complexos *Cumulus Oophorus* e capacidade de maturação nuclear em ovócitos oriundos de vacas naturalmente infectadas**

*Viral DNA of Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) in Cumulus Oophorus Complexes and nuclear maturation capacity in oocytes from naturally infected cows*

**Vívian Rachel de Araújo Mendes<sup>1</sup>, Eduardo Paulino da Costa<sup>2,\*</sup>, Vanessa Lopes Dias Queiroz<sup>1</sup>, Abelardo Silva Júnior<sup>2</sup>, José Domingos Guimarães<sup>2</sup>, Saullo Vinicius Pereira Alves<sup>3</sup>, Caroline Gomides Ribeiro<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Doutorandas em Medicina Veterinária – Departamento de Veterinária (DVT)/Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Professores do DVT/UFV, Viçosa, MG, Brasil; <sup>3</sup>Mestrando em Medicina Veterinária DVT/UFV, Viçosa, MG, Brasil; <sup>4</sup>Bolsista de Iniciação Científica DVT/UFV, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), está praticamente presente em rebanhos bovinos de todo o mundo. Trata-se de uma relevante doença, tendo em vista os transtornos reprodutivos causados, a facilidade de disseminação e o difícil controle. O objetivo deste estudo foi verificar a presença do DNA viral em Complexos *Cumulus Oóforus* (COCs) e sangue e avaliar a capacidade de desenvolvimento de ovócitos oriundos de vacas soropositivas infectadas naturalmente pelo BoHV-1. A taxa de maturação nuclear de ovócitos foi avaliada em vacas não vacinadas soronegativas e soropositivas contra este agente viral. Os grupos experimentais foram definidos a partir do título de anticorpos detectados pela soroneutralização em microplacas, sendo estabelecidos quatro tratamentos: animais negativos (título menor do que 2); título baixo (2 a 8); título médio (16 a 32) e título elevado (64 a 512). Os COCs foram obtidos de 15 doadoras durante 22 sessões de Aspirações Foliculares Guiadas por Ultrassom. A extração do DNA viral foi realizada em um *pool* de COCs de todas as aspirações e também de amostras de sangue. Após este procedimento, seguiu-se a realização das reações de *Nested-PCR*. Para avaliação da taxa de maturação nuclear, foram selecionados para o cultivo *in vitro* somente os COCs com camada compacta de células do *cumulus*, zona pelúcida íntegra e citoplasma homogêneo. Após 24 horas de cultivo, os ovócitos foram fixados e corados em lâmina. O estágio do ciclo celular meiótico foi avaliado, por meio de um microscópio óptico com aumento de 1000X em imersão. Foi considerado maduro o ovócito que atingiu o estágio de metáfase II. Os animais que apresentaram titulação média (16 a 32) e titulação elevada (64 a 512) apresentaram comprometimento ( $P < 0,05$ ) na taxa de maturação nuclear ovocitária (48,4 e 50,9%, respectivamente) quando comparados aos animais controle (76,7%). O DNA do BoHV-1 foi identificado no *pool* de COCs doadoras soropositivas, não sendo detectado em nenhuma das amostras negativas. Entretanto, não foi encontrado DNA viral nas amostras sanguíneas, mesmo em animais soropositivos. Todas as amostras de sangue e COCs foram submetidas a *Nested-PCR* para a detecção do BoHV-5, não sendo encontrado nenhum resultado positivo. Diante dos resultados encontrados conclui-se que vacas infectadas naturalmente pelo BoHV-1 apresentam comprometimento na taxa de maturação nuclear, dependendo do grau de titulação contra o vírus. Ademais, o DNA viral pode estar presente em estruturas ovarianas contrariando a hipótese de que animais sorologicamente positivos e sem sintomatologia clínica seriam improváveis de terem seus órgãos genitais acometidos pela infecção do BoHV-1. Apoio financeiro: FAPEMIG.

**Palavras-chaves:** herpesvírus bovino 1, ovócito, maturação nuclear.

**Keywords:** *bovine herpesvirus 1, oocytes, nuclear maturation.*



## Comparação da produção *in vitro* e conteúdo lipídico de embriões *Bos indicus* cultivados com ou sem forskolin

*Comparison of the in vitro production and lipid content of Bos indicus embryos grown with or without forskolin*

Camila Bortoliero Costa<sup>1</sup>, Paula Alvares Lunardelli<sup>1</sup>, Camila Oliveira Rosa<sup>1</sup>, Camila Bizarro da Silva<sup>1</sup>,  
Lahys Tuigui Diniz<sup>2</sup>, Andressa Crêscencio<sup>2</sup>, Marcelo Marcondes Seneda<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduando em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, PR; <sup>2</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, PR; <sup>3</sup>Professor adjunto do departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

\*E-mail: marcelo.seneda@gmail.com

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) possui destaque no cenário mundial, com a crescente comercialização destes, torna-se necessária sua criopreservação. Porém este procedimento apresenta-se como uma das áreas com os maiores desafios devido a inconstância de resultados. Esta baixa eficiência nos processos de criopreservação de embriões *in vitro* pode estar relacionada com diferentes fatores, como a maior concentração de lipídeos presentes em embriões *in vitro* comparado aos embriões *in vivo*, meios utilizados no cultivo *in vitro*, diferenças no metabolismo celular e diferenças entre embriões derivados de animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da adição de Forskolin no cultivo *in vitro* na taxa de produção *in vitro* de embriões *Bos indicus* e comparar com a concentração lipídica destes embriões pela técnica de coloração Preto Sudão B. Para a PIVE foram utilizados ovários (n = 420) de 210 fêmeas Nelore, coletados de abatedouro local e transportados em solução salina a 30-35° C até o laboratório. Os oócitos recuperados foram maturados *in vitro*, fertilizados *in vitro* utilizando sêmen de um único touro previamente testado, e posteriormente cultivados *in vitro*. Considerando o dia da fertilização como dia 0 (D0), no dia 5 (D5) de cultivo os prováveis zigotos foram divididos em dois grupos experimentais: grupo Controle (sem adição de Forskolin) e grupo Forskolin (adição de 10 µM de Forskolin). As taxas de blastocisto e eclosão foram avaliadas em D7, D9 e D10. Para a avaliação da concentração lipídica, foram coletados blastocistos (D7; n=10 por grupo) e corados com a técnica de coloração Preto Sudão B. A análise estatística dos dados de PIVE foi realizada pelo teste de regressão logística. Os dados de conteúdo lipídico foram analisados por ANOVA, seguido do teste Tukey. As taxas de blastocisto entre os grupos, foram 50,7 % (177/349) no grupo Controle e 45,4 % (164/361) no grupo Forskolin (p>0,05). A concentração lipídica nos tratamentos foram de 883 no grupo Controle e 772 no grupo Forskolin (p>0,05); concentração lipídica/área (X10-10/µm<sup>2</sup>) e lipídica/volume (X10-13/µm<sup>3</sup>) foi de 1,1±0,8 e 0,9±0,7 no grupo Controle e 5,4±4,7 e 4,3±4,0 no grupo Forskolin (p>0,05). Como conclusão, não houve diferença entre as taxas de blastocisto e de eclosão de embriões *Bos indicus* produzidos *in vitro* tratados ou não com Forskolin. Da mesma forma, a concentração lipídica dos embriões submetidos ao cultivo *in vitro* sem qualquer substância ou com a adição de Forskolin mostrou-se constante.

**Palavras-chave:** embriões *in vitro*; forskolin; lipídeos.

**Keywords:** *embryos in vitro*; *forskolin*; *lipids*.

## **Avaliação morfológica e detecção de apoptose em embriões bovinos produzidos *in vitro* com adição de diferentes suplementos nos meios de maturação e de cultivo**

*Morphologic evaluation and apoptosis detection in in vitro produced bovine embryos with the addition of different supplements in maturation and culture media*

**Elena Carolina Serrano Recalde<sup>1\*</sup>Tatícia Lih Ikeda<sup>1</sup>, Lais do Nascimento Cintra<sup>1</sup>, Mateus Sudano<sup>2</sup>,  
Fernanda da Cruz Landim<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brasil.

\*E-mail: caritos1000@hotmail.com

A morte celular pode estar relacionada com a qualidade embrionária. Em embriões produzidos *in vitro* a apoptose pode ser aumentada de acordo com variações na composição do meio de cultura. Uma das possíveis causas de apoptose nesse caso, pode ser a falta de fatores de crescimento como IGF-I ou II e hormônios. Este estudo teve como objetivo comparar os efeitos da adição de soro fetal bovino (SFB), polivinil-alcool (PVA) ou fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), durante as etapas de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) sobre o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e índice de apoptose. COCs (n=20/ gota) graus I e II obtidos de ovários de abatedouro foram selecionados e maturados *in vitro* em TCM199 (suplementados com piruvato, hormônios e antibiótico) com a adição de 10% de SFB (SFB), 3 mg/mL PVA (PVA), ou 100 ng/mL de IGF-1 (IGF). A MIV foi realizada em placas Petri com gotas de 90 µL, cobertas com óleo mineral e incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C por 22 a 24 horas. Os oócitos maturados foram fertilizados com 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e incubados durante 18 horas. Os prováveis zigotos foram CIV em meio SOFaa base (2.7 mM mioinositol, 0.2 mM piruvato, 5 mg/mL BSA, 100 µg/mL estreptomicina, 100 UI/mL penicilina, e 85 µg/mL amicacina) com a respectiva adição de: 2,5% de SFB (SFB), 3 mg/mL de PVA (PVA) ou 100 ng/mL de IGF-1 (IGF) por sete dias em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas após 48 e 168 horas pós-inseminação (hpi), respectivamente. Blastocistos, blastocistos expandidos e eclodidos (n=210) foram submetidos à técnica de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit with Fluorescein, Roche®, Mannheim, BW, Germany) de acordo com a técnica adaptada por (Paula-Lopes, Hansen, 2002. *Biol. of Reprod.*, 66:1169–1177), e avaliados sob microscópio invertido de epifluorescência. A fluorescência de núcleos de cor verde foi considerada com fragmentação do DNA. O delineamento foi do tipo fatorial 3x3 (três suplementos da MIV e três no CIV), com total de 9 grupos experimentais (n=120 oócitos/grupo). Foram realizadas 6 rotinas. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) do modelo PROC GLM do software estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias. A taxa de clivagem foi similar (p > 0,05) para todos os grupos. As maiores taxas de produção de blastocisto foram dos grupos SFB-SFB (35,05 %± 4,26), PVA-SFB (32,58% ± 4,26), e IGF-SFB (25,67% ± 4,26), seguidos de PVA-IGF (17,48% ± 4,26). Os grupos: SFB-PVA, SFB-IGF, PVA-PVA, IGF-PVA e IGF-IGF, tiveram a menor produção, com menos de 15% de blastocisto. Na análise do Tunel, o grupo PVA-PVA (1,83% ± 0,34) seguido de SFB-PVA (1,44% ± 0,38) obtiveram maior percentagem de apoptose em comparação com SFB-SFB, PVA-SFB e PVA-IGF, os mesmos que obtiveram de 0,39% ± 0,23 a 0,87% ± 0,30 de apoptose. Os grupos, SFB-IGF, IGF-SFB, IGF-PVA e IGF-IGF obtiveram valores intermediários de 1% ± 0,44 a 1,21% ± 0,44. A utilização de macromoléculas como PVA ou IGF-1 durante a maturação oocitária permite obter taxas de blastocisto e qualidade embrionária semelhantes à utilização de SFB. Porém, a ausência de SFB durante a etapa de CIV se mostrou deletéria para a produção embrionária.

**Palavras-chave:** IGF-1, desenvolvimento embrionário, Tunel, morte celular.

**Keywords:** *IGF-1, embryonic development, Tunel, cell death.*



## **Efeito da senescência reprodutiva sobre aspectos morfo-funcionais do sêmen fresco e criopreservado de cães**

*Effect of reproductive senescence on morpho-functional features of fresh and cryopreserved sperm in dogs*

**Máira Morales Brito<sup>1\*</sup>, Daniel de Souza Ramos Angrimani<sup>1</sup>, Bruno Rogério Rui<sup>1</sup>, Giulia Kiyomi Vecchiato Kawai<sup>1</sup>, Nicolle Gilda Teixeira Queiroz-Hazarbassanov<sup>2</sup>, João Diego Agostini Losano<sup>1</sup>, Renata Azevedo de Abreu<sup>1</sup>, Cristina de Oliveira Massoco<sup>2</sup>, Marcílio Nichi<sup>1</sup>, Camila Infantsi Vannucchi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, FMVZ USP, São Paulo, SP, Brasil.

\*E-mail: maira.brito@usp.br

O presente estudo objetivou comparar a qualidade e congelabilidade espermática de cães jovens e senis. Foram selecionados 22 cães, alocados em dois grupos experimentais de acordo com a idade: Grupo Jovem (n=11 – 1 a 5 anos de idade - média de 2,3 anos) e Grupo Senil (n=11 – 7 a 13 anos de idade - média de 8,9 anos). Os grupos foram adicionalmente subdivididos em Grupo Sêmen Fresco e Grupo Sêmen Criopreservado (em etapa única e descongelação a 37°C por 30 segundos). O sêmen fresco foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume, cor e aspecto e quanto à concentração espermática e o macho foi avaliado quanto ao escore de libido. Foram realizadas as seguintes avaliações morfo-funcionais: análise computadorizada da motilidade (CASA), morfologia espermática, atividade mitocondrial dos espermatozoides, avaliação do potencial de membrana mitocondrial espermática, avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal e fragmentação de DNA espermático. Os dados foram avaliados por Teste T Student ou Wilcoxon ( $P \leq 0,05$ ). Como resultado, os machos jovens apresentaram maior escore de libido. No sêmen fresco, os cães jovens apresentaram menor porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial do que cães senis ( $3,56 \pm 1,42$  e  $33,70 \pm 8,94$ , respectivamente). O sêmen descongelado de cães jovens apresentou maior porcentagem de integridade de membrana acrossomal do que os senis ( $90,0 \pm 1,43$  e  $81,18 \pm 1,97$ ). Independentemente do processamento, o sêmen de cães senis apresentou maior porcentagem de defeitos espermáticos maiores ( $34,18 \pm 6,82$  e  $5,55 \pm 0,81$ , respectivamente) e, conseqüentemente, defeitos espermáticos totais ( $38,41 \pm 6,68$  e  $8,18 \pm 1,13$ , respectivamente), sendo o principal defeito encontrado a gota citoplasmática próximal ( $28,68 \pm 7,21$  e  $0,68 \pm 0,2$ , respectivamente) do que de cães jovens. As amostras frescas apresentaram maior porcentagem de integridade de membrana acrossomal do que de sêmen descongelado tanto no sêmen do Grupo Jovem ( $97,36 \pm 1,25$  e  $90,0 \pm 1,43$ , respectivamente) quanto do Grupo Senil ( $95,0 \pm 1,18$  e  $81,18 \pm 1,97$ , respectivamente). No Grupo Senil, as amostras frescas apresentaram maior porcentagem de alto potencial de membrana mitocondrial do que as descongeladas ( $33,7 \pm 8,94$  e  $5,28 \pm 1,79$ , respectivamente). Independentemente da divisão etária, diversas variáveis foram superiores no sêmen fresco do que no descongelado, tais como velocidade média da trajetória, velocidade linear, frequência de batimento flagelar cruzado, linearidade, motilidade, motilidade progressiva e motilidade em velocidade rápida, assim como menores valores de amplitude de deslocamento lateral de cabeça e espermatozoides estáticos em comparação com o sêmen descongelado. Ainda, o sêmen fresco apresentou maiores valores de integridade de membrana plasmática ( $85,55 \pm 3,41$  e  $40,05 \pm 4,87$ , respectivamente) e alta atividade mitocondrial ( $86,73 \pm 2,17$  e  $74,64 \pm 2,63$ , respectivamente) em comparação com o sêmen descongelado. A partir de tais resultados, é possível concluir que o sêmen de cães senis apresenta qualidade inferior ao de cães jovens, bem como reduzida congelabilidade. Nos cães senis, possivelmente, a falha na eliminação da gota citoplasmática dos espermatozoides promova disfunções mitocondriais, culminando na alteração da motilidade espermática.

**Palavras-chave:** espermatozoides, senescência reprodutiva, gota proximal, Criopreservação.

**Keywords:** sperm, reproductive senescence, proximal droplet, cryopreservation.



## **Crioresistência espermática de cães: uma abordagem por análise de *cluster***

*Dog sperm crioresistence: an approach by cluster analysis*

**Laiza Sartori de Camargo, Camila de Paula Freitas Dell'aqua, Rubia Schmith, Priscilla Nascimento Guasti, Cristiane Sella Paranzini, Fabiana Ferreira de Souza\***

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

\*E-mail: fafesouza@fmvz.unesp.br

O presente estudo visou realizar análise espermática *in vitro* do sêmen de cães nos momentos pré e pós-descongelamento e agrupá-los de acordo com a qualidade espermática e congelabilidade. Foram utilizados 20 ejaculados de 10 cães, avaliados pré e pós-descongelamento quanto à cinética espermática (CASA, *Computer Assisted Semen Analysis*), integridade de membrana plasmática, do acrossomo e potencial mitocondrial em citômetro de fluxo. Após a avaliação, o sêmen foi centrifugado e o plasma seminal descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em meio Tris-frutose contendo 8% de glicerol, a amostra envasada em palhetas francesas de 0,5 mL, numa concentração de  $100 \times 10^6$ /mL, e criopreservadas (equilíbrio de 1 hora e congelamento por 20 minutos). Para análise estatística multivariada utilizou-se o software MetaboAnalyst 2.0, considerando as variáveis de cinética espermática, potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e de acrossomo. A PCA (*principal component analysis*) identificou 3 *clusters*, representados pelo *cluster low* (L) (n = 4), *medium* (M) (n = 6) e *high* (H) (n = 10). A soma dos eixos (componente 1 e componente 2) foi de 57,9 % representando a significância da divisão dos *clusters*. Pelo *VIP score* (*variable importance in projection*) as variáveis mais relevantes (VIP score >1,0) em ordem de importância para classificação dos *clusters* foram células estáticas (>no *cluster* L), espermatozoides rápidos (>no *cluster* H), motilidade progressiva (>no *cluster* H), motilidade total (>no *cluster* H), espermatozoides lentos (>no *cluster* L), integridade de membrana plasmática e acrossomo e alto potencial mitocondrial (>no *cluster* L), espermatozoides com velocidade média e potencial mitocondrial baixo (>no *cluster* L). A diferença estatística entre os *clusters* pré e pós-descongelamento também foi analisada por ANOVA. Os parâmetros avaliados pré-congelamento foram semelhantes em todos os *clusters*, contudo após a descongelamento, motilidade total, motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides rápidos, integridade de membrana plasmática, do acrossomo e potencial mitocondrial foram inferiores no *cluster* L. Concluiu-se que é possível classificar e agrupar ejaculados de cães de acordo com a crioresistência, e os principais parâmetros considerados estão relacionados à velocidade e motilidade espermática. Além disso, esta análise pode identificar amostras com maior crioresistência, sugerindo aquelas ideais para aplicação em outras técnicas de reprodução assistida.

**Palavras-chave:** criopreservação, canino, espermatozoide.

**Keywords:** *criopreservation, canine, spermatozoa.*



## Viabilidade de células germinativas após vitrificação do tecido testicular de gatos domésticos

*Viability of germ cells after vitrification of the testicular tissue of domestic cats*

**David Baruc Cruvinel Lima<sup>1,\*</sup>, Annice Aquino-Cortez<sup>1</sup>, Ticiano Franco Pereira da Silva<sup>2</sup>, Lúcia Daniel Machado da Silva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pós-Graduandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; <sup>2</sup> Professoras da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

\*E-mail: davidbarucvet@gmail.com

A manutenção da viabilidade de células germinativas após conservação a baixas temperaturas apresenta-se como um dos maiores desafios na reprodução de felinos. A vitrificação tem surgido como alternativa para criopreservar o material genético desses animais, entretanto, os protocolos para utilização dessa biotecnologia na reprodução de espécies felinas não estão estabelecidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes associações de crioprotetores sobre a viabilidade das células germinativas após a vitrificação do tecido testicular de gatos impúberes. Foram utilizados 5 pares testiculares e obtidos 4 fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> de cada par. Os fragmentos foram distribuídos no grupo controle ou grupos experimentais contendo as associações dos crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO)/glicerol (GLI), DMSO/etilenoglicol (EG) ou EG/GLI. Para a vitrificação dos grupos experimentais, os fragmentos foram submetidos inicialmente à solução de equilíbrio (1,8mL - volume total) contendo 1,4 mol/L de cada crioprotetor, adicionados de 0,25 mol/L de sacarose e meio essencial mínimo (MEM) durante 10 minutos à temperatura ambiente (~ 22°C). Em seguida, foram submetidos à solução de vitrificação (1,8 mL - volume total), contendo 2,8 mol/L de cada crioprotetor, adicionados de 0,50 mol/L de sacarose, MEM e 0,18 mL de soro fetal bovino (SFB) durante 5 minutos à temperatura ambiente (~ 22°C), totalizando uma concentração final de crioprotetores de 5,6 mol/L na solução de vitrificação. Em seguida, cada fragmento foi submetido à vitrificação por superfície sólida e mantidos em N<sub>2</sub> líquido por no mínimo 1 semana. Os fragmentos foram aquecidos e submetidos a banhos de imersão em soluções decrescentes de sacarose durante 5 minutos cada para remoção dos crioprotetores. Após, os fragmentos testiculares foram alocados em placas de Petri contendo uma solução de recuperação celular composta por MEM e SFB. Em seguida, foram macerados e a solução obtida foi filtrada em malha de 100 µm e centrifugada a 300g por 5 minutos. Após fixação da solução em glutaraldeído foram adicionadas as sondas fluorescentes SYBR-14 (0,5µL) e iodeto de propídio (2,5µL) e a amostra permaneceu em câmara escura durante 15 minutos. Em seguida, 10µL da amostra foi utilizada para preparo das lâminas. Foram contadas 200 células de cada amostra em microscópio de epifluorescência no aumento de 40x. Os dados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As proporções encontradas foram submetidas ao teste T para comparação entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos quando P < 0,05. O grupo controle (91,8%) foi superior aos grupos DMSO/EG (46,1%) e EG/GLI (45,2%), todavia, não diferiu do grupo DMSO/GLI (68,8%). Entre os grupos vitrificados, o DMSO/GLI foi superior ao DMSO/EG e ambos não diferiram do grupo EG/GLI. Os fragmentos testiculares de gatos domésticos impúberes conseguem manter a viabilidade de células germinativas após o processo de vitrificação e a associação DMSO/GLI exerce menos efeitos deletérios ao tecido testicular vitrificado.

**Palavras-chave:** testículo, crioprotetor, felino.

**Keywords:** testicles, cryoprotectants, feline.



## Diferentes tempos de *Holding Time* não interferem no estresse oxidativo do sêmen suíno pós-descongelamento

*Different periods of Holding Time does not impact on the oxidative stress of the post-thawed boar semen*

**Rafaella Fernandes Carnevale<sup>1</sup>, Matheus Saliba Monteiro<sup>1</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>, Bruno Bracco Donatelli Muro<sup>1</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, Marina da Silva Passarelli<sup>1</sup>, Frederico Ozanan Papa<sup>2</sup>, Marco Antônio Alvarenga<sup>2</sup>, José Antônio Dell' Aqua Junior<sup>2</sup>, Flávio Vieira Meirelles<sup>3</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>3</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: andrefc@usp.br

Durante a criopreservação do sêmen, há geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam um estado de estresse oxidativo, culminando em crioinjúrias. O *holding time* (HT) é o período em que os espermatozoides ficam em contato com plasma seminal, à 17 °C, antes de serem submetidos à criopreservação. Essa interação com o plasma diminui as crioinjúrias, aumentando dessa forma a viabilidade espermática pós-descongelamento. O objetivo do experimento foi avaliar se diferentes tempos de HT afetam o estresse oxidativo provocado pela criopreservação. Foi realizada a coleta da fração rica de 3 ejaculados de 5 cachacos (n=15). Depois de realizadas as análises *in natura*, o sêmen foi diluído em BTS na proporção 1:2 (sêmen:diluidor) e então divididos nos seguintes tempos de *Holding Time*: HT0 (0 hrs), HT4 (4 hrs), HT8 (8 hrs), HT12 (12 hrs), HT24 (24 hrs), HT28 (28 hrs) e HT32 (32 hrs). Após decorrido o tempo de HT as amostras foram centrifugadas (2400 g/3 min), o sobrenadante (BTS e plasma seminal) foi desprezado e o pellet suspenso em diluidor para congelamento de sêmen suíno à base de gema de ovo (BotuSui<sup>®</sup> – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) na concentração de 600 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml e criopreservadas em sistema automático (TK Tecnologia em Congelamento<sup>®</sup>, Uberaba-MG, Brasil). As amostras foram descongeladas à 37°C e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri c6-Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) através do uso da sonda DHE. Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc., 2010) e submetidos à análise dos modelos mistos. Diferenças foram consideradas significativas quando P < 0,05 e os resultados foram apresentados em média ± EPM. Não houve diferença estatística (P < 0.05) entre os diferentes tempos de HT para os níveis de produção do ânion superóxido (521,32 ± 52,42; 683,25 ± 101,49; 882,96 ± 95,27; 817,53 ± 126,96; 884,5 ± 124,46; 833,61 ± 124,08; 839,54 ± 123,56, para HT0, HT4, HT8, HT12, HT24, HT28, HT32 respectivamente). Os níveis de produção de EROs pelos espermatozoides suínos durante a criopreservação são baixos, o que explica os resultados encontrados. O ânion superóxido possui uma meia-vida curta, sendo rapidamente convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; além disso, esse ânion apresenta alta polaridade, o que dificulta a sua entrada em células com membrana plasmática íntegra. Outros estudos demonstram que os EROs produzidos durante a criopreservação do sêmen suíno possuem pouca ação deletéria sobre a célula espermática e que o HT não interfere no estresse oxidativo seminal. Logo, diferentes tempos de *Holding Time* não interferem na produção do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) durante o processo de criopreservação.

**Palavras- chave:** *Holding time*, criopreservação, sêmen, suíno, estresse oxidativo.

**Keywords:** *Holding time, cryopreservation, semen, boar, oxidative stress.*

**Agradecimentos:** Fapesp 2015/17620 7 e 2016/09441-8.

## A integridade das membranas plasmática e acrossomal é melhor preservada em protocolos de *one-step* para criopreservação do sêmen suíno com a utilização de longos períodos de *holding time*

*Plasma and acrosome membranes are better preserved in one-step boar semen cryopreservation protocols using long periods of holding time*

**Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>, Matheus Saliba Monteiro<sup>1</sup>, Bruno Bracco Donatelli Muro<sup>1</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, Marina da Silva Passarelli<sup>1</sup>, Rafaella Fernandes Carnevale<sup>1</sup>, Frederico Ozanan Papa<sup>2</sup>, Marco Antônio Alvarenga<sup>2</sup>, José Antônio Dell' Aqua Junior<sup>2</sup>, Flávio Vieira Meirelles<sup>3</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa em Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>3</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: andrefc@usp.br

A membrana dos espermatozoides suínos é a mais rica em ácidos graxos poliinsaturados dentre as espécies domésticas, o que deixa esses espermatozoides mais sensíveis aos danos causados pela criopreservação. Para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação, é utilizado o *Holding Time* (HT), que é o período em que os espermatozoides ficam em contato com o próprio plasma seminal a 17 °C antes de serem submetidos a criopreservação. Isso possibilita que o sêmen fique em contato com diversos componentes do plasma seminal, permitindo a estabilização da arquitetura lipídica da membrana plasmática, melhorando a capacidade do espermatozoide em suportar o choque térmico durante a congelação/descongelação. O objetivo do experimento foi avaliar o efeito de diferentes tempos de HT na integridade das membranas plasmática e acrossomal. Foi realizada a coleta da fração rica de 3 ejaculados de 5 cachasos (n=15). Depois de realizadas as análises *in natura*, o sêmen foi diluído em BTS na proporção 1:2 (sêmen:diluidor) e então divididos nos seguintes tempos de *Holding Time*: HT0 (0 hrs), HT4 (4 hrs), HT8 (8 hrs), HT12 (12 hrs), HT24 (24 hrs), HT28 (28 hrs) e HT32 (32 hrs). Após decorrido o tempo de HT as amostras foram centrifugadas (2400xg/3 min), o sobrenadante (BTS + plasma seminal) foi desprezado e o *pellet* suspenso em diluidor para congelação de sêmen suíno à base de gema de ovo (BotuSui<sup>®</sup> – Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) na concentração de 600 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml e criopreservadas em sistema automático (TK Tecnologia em Congelamento<sup>®</sup>, Uberaba-MG, Brasil). As amostras foram descongeladas à 37°C e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6-Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) através do uso das sondas Iodeto de propídeo/PSA-FITC. Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc., 2010) e submetidos à análise dos modelos mistos. Diferenças foram consideradas significativas quando P < 0,05 e os resultados foram apresentados em média ± EPM. Para a integridade de acrossoma 32 horas de HT foi melhor (P < 0,05) que 0, 4, 8 e 12 horas (9,29 ± 1,24<sup>d</sup>; 16,81 ± 2,03<sup>c,d</sup>; 20,16 ± 2,30<sup>b,c</sup>; 19,94 ± 2,21<sup>b,c</sup>; 28,99 ± 3,11<sup>a,b</sup>; 27,71 ± 2,23<sup>a,b</sup>; 29,78 ± 2,85<sup>a</sup> para HT0, HT4, HT8, HT12, HT24, HT28, HT32 respectivamente). Já para a integridade de membrana plasmática, o HT32 foi melhor (P < 0,05) que 0 e 4 horas de HT (15,11 ± 1,63<sup>b</sup>; 21,49 ± 1,86<sup>b</sup>; 22,92 ± 2,10<sup>a,b</sup>; 22,13 ± 1,28<sup>a,b</sup>; 27,87 ± 2,31<sup>a,b</sup>; 27,47 ± 1,75<sup>a,b</sup>; 29,63 ± 2,36<sup>b</sup> para HT0, HT4, HT8, HT12, HT24, HT28, HT32 respectivamente). Portanto, quando levamos em consideração a integridade das membranas plasmática e acrossomal, devemos optar por tempos de HT entre 24 e 32 horas, para obtenção de melhores resultados em protocolos de *one-step* para criopreservação do sêmen suíno.

**Palavras chave:** criopreservação, sêmen, suíno, membrana plasmática, acrossoma.

**Keywords:** *cryopreservation, semen, boar, plasma membrane, acrosome.*

**Agradecimentos:** FAPESP 2015/17620-7, 2016/09441-8.





## **Influência do plasma seminal sobre a fertilidade do espermatozoide suíno**

*Influence of seminal plasma on fertility of boar spermatozoa*

**Marina da Silva Passarelli\*, Mariana Andrade Torres, Gisele Mouro Ravagnani, Diego Feitosa Leal, Simone Maria Massami Kitamura Martins, Bruno Bracco Donatelli Muro, Matheus Saliba Monteiro, Ana Paula Pavaneli, André Furugen Cesar de Andrade**

Núcleo de Pesquisa em Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: andrefc@usp.br

A refrigeração seminal apresenta-se aplicada de forma majoritária dentro dos programas reprodutivos na produção suinícola moderna, devido ao fato de oferecer uma garantia de um armazenamento prolongado do sêmen então processado. A queda no desempenho fértil dos espermatozoides pode ser observada quando há um contato por períodos prolongados entre a célula espermática e o plasma seminal (PS). Estudos demonstram que o PS pode não ser o melhor meio para a conservação dos espermatozoides suínos por períodos até 72 horas após a coleta. O presente trabalho estudou a influência que o PS pode exercer perante a capacidade de fertilidade do espermatozoide suíno. Utilizou-se 20 marrãs pré-púberes, sendo estas divididas em dois grupos, contendo cada qual 10 animais. Coletou-se a fração rica de dois cachacos, realizando um *pool*, sendo este então processado e separado em duas alíquotas denominadas como controle (CON) e sem plasma seminal (SPS), que foram então diluídas e submetidas a 90 minutos de bancada, protegidas de luz, sendo tais doses condicionadas à temperatura de 17°C por um período de 72 horas. Para a sincronização do cio das marrãs, administrou-se: progestágeno altrenogest (Regumate<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal) (20 mg) por 18 dias; gonadotrofina coriônica equina (eCG-Novormon<sup>®</sup>, Zoetis), 24 horas após a retirada do altrenogest na dose de 600 UI e 2,5 mg do hormônio liberador de Gonadotrofinas (GnRH – Sincrofort<sup>®</sup>, Ouro Fino), como indutor de ovulação após 72 horas da aplicação do eCG. As fêmeas foram inseminadas transcorrido 36 horas da aplicação do GnRH, a partir da técnica de inseminação artificial intra-uterina. O delineamento inteiramente casualizado foi o escolhido para o presente estudo, sendo cada fêmea uma unidade experimental. Avaliou-se a taxa de fertilidade, a qual foi calculada pela proporção de embriões recuperados em relação ao número de corpos lúteos de cada fêmea e a taxa de prenhes obtido pela avaliação do conjunto cérvix, útero, tubas uterinas e ovários, coletados perante abate das fêmeas e considerando-se gestantes as que possuíam no mínimo um feto em desenvolvimento. A taxa de prenhes não apresentou diferença estatística entre os grupos controle e sem plasma seminal (30% e 40% respectivamente), entretanto, foi observado que a taxa de fertilidade no grupo sem plasma seminal, foi maior quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) ( $83,09 \pm 15,59^a$  e  $40,27 \pm 22,74^b$ ), demonstrando assim que a ausência de plasma seminal melhorou a taxa de fertilidade. A classe de proteínas fibronectina tipo II (FN-2), presente no plasma seminal de suínos, pode ser correlacionada com o nosso achado de taxa de fertilidade, onde, após longo período de exposição dos espermatozoides a FN-2 induz o efluxo de colesterol da membrana plasmática e consecutivamente a desestabilização da mesma, garantindo assim que a retirada do plasma seminal logo após a ejaculação para a realização das doses seminais, seja um fator benéfico. Portanto, a ausência de plasma seminal oriundo da fração rica do ejaculado, sobre a fertilidade do sêmen suíno refrigerado a 17°C por 72 horas mostrou-se benéfica perante inseminação artificial intra-uterina em marrãs, cujos resultados relacionados a taxa de fertilidade apresentaram-se superiores quando comparados ao grupo submetido a inseminação com doses compostas de plasma seminal.

**Palavras-chave:** plasma seminal, suínos, taxa de fertilidade.

**Keywords:** *seminal plasma, swine, fertility rate.*

## **Avaliação da viabilidade de tecido testicular fresco ou vitrificado de catetos (*Pecari tajacu*) utilizando diferentes métodos de dissociação celular**

*Evaluation of the viability of fresh and frozen testicular tissue from collared peccaries (*Pecari tajacu*) using different methods for cell dissociation*

**Andréia Maria da Silva\***, Livia Batista Campos, Erica Camila Gurgel Praxedes, Keilla Moreira Maia, Samara Sandy Jerônimo Moreira, Luana Grasielle Pereira Bezerra, Carlos Alexandre de Carvalho Apolinário, Moacir Franco de Oliveira, Alexandre Rodrigues Silva

Laboratory of Animal Germplasm Conservation, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

\*E-mail: andreia.m.silva@hotmail.com

A viabilidade é um importante parâmetro avaliado em células provenientes de tecidos biológicos frescos ou submetidos a criopreservação. Para tecido testicular, a dissociação celular através de digestão enzimática tem sido corriqueiramente reportada, contudo as enzimas apresentam custo elevado. No tecido ovariano, a viabilidade é avaliada a partir de um isolamento mecânico folicular, um método de baixo custo que poderia ser também adaptado ao tecido testicular. Assim, o objetivo desse estudo foi comparar os métodos de digestão enzimática e dissociação mecânica para análise de viabilidade celular em tecido testicular de catetos (*Pecari tajacu*), a fresco ou vitrificado utilizando diferentes crioprotetores. Fragmentos (3 mm<sup>3</sup>) testiculares provenientes de indivíduos adultos foram avaliados a fresco e após vitrificação em superfície sólida com os crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) ou etilenoglicol (EG) na concentração de 3M. Para a digestão enzimática, os fragmentos foram imersos em associação das enzimas collagenase tipo IV (0,2% wt/vol), hialuronidase (0,1% wt/vol) e DNase tipo I (0,01% wt/vol) por 20 minutos sob agitação lenta, seguindo-se adição de soro fetal bovino a 10% para inativação das enzimas, e centrifugação a 500 xg por 5 minutos. Na dissociação mecânica, os fragmentos foram fatiados com uma lâmina de bisturi esterilizada n° 24 por 5 minutos, suspensos em 2 mL de meio essencial mínimo, colocados sob agitação por 10 minutos, filtrados em malha de 500 µm e centrifugados a 500 xg por 5 minutos. Para avaliação da viabilidade, as amostras foram acondicionadas em tubo plástico contendo a proporção de 50 µL de azul de Tripan (0,4% solução) para 50 µL da suspensão celular, dispostas em câmara de Neubauer e avaliadas por microscopia óptica (x40), sendo contadas 200 células da linhagem germinativa. Aquelas células coradas em azul foram consideradas inviáveis; as células que permaneciam sem marcação foram consideradas viáveis. Os dados foram expressos em média ± erro padrão, sendo os métodos comparados pela ANOVA seguida do teste t de Student ( $P < 0,05$ ), e as relações entre os métodos estabelecidas pelo teste de correlação de Spearman ( $P < 0,05$ ). No tecido fresco, foram obtidas  $85,9 \pm 1,18\%$  e  $80,9 \pm 1,1\%$  de células viáveis a partir dos métodos enzimático e mecânico, respectivamente. No tecido vitrificado, foram obtidas  $29,3 \pm 3,0\%$  e  $33,9 \pm 6,8\%$  no uso do DMSO, bem como  $29,5 \pm 4,3\%$  e  $39,1 \pm 6,6\%$  no uso do EG, respectivamente para os referidos métodos. Comparando-se os métodos de dissociação celular dentro de cada tratamento (fresco ou DMSO ou EG), não foram evidenciadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). Ressalta-se que, embora a vitrificação tenha promovido uma redução de viabilidade celular ( $P < 0,05$ ), os dois crioprotetores não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). Destaca-se ter sido verificada uma correlação moderada e positiva entre os dois métodos de dissociação celular, com  $R = 63,2\%$  ( $P < 0,05$ ). Diante do exposto, conclui-se que tanto o DMSO quanto o EG podem ser utilizados para a vitrificação de tecido testicular de catetos. Além disso, sugere-se que o método de dissociação mecânica possa ser utilizado em substituição à digestão enzimática para obtenção de células de tecido testicular fresco ou criopreservado destinadas à avaliação de viabilidade com azul de Trypan. O referido método mecânico foi aqui inicialmente descrito para os catetos, mas acredita-se que possa ser adaptado a qualquer espécie mamífera, haja vista sua praticidade e baixo custo.

**Palavras-chave:** digestão enzimática, isolamento mecânico, células viáveis, espermatogênese.

**Keywords:** enzymatic digestion, mechanical isolation, viable cells, spermatogenesis.

**Financiamento:** CAPES, CNPq



## **Avaliação do efeito do acetato de melengestrol (MGA) na inibição do estro em fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*)**

*The effect of melengestrol acetate on estrus inhibition in female brown brocket deer*

**Yuki Tanaka<sup>1,4,\*</sup>, David Javier Galindo Huaman<sup>2,4</sup>, Alice Pereira Americano<sup>3,4</sup>, José Maurício Barbanti Duarte<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda do quinto ano de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>3</sup>Graduanda do terceiro ano de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>4</sup>Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Departamento de Zootecnia, Jaboticabal, SP, Brasil.

\*E-mail: yuki.tanaka@usp.br

Em cervídeos, os protocolos de sincronização de estro (SE) são os mesmos utilizados em ruminantes domésticos. No entanto, alguns métodos de sincronização, como o uso de dispositivos internos, requer a contenção química e/ou física para a sua colocação, que pode gerar estresse ao animal, alterando a sua fisiologia reprodutiva. Assim, é importante delinear protocolos não invasivos para SE em cervídeos. Uma das alternativas é o uso de progestágenos orais, como o acetato de melengestrol (MGA), um hormônio esteroide progestacional sintético que é utilizado na SE em ruminantes domésticos. O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), por apresentar um grande número de exemplares em cativeiro, é considerado um modelo experimental para outros cervídeos neotropicais em termos de aplicação das biotécnicas reprodutivas. Objetivou-se, determinar a dose efetiva de MGA para inibição estral em fêmeas de veado-catingueiro comparando as doses de 0,5 mg e 1,0 mg. Foram utilizadas 8 fêmeas híidas e férteis alocadas igual e aleatoriamente em dois grupos. Elas receberam duas aplicações de análogo de prostaglandina (PGF2 $\alpha$ -CIOSIN®): uma no D0, e a segunda no D11. Foi oferecida uma dose animal/dia de MGA® Premix misturada com banana a partir do D1 até o D15; sendo que o grupo (G1) recebeu uma dose diária de 0,5mg/animal/dia de MGA, e o grupo 2 (G2), uma dose diária de 1,0 mg/animal/dia. O estro comportamental (EC) foi avaliado duas vezes ao dia do D0 até o D19, com o uso de um macho da espécie. No G1, 100% das fêmeas apresentaram o EC, durante o tratamento, enquanto no G2, 100% das fêmeas demonstraram o estro apenas após a retirada do MGA. Até o momento, não há relatos na literatura sobre o uso do MGA como método de SE em cervídeos, sendo apenas relatado o uso do MGA como método contraceptivo. Os resultados obtidos aqui, sugerem uma eficácia da dose 1,0mg/animal/dia na manipulação estral do veado-catingueiro, uma vez que as fêmeas que receberam esse tratamento (75%) não demonstraram EC mesmo após a indução de luteólise com PGF2 $\alpha$ . Desta forma, conclui-se que doses iguais ou inferiores a 0,5mg/animal/dia de MGA são ineficientes na inibição estral, ao contrário da dose de 1,0mg/animal/dia, na qual foi observada a inibição estral em fêmeas de veado-catingueiro. Os resultados do presente estudo são um importante avanço no desenvolvimento de protocolos de SE, visando a aplicação de biotécnicas reprodutivas para manutenção de programas de conservação de cervídeos.

**Palavras-chave:** sincronização de estro, acetato de melengestrol, veado-catingueiro.

**Keywords:** *estrus synchronization, melengestrol acetate, brown brocket deer.*



***In vitro* fertilization of puma (*Puma concolor*) from vitrified oocytes and semen collected from epididymis of dead donor: Case report**

*Fertilização in vitro de onça-parda (*Puma concolor*) a partir de óocitos vitrificados e sêmen coletado do epidídimo de doador morto: Relato de caso*

**Juliane Bayão Carelli<sup>1,\*</sup>, Pedro Nacib Jorge Neto<sup>1,2</sup>, Letícia Alecho Requena<sup>1</sup>,  
Márcia G. Rodrigues<sup>3</sup>, Jorge A. Salomão Júnior<sup>4</sup>, Sérgio A.P. Ferreira<sup>4</sup>,  
Cristiane Schilbach Pizzutto<sup>2</sup>, Hernan Baldassarre<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Médico(a) Veterinário(a) na Novagen Genética Ltda, Itapira, SP, Brasil; <sup>2</sup>VRA-FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil; <sup>3</sup>Analista Ambiental, Coordenadora Corredor das Onças/ICMBio, Cosmópolis, SP, Brasil; <sup>4</sup>Instituto Corredor das Onças - ICOON, Campinas, SP, Brasil; <sup>5</sup>McGill University, Montreal, Canada.

\*E-mail: juliane@novagen.com.br

It is estimated that nearly half a billion wild animals are killed every year in Brazil, including endangered species. The creation of a germplasm bank from semen, oocytes and somatic cells (skin fibroblasts) of roadkill animals may represent an important tool for the conservation of endangered species, and keeping genetic variability. After a run over, a male of approximately 3.5 years and 50 kg died and two hours later, in the laboratory, the animal had its epididymis punctured, from where approximately 100µl of white and light-colored milky semen were extracted. The syringe and needle used in the procedure were washed with 250µl DMPBS for recovery of the remaining semen. Subsequently, the recovered semen was diluted in 500 µl of OptiXcell® diluent and refrigerated. Oocytes used in IVF were previously collected and vitrified. They were sequentially washed in HM1 medium (Holding with 1 M sucrose), HM2 (Half holding with 0,5 M sucrose) and holding (TCM 199 supplemented with 20% FBS) for its devitrification, performed according to Vajta G. From a total of 41 oocytes from three donors, 10 degenerated and 31 oocytes were used in IVF after devitrification. The oocytes were stabilized in IVF medium (HAM F-10 supplemented with 5% FBS and gentamicin) at 38.5°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air for 2 to 4 hours before IVF. The refrigerated semen was washed by centrifugation (1500 rpm/10 min) with IVF media. Thereafter, the supernatant was removed and the pellet resuspended with the same media. After preparation, the semen presented 30% of progressive motility and vigor 3 and was used for inseminating the oocytes in the IVF drops (~50,000 motile sperm per drop). After ~18h in IVF, 11 oocytes degenerated and 20 presumptive zygotes were transferred to 450 µL drops of mSOF under oil and cultured at 38.5°C in humidified atmosphere with 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90%N<sub>2</sub>. After 48 h of fertilization, there was one cleaved structure, which halted its development at the 2-cell stage. After the fertilization period, there were still live spermatozoa in the IVF drop suggesting that the OptiXcell® medium was efficient for the maintenance of refrigerated semen of pumas. Although oocyte devitrification appeared to be successful due to the low degeneration of the oocytes, and the apparent success in obtaining semen from the epididymis of the dead animal, we did not reach our goal of producing viable embryos. A possible hypothesis for this would be the lack of proper capacitation of epididymal semen prior to fertilization. Further studies are needed to establish appropriate protocols for pumas. Another aspect to consider is that the vitrification protocol didn't work well with puma oocytes. The chances of obtaining embryos from vitrified oocytes are quite low due to the damage caused in the oocyte structure. For trampled males, the best system for the preservation of germplasm is the freezing of semen recovered from the testis/epididymis and its subsequent use as needed (AI, IVF with non-vitrified oocytes). For trampled females, the best system is oocyte collection by ovarian aspiration and IVF with cryopreserved semen, and freezing the resulting embryos for later implantation. And for both sexes (male/female), the preservation of somatic cell lines obtained from skin (e.g. fibroblasts) opens up an opportunity to generate identical animals by somatic cell nuclear transfer. Further research is needed for improvement of oocyte viability following cryopreservation for it to become a suitable conservation strategy.

**Palavras-chave:** onça-parda, fertilização in vitro, óocito vitrificado, sêmen epidídimo, conservação.

**Keywords:** puma, in vitro fertilization, vitrified oocytes, epididymal semen, conservation.



## **Concentração de eCG e atividade reprodutiva em éguas após aborto ao dia 70** *eCG Concentration and Subsequent Reproductive Activity in Mares after Abortion at Day 70*

**María José Estradé<sup>1</sup>, Nicolás Cazales<sup>1,2</sup>, Fernando Perdígón<sup>1</sup>, Daniel Cavestany<sup>1</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Reprolab, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*E-mail: rcmattos@ufrgs.br

Endometrial cups develop in the uterine wall of pregnant mares around day 37 of gestation, formed by differentiated fetal trophoblastic cells that invade the endometrium from the conceptus chorionic girdle. They reach maturity around day 50 and degenerate around days 105-150 when their remains are sloughed from the uterine surface. Destruction of endometrial cups is accomplished by the attack of the maternal immune system and by intrinsic cellular mechanisms that are not completely understood. Endometrial cups are responsible for the secretion of eCG, a glycoproteic hormone produced exclusively during pregnancy in the Equus gender. eCG is first detected in the mares bloodstream around day 40 of pregnancy, reaching a peak between days 50-80, and disappearing around days 105-150. An important feature of endometrial cups is that they continue with their normal evolution even after pregnancy loss. It has been stated that mares that abort within the period of activity of endometrial cups do not to reassume normal cyclicity and fail to become pregnant again in the same foaling season. Apparently circulating eCG prevents ovulation by luteinization of preovulatory follicles originating secondary corpora lutea (SCL). Normal cyclicity can be resumed only after endometrial cups and their product, eCG, have disappeared almost completely. Options to remove endometrial cups imply major surgery and are not used in common practice. A relationship between eCG concentration at the time of abortion and future cyclicity has been propose. Some studies show irregular reproductive activity and poor fertility after abortion in presence of endometrial cups. However, recent articles report an extended reutilization of mares as recipients in commercial embryo transfer programs, after induced abortion around day 60. The aim of the present experiment was to study the relationship between eCG concentration in mares at and after abortion and the subsequent reproductive activity in the same breeding season. Twenty two mixed breed, Criollo type mares with the same gestacional ages (70 to 77 days) were induced to abort by digital puncture of fetal membranes. Immediately before induction, and for the next ten weeks, eCG concentration and reproductive activity were monitored. Pre-abortion eCG was variable, with a mean of  $31.7 \pm 28.1$  IU/ml (range, 0.81-86.63 IU/ml). eCG decreased after abortion and all mares reached 0 IU/ml within the next 70 days. Half of the mares ovulated again after a mean of  $34.4 \pm 9.8$  days post abortion (range, 11-60 days). 90.9% of the mares that ovulated reconceived during the experiment. We observed threshold eCG concentrations below which mares are able to ovulate (2.9 IU/ml) and conceive (1.4 IU/ml). Pre-abortion eCG was significantly lower in mares that ovulated than in those that did not ( $P= 0.007$ ), and lower in mares that re conceived than in mares that did not ( $P= 0.002$ ). The interval from first to second conception was positively correlated with pre abortion eCG concentration ( $r^2=0.40$ ). Ovulatory and pregnancy rates were related to eCG concentration at abortion: mares having  $\leq 35$  IU/ml had significantly higher ovulation ( $P= 0.024$ ) and pregnancy rates ( $P= 0.002$ ) than mares  $>35$  IU/ml. No mares with  $\leq 35$  IU/ml became pregnant again. In conclusion, in mares that abort around day 70, measuring eCG concentration can help establish a functional prognosis for the same breeding season.

**Palavras-chave:** ciclicidade, ovulação, prenhes, cálices endometriais.

**Keywords:** *cyclicity, ovulation, pregnancy, endometrial cups.*



## **Influência do tratamento com P<sub>4</sub> LA no dia da ovulação sobre a taxa de concepção inicial em éguas com características reprodutivas indesejáveis**

*Influence of treatment with P<sub>4</sub> LA on early pregnancy rate in recipient mares with reproductive history of early embryonic loss*

**Ana Paula Maia<sup>1</sup>, Alberto Lopes Gusmão<sup>1</sup>, Max Vitoria Resende<sup>1</sup>, Letícia Patrão de Macedo Gomes<sup>2</sup>, André Maciel Crespilho<sup>2,3</sup>, Gustavo Mendes Gomes<sup>2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>2</sup>Curso de Medicina Veterinária, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; <sup>3</sup>Curso de Medicina Veterinária, Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil;

\*E-mail: bigugomes@gmail.com

Inúmeros fatores podem influenciar na eficiência de um programa de transferência de embriões (TE), determinando o sucesso ou o fracasso desta biotécnica. Contudo, dentre as variáveis que afetam a taxa de gestação após a TE, há um consenso em relação ao papel primordial desempenhado pela receptora, uma vez que essas éguas são responsáveis por receber, reconhecer, gestar, parir, criar e apartar o produto da TE. Sabe-se que os níveis circulantes de progesterona estão relacionados à formação e manutenção do corpo lúteo, bem como o preparo do sistema genital feminino para o início e a manutenção da gestação desde antes da ovulação. Neste contexto, a utilização de protocolos hormonais para melhorar a taxa de gestação em receptoras de embrião equino tem sido o foco de alguns grupos de pesquisa, afim de melhorar a eficiência reprodutiva em relação a taxa de concepção pós-ovulação. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficácia da utilização de progesterona de longa ação (P<sub>4</sub> LA) no dia da ovulação da receptora, utilizando éguas que já participaram como receptoras em programas de TE anteriores, quanto ao aumento da taxa de concepção inicial de éguas classificadas como inaptas (éguas que apresentam tônus uterino de levemente tubular, flácido ou muito flácido; tônus cervical de levemente contraído, flácido ou muito flácido; morfoecogenicidade uterina de heterogêneo sem edema endometrial ou com edema endometrial examinado por ultrassonografia) e histórico reprodutivo com diagnósticos negativos de gestações após duas inovulações. O experimento foi realizado na Central de Reprodução de um Haras, localizada no distrito de Ibitupã (14° Latitude Sul e 39° Longitude Oeste), município de Ibicuí – Bahia, durante os meses de setembro a abril dos anos de 2010, 2011 e 2012. Para tanto foram utilizadas 80 éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador, com idade média de 7 ± 2 anos apresentando score corporal ideal de acordo com classificação da literatura. Todas as éguas foram submetidas ao protocolo sanitário exigido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) para a região. Estas receptoras já teriam sido usadas em programas de TE anteriores e apresentavam características reprodutivas incompatíveis, classificadas como inaptas para TE e histórico reprodutivo com diagnóstico negativo de gestação após duas inovulações. Após seleção estas éguas foram divididas em dois grupos, nos quais os animais do Grupo P<sub>4</sub> LA (n=40) receberam o tratamento com 1.500mg de P<sub>4</sub> LA (P<sub>4</sub> LA 300mg®, FG Veterinária, Brasil) (IM) após a detecção da ovulação enquanto os animais do Grupo Controle (n=40) receberam 5mL de solução fisiológica após a detecção da ovulação. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado para avaliar a taxa de gestação inicial, com nível de significância de 5%. Houve um aumento significativo (P < 0,05) na taxa de concepção avaliada 30 dias após às inovulações nas receptoras que receberam a suplementação de P<sub>4</sub> LA (62,5%, n=25/40 concepções/inovulações) em relação ao grupo controle não tratado (35%, n=14/40 concepções/inovulações). O resultado deste estudo permite afirmar que o tratamento com 1.500mg de P<sub>4</sub> LA no dia da ovulação em receptoras com histórico anterior de baixo desempenho reprodutivo em TE eleva a taxa de gestação inicial nestas fêmeas.

**Palavras-chave:** equino, ovulação, progesterona, transferência de embrião.

**Keywords:** *embryo transfer, equine, ovulation, progesterone.*



## **Estimativa da população de folículos ovarianos pré-antrais da raça de Jumento Nordestino Brasileiro**

*Estimation of the preantral ovarian follicles population of Northeast Brazilian donkey (Equus assinus)*

**Katia Regina Freire Lopes\*, Gabriela Liberalino Lima, Erica Camila Gurgel Praxedes, Luana Grasielle Pereira Bezerra, Alexandre Rodrigues Silva**

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: katiaregina.dna@gmail.com

Os Jumentos (*Equus assinus*) são animais historicamente relevantes para a ocupação de áreas inóspitas em todo o mundo, mas tem perdido espaço devido à modernização dos centros urbanos e da mecanização agrícola e transporte motorizado. Assim, muitas raças de jumentos já foram extintas ou encontram-se em rápido processo de queda populacional, dentre estas, o jumento Nordestino, endêmico no Brasil. Uma das estratégias de conservação é o uso de biotecnologias que favoreçam a reprodução assistida, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) que maximiza a disponibilidade de oócitos para outras biotécnicas. Como o ponto inicial para o uso desta e outras técnicas é conhecer detalhes da fisiologia reprodutiva e dos gametas da espécie que deseja manipular, objetivou-se estimar e caracterizar a população de folículos ovarianos pré-antrais (FPs) de jumentas da raça Nordestina. Vinte fêmeas com idade média de  $5,1 \pm 3,2$  anos e peso médio de  $105,2 \pm 18,6$  kg, constituíram o grupo de estudo. As mesmas foram submetidas a procedimento de ovariectomia guiada por laparoscopia para coleta dos ovários. Assim como nos demais equídeos, os ovários das jumentas apresentam formato reniforme e suas zonas corticais, incluindo a fossa ovariana, foram extraídas. Os córtex foram fixados com Carnoy, desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados usando xileno e finalmente inclusos em blocos de parafina histológica. Estes blocos foram sequencialmente seccionados em micrótomo em frações de 7  $\mu$ m. Uma a cada 120 frações foi montada em lâminas de vidro, coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas em microscópio ótico. Os FPs que apresentaram núcleo visível foram fotografados, mensurados com uso de software especializado e classificados como primordiais, primários e secundários. Os FPs classificados e contados foram identificados como normais, quando morfológicamente íntegros, ou degenerados, com sinais de degeneração. A população de FPs foi estimada usando a fórmula: (número de FPs observados  $\times$  número total de secções  $\times$  espessura das secções) dividido por (número de secções observadas  $\times$  diâmetro médio do núcleo dos oócitos). A população média estimada foi de  $17.698,1 \pm 10.038,4$  FPs por animal. Destes, 91,2% foram identificados como primordiais; 8,4% como folículos primários e 0,5% como secundários. Folículos com múltiplos oócitos foram observados em todos os animais, sendo todos folículos primordiais, representando 1% do total de folículos. O número médio de folículos primordiais estimado foi de  $16.047 \pm 9.035$  e como esperado, o máximo valor foi encontrado na segunda fêmea mais jovem (2 anos e 27.951,8 folículos) e o valor mínimo na mais velha (9 anos e 3.669,8 folículos). Estes folículos apresentaram um diâmetro médio de  $30,7 \pm 6\mu$ m. Os primários foram estimados em  $1562 \pm 1357$ , com máximo de 3.527,6 (também na segunda mais jovem) e 113,7 folículos no espécime mais velho, tendo um diâmetro médio de  $35 \pm 8,3 \mu$ m. Os folículos secundários, com  $70,6 \pm 43,4 \mu$ m, foram estimados em  $89 \pm 49$  folículos por animal, com máximo de 155,2 e mínimo de 31,1. A população de FPs estimada estava distribuída entre os ovários direito e esquerdo, em 54,6% e 45,4% respectivamente. A maior parte dos FPs foi considerada morfológicamente normal (90,2%) e a menor parcela, degenerados (9,8%). Em conclusão, este trabalho apresenta de forma inédita a estimativa de folículos pré-antrais nos ovários das jumentas da raça nordestina. Esta informação é a base para o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida para a conservação e multiplicação da raça.

**Palavras-chave:** Equus asinus, ovário, germoplasma, conservação.

**Key-words:** Equus asinus, ovary, germoplasm, conservation.



## **Resultados de um programa comercial de produção de embriões in vitro em caprinos durante a estação não-reprodutiva**

*Results from a commercial in vitro embryo production program in goats during the non-breeding season*

**Leticia Alecho Requena<sup>1</sup>, Juliane Bayão Carelli<sup>1</sup>, Pedro Nacib Jorge Neto<sup>1,2,\*</sup>, Ivan da Silveira Vasconcellos Leite<sup>3</sup>, Hernan Baldassarre<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Novagen Genetica, Itapira, SP, Brasil; <sup>2</sup>VRA-FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil; <sup>3</sup>Capril Caprivama, Alfenas, MG, Brasil;

<sup>4</sup>McGill University, Montreal, Canada.

\*E-mail: pepovet@usp.br

In vitro embryo production (IVEP) was tested during the non-breeding seasons of spring and summer in Saanen goats from two different herds. Donors and recipients were synchronized with intravaginal sponges containing 60mg medroxyprogesterone acetate for 16 days. Donors received a total of 100mg FSH (Folltropin®) administered in 3 injections of 2, 1.5 and 1.5mL at 12h intervals starting ~36h before laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU). Recipients received 500IU of eCG (Novormon®) and 125mg cloprostenol (Sincrocio®) at the time of sponge removal and 50µg GnRH (Fertagyl®) at 36h after sponge removal. Donors and recipients were deprived from food (24h) and water (12h) in preparation for surgery. For LOPU, donors were placed under general anesthesia with isoflurane, while in recipients parenteral anesthesia was achieved with xylazine (Rompun®) via IM injection. LOPU, IVM, IVF and IVC procedures were conducted as previously described (Baldassarre et al. 2007. *Reprod Fert Develop*, 19:612-616). Briefly, the females were restrained on a laparoscopy table in a 45° angle and then, using a 5mm laparoscope and an atraumatic grasping forceps to uncover the ovaries, all follicles  $\geq 2$  mm diameter were aspirated using a 20G needle mounted in a plastic pipette connected to a collection tube and vacuum line. IVM and IVF were performed in 50µL drops of maturation medium under mineral oil, at 38.5°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air for 24h. The maturation medium consisted of M199 supplemented with FSH, LH, estradiol and 10% heat-inactivated estrus goat serum. Fertilization was conducted in TALP medium supplemented with 10% estrus goat serum and 10µg/mL heparin (Fert-TALP). Semen straws were thawed and the semen enriched by passage through a 45:90 Percoll gradient at 3000 rpm for 5 min followed by resuspension in Fert-TALP and a centrifugation wash at 2000 rpm for 2 min. After wash, the semen was resuspended in Fert-TALP and used for inseminating the oocytes in the IVF drops (~50,000 motile sperm per drop). After ~15h in IVF, the presumptive zygotes were transferred to 25 µL drops of mSOF under oil and cultured for 6 days at 38.5°C in humidified atmosphere with 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90%N<sub>2</sub>. Blastocyst-staged embryos were transferred into the uterus of synchronized recipients with a morphologically sound corpus luteum. There were no statistical differences (t test,  $P > 0.05$ ) when comparing the results of the two seasons, the two herds, and two donor ages. For spring vs. summer there were no differences in the average number of oocytes recovered ( $17.6 \pm 12$  vs.  $12.5 \pm 6$ ); usable oocytes ( $11.1 \pm 10$  vs.  $8.1 \pm 5$ ), transferable embryos ( $3.4 \pm 3$  vs.  $3.7 \pm 1$ ) and pregnancy after transfer (46 vs. 44%). Similarly, no differences were found when comparing the results in 2 different herds at the levels of average number of oocytes recovered ( $15.7 \pm 11$  vs.  $13.5 \pm 5$ ); usable oocytes ( $10.3 \pm 9$  vs.  $8.0 \pm 5$ ), transferable embryos ( $3.1 \pm 3$  vs.  $3.7 \pm 3$ ) and pregnancy after transfer (52 vs. 36%). Finally, we found no difference when comparing the results in donors of more vs. less than 6 years of age in the average number of oocytes recovered ( $12.9 \pm 10$  vs.  $16.1 \pm 8$ ); usable oocytes ( $8.9 \pm 9$  vs.  $8.9 \pm 6$ ), transferable embryos ( $2.4 \pm 1$  vs.  $4.2 \pm 4$ ) and pregnancy after transfer (54 vs. 40%). These results confirm that LOPU-IVEP is commercially ready for application in the propagation of valuable goats in an out-of-season scheme. LOPU-IVEP also has the potential for production of more offspring from valuable goats as it can be conducted more often and more times in the life of genetically superior females compared with standard multiple ovulation and embryo transfer.

**Key words:** in vitro fertilization, goats, commercial program, LOPU, non-breeding season.

**Palavras-chave:** fertilização in vitro, caprinos, produção comercial, LOPU, fora de estação.





## Efeitos da troca diária de diluente sobre a longevidade do sêmen ovino refrigerado

*Effect of daily extender exchange on the longevity of cooled ram semen*

**Eduarda Maciel Busato<sup>1,\*</sup>, Ana Claudia Machinski Rangel de Abreu<sup>1</sup>, Tácia Gomes Bergstein Galan<sup>2</sup>,  
Melina Andrea Formighieri Bertol<sup>3</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>4</sup>, Romildo Romualdo Weiss<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, Curitiba, PR, Brasil;

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, Curitiba, PR, Brasil; <sup>3</sup>Médica Veterinária Doutora em Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, Curitiba, PR, Brasil; <sup>4</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária PUC-PR, Curitiba, PR, Brasil; <sup>5</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

\*E-mail: eduarda.busato@gmail.com

A refrigeração do sêmen consiste no principal método de armazenamento e conservação a curto e médio prazo. Esta técnica é baseada na redução reversível do metabolismo espermático. Quanto maior o tempo de armazenamento, maior o acúmulo de metabólitos e menor a concentração de nutrientes disponível no meio, conseqüentemente, menor a qualidade espermática. Pensando em aumentar a longevidade do sêmen ovino refrigerado, o presente trabalho foi conduzido para avaliar se a qualidade do sêmen pode ser preservada por um intervalo superior quando realizada centrifugação diária, seguida de ressuspensão do pellet de espermatozoides em diluente fresco. O pool de sêmen utilizado no experimento foi coletado de três reprodutores ovinos com fertilidade comprovada, utilizando vagina artificial. Após as coletas o sêmen foi diluído com diluente Glicina-Gema-Leite (GGL), na proporção 1:4 (0,7ml de sêmen e 2,8ml de GGL), e avaliado quanto à motilidade e vigor (avaliação visual subjetiva em microscópio), concentração (contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer®) e integridade de membrana (método do meio hiposmótico). O sêmen foi fracionado em dois grupos, sendo eles: CG (controle GGL) e TG (teste GGL). As amostras foram refrigeradas a 5°C, em Botutainer®, e a cada 24 horas foram homogeneizadas e reavaliadas. O grupo TG foi centrifugado durante 10 minutos a 2900rpm, o sobrenadante (2,8ml) foi descartado e o pellet de espermatozoides ressuspensionado em diluente fresco (2,8ml). Após a ressuspensão foi realizada nova avaliação. Este procedimento foi repetido diariamente até que TG atingisse o mínimo de 30% de motilidade progressiva. Na avaliação inicial (M0) apresentou-se: 80% de motilidade progressiva, vigor 5 (escala 1 a 5), concentração de 472milhões de espermatozoides viáveis por ml e 78% de espermatozoides com membrana íntegra. As trocas de diluente foram realizadas até o quinto dia (M5), quando TG apresentou motilidade progressiva equivalente a 30% pré e 35% pós-centrifugação, vigor 3 pré e 4 pós-centrifugação, 72% de espermatozoides com membrana íntegra pré e 68% pós-centrifugação e concentração de 134,5milhões de espermatozoides viáveis por ml pré e 144,5milhões pós-centrifugação. O CG em M5 apresentou os seguintes parâmetros: motilidade progressiva 15%, vigor 1, 72% de espermatozoides com membrana íntegra e concentração de 88,5milhões de espermatozoides viáveis por ml. A motilidade progressiva em M5 foi superior em TG quando comparado ao CG, isto indica que a troca diária de diluente foi eficiente para preservar a viabilidade espermática por um maior período. Tanto no M5 quanto nos dias anteriores notou-se melhora na motilidade progressiva e no vigor espermático após troca de meio. Tal melhora, possivelmente, foi decorrente da redução na concentração de metabólitos e aumento na disponibilidade de nutrientes promovidas pela troca de diluente. A redução na porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra entre M0 e M5 foi de 6% em CG e TG pré-centrifugação, e de 10% em TG pós-centrifugação e troca de meio. Este achado pode indicar que os processos de centrifugação e ressuspensão do pellet produzem danos à membrana, no entanto, estes danos parecem não interferir na motilidade. A cada troca de meio foram perdidos, em média, 35,4milhões de espermatozoides por ml, no entanto, ao final dos cinco dias a concentração de espermatozoides viáveis por ml foi superior no TG, devido à maior motilidade progressiva apresentada por este grupo. Com os resultados do presente trabalho concluímos que a troca diária de diluente representa uma opção viável para prolongar a viabilidade do sêmen ovino refrigerado.

**Palavras-chave:** carneiro, inseminação artificial, reprodução animal.

**Keywords:** sheep, artificial insemination, animal reproduction.



## Hemodinâmica uterina durante protocolo de sincronização de curta duração

*Uterine haemodynamic during short-time synchronization protocol*

Renato Travassos Beltrame<sup>1,\*</sup>, Nilson Nunes Morais Junior<sup>2</sup>, Joao Vitor Pagoto Careta<sup>1</sup>, Gustavo Augusto Damasceno Justino<sup>1</sup>, Lucas Reichelm Costa<sup>2</sup>, Thales Alves Dutra Lima<sup>2</sup> Ricardo Lopes Dias da Costa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário do Espírito Santo (UNESC), Colatina, ES, Brasil; <sup>2</sup>Curso de Agronomia, Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Colatina, ES, Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, Brasil.

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

Objetivou-se avaliar os efeitos de tempo e lado da artéria uterina sobre as estimativas da hemodinâmica uterina de fêmeas ovinas durante um protocolo de sincronização de ovulação de curta duração. Quatorze fêmeas multíparas da raça Santa Inês mantidas em pastagem de *Panicum maximum* cv. *Aruana* e suplementadas com concentrado a base de soja e milho (fornecimento individual de 280g/dia – Proteína Bruta 14,27%) foram sincronizadas mediante inserção de esponja vaginal impregnada com 60mg de medroxyprogesterona (MAP Progespon<sup>®</sup>, Intervet / Schering-Plough) e injeção intramuscular (IM) de 2,5 µg de D-cloprostenol (0.5 mL Prolise<sup>®</sup>) em um dia aleatório do ciclo estral, considerado como dia (D) 0. No D6 pela manhã, as esponjas foram retiradas e após 24 horas (D7) administrou-se 25 µg de lecorelina, análogo de GnRH por via IM (Gestran Plus<sup>®</sup> -Tecnopac). A IATF ocorreu entre 52 e 58 horas após retirada do implante. Dopplervelocimetria de ambas as artérias uterinas foram realizadas por ultrassonografia transretal no D0, D2, D4 e manhã do D6 a cada 48 horas, e posteriormente (D6 a noite, D7 e D8) a cada 12 horas (7 h e 19h) pelo mesmo operador com os animais em estação e sem sedação. Os parâmetros de velocidade do fluxo sanguíneo e índices Doppler foram determinados nos momentos descritos acima, incluindo a velocidade do pico da sístole (PS) (cm/s), velocidade final da diástole (ED) (cm/s), tempo médio da velocidade máxima e média (TAMAX, TAMEAN cm/s), e os índices de pulsatilidade (IP), índice de resistência (IR), relação sístole diástole (S/D), frequência cardíaca (FC), diâmetro arterial (DA) (mm) e o volume do fluxo sanguíneo (VFS) (ml/min). Os dados da avaliação da hemodinâmica foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS considerando-se  $P < 0,05$ . Não foram identificadas diferenças nas variáveis PS (36,02 cm/s) e ED (10,07 cm/s) ( $P \geq 0,05$ ). Os IP e IR sofreram modificações à inserção e retirada da progesterona (IP: 2,75 - 1,18 e IR: 0,88 - 0,66) ( $P < 0,05$ ). Houveram aumentos ao longo do protocolo para TAMAX (13,67 x 17,28 cm/s) e TAMEAN (7,47 x 9,82 cm/s) ( $P < 0,05$ ). O DA e o VFS diminuíram no decorrer do protocolo de sincronização e apresentaram valores inicial de 6,06 mm e 206,23 ml/min e final de 6,06 mm e 104,91 ml/min respectivamente. O DA apresentou uma maior estimativa no lado esquerdo (4,65mm) enquanto TAMAX e TAMEAN foram superiores no lado direito (14,87 e 8,59 respectivamente). A variação hormonal durante a sincronização pode evidenciar modificações nos padrões hemodinâmicos associados ao útero influenciando respostas e resultados pós inseminação. Da mesma forma, na existência de valores de referencia, descartes podem ser realizados diante de anormalidade hemodinâmica. Sugere-se que independente dos resultados apresentados, o trabalho aborda uma área relevante e incipiente na produção animal. Novos trabalhos podem elucidar e corroborar aplicações práticas da ultrassonografia doppler na produção animal.

**Palavras-chave:** artéria uterina, volume do fluxo sanguíneo, ultrassonografia colorida doppler.

**Keywords:** uterine artery, blood flow volume, colour Doppler sonography.