



Adição de plasma seminal de animais de alta e baixa fertilidade na criopreservação de espermatozoides do ejaculado e da cauda do epidídimo de garanhões subférteis

Addition of seminal plasma of high and low fertility animals in the cryopreservation of ejaculates and epididymal spermatozoa of subfertile stallions

Gabriel Augusto Monteiro^{1*}, Yamê Fabres Robaina Sanceler da Silva², Carlos Ramires Neto, Patrícia Alves Dutra¹, Camila de Paula Freitas-Dell'aqua², Felipe Pires Hatwig², Patricia de Mello Papa², Frederico Ozanam Papa²

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, EV/UFGM, Belo Horizonte, MG, Brasil; ²Departamento de Reprodução animal, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

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

O plasma seminal vem sendo reportado como deletério a criopreservação espermática, pesquisadores têm questionado quanto a necessidade do plasma seminal na fecundação, uma vez que, espermatozoides recuperados na cauda do epidídimo sem contato com o plasma seminal apresentam alta taxa de concepção. Assim, objetivou-se comparar o efeito da adição de plasma seminal proveniente de garanhões de alta e baixa fertilidade sobre a congelabilidade e viabilidade dos espermatozoides do ejaculado (EJ) e recuperados da cauda do epidídimo (EP) de garanhões subférteis. Foram utilizados 6 garanhões com histórico de subfertilidade. Os 6 animais foram utilizados nos grupos 1 (EJ) e 2 (EP). No Grupo 1 (EJ), foram coletados dois ejaculados de cada garanhão por semana. A amostra seminal foi diluída na proporção 1:1 (v/v) com o diluente Botu - Sêmen® e dividida em três alíquotas, as quais foram acrescidas de 20% (v/v) com os seguintes meios: Botu-Semen® (EJ-CT); plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática (EJ-PS1); plasma seminal de garanhões com baixa viabilidade espermática (EJ-PS2), após as diluições os espermatozoides foram criopreservados. Uma semana após a última colheita de sêmen com vagina artificial, os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral. Após esse procedimento realizou-se a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado, consistiu em injetar diluente (Botu-sêmen®) no ducto do epidídimo para carrear os espermatozoides. Posteriormente a amostra seminal foi dividida em 3 grupos e cada grupo acrescido de 20% (v/v) com os seguintes meios: Botu-Semen® (EP-CT); plasma seminal de garanhões com alta qualidade espermática (EP-PS1); plasma seminal de garanhões com baixa viabilidade espermática (EP-PS2) após a diluição os espermatozoides foram criopreservados usando a mesma metodologia para ambos os grupos. As avaliações das amostras seminais consistiram na análise computadorizada das características da motilidade e nas análises de citometria de fluxo da integridade da membrana plasmática (IMP). O modelo estatístico foi medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009). As análises realizadas demonstraram similaridade nos parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, velocidade angular progressiva, velocidade linear progressiva, espermatozoides rápidos dos espermatozoides do ejaculado (EJ-CT, EJ-PS1 e EJ-PS2) quando comparados aos recuperados da cauda do epidídimo (EP-CT, EP-PS1 e EP-PS2). Em relação à IMP, todos os grupos de espermatozoides do ejaculado apresentaram menor número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra quando comparado aos espermatozoides do epidídimo, estes achados são importantes para manutenção da capacidade fecundante do espermatozoide. Estes resultados demonstram que as secreções provenientes das glândulas anexas no momento da ejaculação são deletérias à membrana espermática de garanhões subférteis após criopreservação, afetando a viabilidade da membrana plasmática, além disso, foi constatado que a adição de 20% de plasma seminal de animais férteis e subférteis previamente à congelação dos espermatozoides da cauda do epidídimo não prejudicou a qualidade espermática.

Palavras-chave: cauda do epidídimo, sêmen equino.

Keywords: tail of the epididymis, semen, equine.



Avaliação da hemodinâmica testicular e qualidade espermática de equinos através da ultrassonografia doppler

Evaluation of testicular hemodynamics and sperm quality of horses by Doppler ultrasonography

Allan Gledson Ferreira dos Santos^{1*}, Alex Souza Rique², André Luiz Pereira Tork², Camilla Flávia Avelino de Farias², Iara Nóbrega Macêdo³, Aline Francelina de Queirós¹, Sildivane Valcácia Silva^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campus II, Areia, Universidade Federal da Paraíba João Pessoa, PB, Brasil; ²Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Campus I, João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, Brasil; ³Graduação em Medicina Veterinária, Campus II, Areia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

*E-mail: allan_g_santos@hotmail.com

A ultrassonografia modo Doppler é um método não invasivo que fornece informações sobre a arquitetura vascular, direção e velocidade do fluxo sanguíneo. A análise pelo modo doppler espectral mostra informações de velocidade e resistência ao fluxo sanguíneo. Alterações vasculares nos testículos podem levar à queda da produção espermática, interferindo na motilidade e morfologia espermáticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as correlações entre a vascularização testicular e as características espermáticas de garanhões situados no estado da Paraíba. Neste experimento foram utilizados sete garanhões com diferentes condições reprodutivas. A colheita do sêmen foi realizada pelo método da vagina artificial com o auxílio de uma fêmea em estro como manequim; as características seminais avaliadas foram volume, concentração espermática (diluição 1:20), motilidade (avaliação subjetiva; 0-100%), vigor (0-5), integridade (eosina-nigrosina; 20 µL de sêmen; 20 µL do corante e 20 µL de NaCl 0,9%); e funcionalidade da membrana plasmática (50 mOsm/Kg H₂O; citrato de sódio). Após a colheita, os animais foram submetidos à avaliação ultrassonográfica Doppler e calculados os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) com o modo espectral. O modo power Doppler foi utilizado para analisar o fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme e o parênquima testicular avaliado pelo modo color Doppler. Representou-se os valores médios e o coeficiente de variação, realizados pela análise de correlação de Spearman. Os garanhões apresentaram volume espermático médio de 44,6 mL, concentração espermática média de 100x10⁶ spz/mL. Motilidade, vigor, integridade e funcionalidade apresentaram valores médios de 69,1%; 4; 41,8%; 63,0%, respectivamente. Os testes de integridade e funcionalidade de membrana demonstraram que quanto menor a presença de patologias espermáticas, melhor será a motilidade. Observou-se correlação inversamente proporcional entre motilidade e PI ($\rho=0,55$), ou seja, quanto menor a PI melhor a motilidade espermática. Este resultado pode implicar na importância da refrigeração do sangue na manutenção da qualidade espermática, uma vez que uma menor pulsatilidade indica fluxo de retorno venoso mais lento que o fluxo arterial, conferindo maior tempo para a refrigeração do sangue que nutre os testículos. Já o parâmetro RI não apresentou correlação com a motilidade espermática nas condições deste estudo. Entre volume e concentração espermática foi observada correlação inversamente proporcional ($\rho=0,54$), quanto menor o volume do ejaculado, melhor a motilidade espermática, indicando que a presença do plasma seminal pode interferir negativamente na motilidade equina. Foi percebida correlação diretamente proporcional entre concentração espermática e motilidade. Desta forma, conclui-se que o índice de pulsatilidade e o volume de plasma seminal interferem na motilidade espermática de garanhões.

Palavras-chave: motilidade, índice de pulsatilidade, volume.

Keywords: motility, pulsatility index, volume.



Avaliação ultrassonográfica da dinâmica folicular ovariana em jumentas da raça pêga: Resultados preliminares

Evaluation of follicular ovarian dynamics by ultrasonography in pega breed jennies: Preliminary results

Jefferson Thadeu Santos de Oliveira^{1,*}, Vinicius Maretto², Natália Ferreira Torres², Luis Fonseca Matos³

¹Graduando do 8º período de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil; ²Residente em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil; ³Professor Associado do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

*E-mail: jefferson_tso@hotmail.com

A compreensão da dinâmica folicular é fundamental para a manipulação do ciclo estral e a aplicação de biotecnologias reprodutivas para a multiplicação de animais superiores. A dinâmica folicular é um processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos que acontece nos ovários. Com o objetivo de caracterizar a dinâmica folicular de jumentas da raça Pêga, quatro fêmeas com idade entre 5-6 anos foram avaliadas por três ciclos estrais. Os animais foram alojados no hospital veterinário da UENF, Setor de Reprodução e Obstetrícia de Grandes Animais, recebendo feno de tifton (*Cynodon dactylon*), sal mineral e água *ad libitum*. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas diariamente por três ciclos estrais consecutivos de cada animal, totalizando de 12 ciclos. O acompanhamento do crescimento folicular foi realizado a partir da primeira ovulação após a chegada dos animais por via transretal com o auxílio de um equipamento de ultrassonografia portátil modelo Z6 Vet Mindray com transdutor multifrequencial linear, modo-B. As configurações foram padronizadas previamente ao experimento e mantidas ao longo de toda a coleta de dados. Foram avaliados durante o período experimental a duração média do ciclo estral, diâmetro máximo e taxa de crescimento diário do folículo dominante, além do diâmetro máximo, taxa de crescimento e taxa de regressão do corpo Lúteo. A cada exame de ultrassonografia foi realizada a identificação do maior e segundo maior folículo dominante e corpos lúteos por meio de mapeamento anotando-se a posição das estruturas em cada ovário. Amostras de sangue foram coletadas diariamente da veia jugular e o plasma congelado para posterior dosagem de progesterona. A duração média dos ciclos estrais foi de $23,83 \pm 1,85$ dias, a média da taxa de crescimento do maior folículo dominante foi de $0,96 \pm 0,15$ mm e a média do diâmetro máximo foi de $36,07 \pm 3,08$ mm. A média do diâmetro dos folículos pré-ovulatórios foi de $34,45 \pm 2,31$, resultando em uma regressão pré ovulatória média de $1,62 \pm 1,36$ mm. A média do diâmetro máximo dos corpos lúteos foi de $25,76 \pm 2,50$, com uma duração média de $19,69 \pm 3,03$ dias. Após a ovulação o tempo médio para que o primeiro folículo dominante atingisse seu maior diâmetro foi de $5 \pm 1,51$ dias, com uma média de taxa de crescimento diário de $0,97 \pm 0,57$ mm. Ao atingir o diâmetro máximo, os corpos lúteos iniciaram regressão no período médio de $14,77 \pm 2,8$ dias com uma média de taxa de regressão de $0,99 \pm 0,31$ mm. Os resultados preliminares obtidos permitem uma caracterização inicial da dinâmica folicular ovariana de Jumentas da raça Marchador Brasileiro.

Palavras-chave: ultrassonografia, dinâmica folicular, ciclo estral.

Keywords: *ultrasonography, follicular dynamics, estrous cycle.*



Biometria testicular e parâmetros seminais de asininos da raça Pêga criados no norte do Brasil

Testicular biometry and seminal parameters of Pêga breeders bred in northern Brazil

Pedro de Almeida Rezende Fumagalli^{1*}, Lais Angelo Abreu¹, Juliana Carvalho Anacleto¹, Leticia Oliveira Alencar¹, Juliana Silva Oliveira¹, Luciano Fernandes Sousa⁴, Sandro Esteven Moron², Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura³ Márcio Gianordoli Teixeira Gomes⁴

¹Aluno de Graduação de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína-TO, Brasil; ²Professor do Curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína-TO, Brasil; ³Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Fisiologia Animal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; ⁴Professor do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína-TO, Brasil.

*E-mail: pedro.fumagalli.vet@gmail.com

A população mundial de muare é de 10.172.586 cabeças, tendo o Brasil ocupando o terceiro lugar, com 1.239.000 cabeças. O grande impacto econômico positivo que pode ser proporcionado por estes indivíduos oriundos do cruzamento entre o jumento e a égua. No Brasil, ocorre um aumento na relevância de mais estudos acerca dos parâmetros reprodutivos desta espécie, e raça, tais como os exames de biometria testicular e produção do sêmen, como características espermáticas e do plasma seminal. Foram realizadas avaliações de biometria testicular, aspecto físico do sêmen, morfologia e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, pela técnica dos corantes Eosina e Nigrosina, de dezoito púberes machos da raça Pêga, com idade variando entre vinte a cento e vinte meses. As coletas de sêmen ocorreram em criatórios de asininos na região Norte do Tocantins e Sul do Pará, entre os meses de outubro de 2015 e março de 2016, período considerado de maior atividade sexual destes animais. Os animais avaliados apresentaram uma média de idade de 45 meses, obtendo como média do perímetro escrotal 35 cm, 8,2 cm para comprimento do testículo direito (CTD), 5,7 cm para largura do testículo direito (LTD), 8,5 cm para comprimento do testículo esquerdo (CTE), 6 cm para largura do testículo esquerdo (LTE), é possível obter a forma e volume testicular utilizando as médias da largura e comprimento testicular, a razão entre LTD e CTD para o testículo direito (TD) obteve o resultado de 0,69, para o testículo esquerdo (TE) foi de 0,70, ambos classificados como longo-oval; O volume TD foi de 218,70 cm³ e TE de 228,77 cm³, uma variação média de 4,4% entre os testículos, resultado próximo aos trabalhos já publicados: VTD (182,34 cm³) e VTE (201,36 cm³), diferença de 9,45%. Animais acima de 20 meses já apresentaram espermatozoides no ejaculado, obtendo como resultado no volume ejaculado (40 ml), coloração branca-amarelada e leitosa, na avaliação de aspecto seminal, as características físicas obtiveram médias: vigor (4), motilidade (80%), com concentração espermática (206,2x10⁶ espermatozoides/ml); O PE apresentou correlação significativa com a concentração espermática, influenciando na maior produção de números de doses inseminantes/ejaculado nos programas de inseminação artificial para essa raça. É recomendado espermatozoides (sptz) normais acima de 70%, não sendo indicado gametas acima de 20% com defeitos menores ou maior que 10% com defeitos maiores, os resultados na morfologia espermática foram: sptz normais (89%), defeitos menores (7%) e defeitos maiores (4%); integridade de membrana: Eosina Nigrosina (84,7%) viáveis e (15,3%) não viáveis, pope (99%) viáveis e (1%) não viável. Asininos da raça Pêga criados na região Norte do Brasil apresentam mesmo padrão testicular e seminal de indivíduos criados em Minas Gerais, berço da raça.

Palavras-chave: biometria testicular, puberdade, volume seminal.

Keywords: testicular biometry, puberty, seminal volume.



Desempenho do EquiPure® para seleção de espermatozoides morfológicamente superiores a partir do sêmen criopreservado de garanhões

Performance of EquiPure® for morphologically superior spermatozoa selection from cryopreserved semen of stallions

Márcio Calixto Matias^{1*}, Dayane Maria Santos Lima², Hymerson Costa Azevedo³, Heder Nunes Ferreira⁴

¹Graduando do 5º ano de Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo, Aracaju, SE, Brasil; ²Graduanda do 3º ano de Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo, Aracaju, SE, Brasil; ³Médico Veterinário, Doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE; ⁴Professor do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo, Aracaju, SE, Brasil.

*E-mail: marciocalixtovet@live.com

A grande procura por melhoramento genético faz com que várias técnicas sejam desenvolvidas e aprimoradas no intuito de aumentar a qualidade e conseqüentemente a fertilidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado de garanhões. Os gradientes de seleção de espermatozoides têm se mostrado uma alternativa no melhoramento da qualidade seminal, principalmente separando populações espermáticas com maior potencial fecundante, sendo uma opção para o sêmen criopreservado de garanhões que ainda, necessita de melhores resultados de fertilidade. Objetivou-se avaliar o desempenho do gradiente de seleção Equipure® quanto à qualidade morfológica dos espermatozoides no sêmen criopreservado de garanhões. O experimento utilizou nove garanhões púberes, férteis e em plena atividade reprodutiva. As coletas foram realizadas por meio de vagina artificial modelo Botucatu e as amostras foram filtradas para retirada de impurezas e fração gelatinosa, sendo diluídas na proporção de 1:1 com Botu-sêmen® (Botupharma, Botucatu-SP, Brasil) e, centrifugadas a 600g/10 minutos para retirada do plasma seminal, restando apenas o sedimento rico em espermatozoides. O sedimento foi suspenso com Botu-crio® (Botupharma, Botucatu-SP, Brasil) na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL e envasado em palhetas de 0,5 mL que foram submetidas à tarde criopreservação utilizando-se metodologia passiva e armazenadas em botijão criobiológico. Uma palheta de sêmen de cada garanhão foi descongelada a 46°C/20 segundos, e removida uma alíquota para avaliação (T1). Para a seleção espermática outra amostra (200 µL) foi removida e transferida para o tubo cônico de polipropileno de 15 mL contendo 200 µL de Equipure® (Nidac, Botupharma, Botucatu-SP, Brasil) e, submetidas à centrifugação (300g/20 minutos) em centrífuga de rotor móvel obtendo-se duas frações correspondentes ao sobrenadante (T2) e ao sedimento (T3). As amostras (T1, T2 e T3) foram submetidas à análise de morfologia espermática, sob microscopia de imersão, após a transferência de 2µL de cada amostra para lâminas para confecção de esfregaço e coloração com panótico rápido. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das amostras (T1, T2 e T3) foram contrastadas entre si, com o método dos quadrados médios mínimos com ajuste de Tukey expressando 95% de confiança. A análise evidenciou influência significativa ($p < 0,05$) da amostra sobre os defeitos totais e maiores. Amostras do T3 apresentaram menor porcentagem de defeitos totais e maiores (28,61 e 14,55%) quando comparadas àquelas do T1 (48,61 e 28,72%) e T2 (53,94 e 33,44%) respectivamente. Não foi identificada influência significativa ($p > 0,05$) das amostras sobre os defeitos menores não havendo diferenças entre elas (T1=19,88%; T2=20,50%; T3=14,50%). Conclui-se que o gradiente Equipure® é eficiente na seleção de espermatozoides morfológicamente superiores, demonstrando ser uma alternativa para melhoria da qualidade do sêmen congelado de equinos.

Palavras-chave: biotecnologia, equino, fertilidade, gradiente de densidade, reprodução.

Keywords: *biotechnology, equine, fertility, density gradient, reproduction.*



Diagnóstico de endometrite através da avaliação ultrassonográfica e histopatológica em úteros de éguas localizadas nas regiões do Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco

Diagnosis of endometritis through ultrasonographic and histopathological evaluation in uteros of mares located in Agreste and Zona da Mata regions of state of Pernambuco

Ewerton Renner Gomes de Oliveira*, Andreza Viana Rodrigues, Táyrlla Polessa Rodrigues Silva, Stephanie Caroline Gueiros Silva, Breno Barros Santana, Isabela Lira Carreiro, Márcia Bersane Araújo de Medeiros Torres, Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE, Brasil.

*E-mail: Ewerton_cumaru@hotmail.com

A eficiência de um programa de biotecnologia da reprodução na fêmea equina, está intimamente relacionada com a habilidade do útero em manter um ambiente compatível com o desenvolvimento do embrião e manutenção da gestação. A endometrite é a principal causa de subfertilidade ou infertilidade em éguas, gerando grandes transtornos econômicos e despertando o interesse de muitos pesquisadores em todo mundo. Diversos métodos são utilizados para o diagnóstico da enfermidade como a ultrassonografia, citologia, cultura microbiológica e exame histopatológico. Objetivou-se com esse estudo diagnosticar endometrite em éguas através da ultrassonografia e histopatologia uterina em 25 éguas da região do Agreste Meridional e Zona da Mata do Estado de Pernambuco. As éguas foram examinadas por palpação retal e ultrassonografia. Posteriormente foram coletadas amostras uterinas para biópsia endometrial através de pinça tipo Yeoman e conservada em formalina a 10%, seccionadas em micrótomo a 3µm e coradas com hematoxilina – eosina e Tricrômio de Masson. Das 25 éguas coletadas, 9 (36%) não apresentavam alterações clínicas à palpação retal ou ao exame ultrassonográfico, enquanto que as demais 16 (64%) apresentaram algum tipo de alteração. No exame histopatológico, segundo a classificação de Kenney et al (1978) onde classifica a biópsia endometrial em grau I, II e III de acordo com o grau de inflamação e fibrose: Grau I: 80 – 90% das éguas podem levar a gestação a termo; Grau IIA: 50 - 80%; Grau IIB: 10 - 50% e Grau III: 10%. Das 25 amostras examinadas, 68% (17 amostras teciduais) foram classificadas no grupo I, 28% (7/25) das amostras classificadas no grupo IIA e 4% (1/25) no grupo IIB estando o grau inflamatório intimamente relacionando com a presença ou ausência de neutrófilos nas regiões do extrato compacto do endométrio. Neste trabalho os resultados obtidos como alternativa diagnóstica por meio da coloração Tricrômio de Masson não alcançou o resultado esperado quando comparado com a coloração de hematoxilina-eosina. Concluímos que o diagnóstico preciso, do complexo endometrite/endometrose nas éguas além de melhorar os índices reprodutivos, contribui para maior conhecimento sobre os mecanismos por trás destes processos e direcionar ações terapêuticas no intuito de reverter ou retardar a evolução dessas afecções.

Palavras-chave: equino, biópsia, endometrite.

Keywords: equine, biopsy, endometritis.



Diferenciação genital em conceptos equinos machos e fêmeas

Genital differentiation in male and female equine conceptuses

**Gustavo S S Matias^{1*}, Rodrigo S.N. Barreto¹, Patricia Romagnoli¹, Andrea M. Mess¹,
Náthia N. Rigoglio¹, Taís H.C. Sasahara², Luciana S. Simões¹, Paula Fratini¹, Júlio C.F. Jacob³,
Eduardo L. Gastal⁴, Maria A. Miglino¹**

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Franca, Franca, SP, Brasil; ³Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasi; ⁴Department of Animal Sciences, Food and Nutrition, Southern Illinois University, Carbondale, EUA.

*E-mail: gustavoschiavom@gmail.com

Em equinos a gestação é caracterizada por altos níveis de estrógeno no plasma sanguíneo materno. Esse estrógeno é produzido a partir de aromatização, na placenta, de seus precursores que foram produzidos pelas gônadas equinas fetais. Associado a este fenômeno há uma rara condição de hiperplasia das gônadas fetais, principalmente a partir do segundo terço gestacional. Entretanto, não há um detalhamento morfofuncional para entendimento desse mecanismo. Ainda, a literatura a respeito, nas fases iniciais do desenvolvimento gonadal, é escassa. Portanto, esse trabalho tem como objetivo descrever o desenvolvimento gonadal de conceptos equinos durante o primeiro terço gestacional. Para tanto, utilizamos 19 conceptos equinos, machos e fêmeas, entre os dias 20 e 139 de gestação para avaliar sua estrutura anatômica e histológica, lançando de técnicas de rotina, como também de estereologia e imunohistoquímica. Nós pudemos observar que a diferenciação sexual das gônadas ocorre entre os dias 45 e 50 de gestação, onde tem início a organização de cordões de células germinativas no parênquima gonadal. Sendo que tais cordões são principalmente periféricos nas fêmeas e distribuídos por todo parênquima gonadal nos machos. A hiperplasia gonadal inicia-se por volta do dia 80 da gestação, sendo que aos 90 dias de gestação os ovários são maiores que os testículos; evidenciado por maior acúmulo de áreas ricas em tecido intersticial nos ovários. O menor nível de hiperplasia das células intersticiais no testículo sugere uma maior eficiência testicular na produção de precursores de estrógenos; como apresentado por outros autores, que há maior produção desses precursores por grama de testículo quando comparado aos ovários. Em paralelo, os ovários têm diferenciação mais precoce das células germinativas, mostrado pelo decréscimo de presença de DAZL e OCT4, caracterizando a perda do estado indiferenciado de oogônia para folículo primordial, além do início da prófase da meiose. Em conclusão, a maior hiperplasia do ovário e a suposta maior eficiência testicular em produção de precursores de estrógeno sugere que as diferenças morfofuncionais entre os sexos são maiores do que atualmente descritas.

Palavras-chave: ovário, testículo, desenvolvimento genital, gonadotrofina coriônica equina.

Keywords: ovary, testis, horse, genital development, equine Chorionic Gonadotrophin.



Efeito da seleção espermática sobre a viabilidade dos espermatozoides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo de garanhões

Effect of sperm selection on the viability of cryopreserved sperm retrieved from the tail of the stallion epididymis

Gabriel Augusto Monteiro^{1*}, Deborah Freitas Silva¹, Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva², Edjalma Rodrigues da Silva Junior², Camila de Paula Freitas-Dell'aqua², Frederico Ozanam Papa²

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil;

²Departamento de Reprodução animal; FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

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

A colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo pode ser a última chance de preservação espermática quando ocorre morte súbita ou lesão grave em garanhões de alto valor genético, dessa forma, a seleção de espermatozoides é um método com grande potencial para melhorar o aproveitamento reprodutivo, visto que, realiza a separação dos espermatozoides com motilidade progressiva e para isso utiliza a centrifugação em gradientes de densidade. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito da seleção espermática por meio do gradiente (Equipure[®]) sobre a qualidade dos espermatozoides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo. Foram utilizados 12 garanhões clinicamente saudáveis. Imediatamente após a orquiectomia foi realizada a colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo, foram diluídos com o diluente BotuSêmen[®] e centrifugados a 600xg por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso com o diluente Botu-Crio[®] na concentração de 200 milhões de espermatozoides/ mL. Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as mesmas foram colocadas em geladeira Minitub[®] a 5°C por 20 min e depois dispostas horizontalmente a 6,0 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 min, sendo posteriormente imersas no mesmo. Por fim, acondicionadas em botijão criobiológico (-196° C). Duas palhetas de cada garanhão foram descongeladas a 37°C por 30 segundos. A seleção espermática foi realizada com 5 ml do gradiente de densidade Equipure[®], centrifugado a uma velocidade de 400xg por 20 min e o pellet com os espermatozoides selecionados foi aspirado, separado e ressuspenso com o diluente Botucrio[®] até atingir a concentração de 50 x 10⁶ espermatozoides / ml. Os espermatozoides foram avaliados por método computadorizado antes e após serem selecionados por gradiente de seleção. Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (PM; %), velocidade linear progressiva (VSL; µm/s), velocidade curvilínea (VCLµm/s), espermatozoides rápidos (RAP; %) e integridade membrana plasmática (IMP; %) por microscopia de epi-fluorescência. O grupo controle (CT) e o grupo de espermatozoides selecionados (EQ) apresentaram os seguintes valores, respectivamente: MT (47,8% e 47,8%); MP (17,8% e 21,0%); VAP (90,8% e 92,5%); VSL (69,1% e 73,1%); VCL (167,1% e 167,1%); RAP (33,7% e 34,2%) e IMP (31,3% e 31,1%). Não foi observada diferença significativa nos parâmetros de cinética espermática e IMP dos espermatozoides da cauda do epidídimo antes e após a seleção espermática. Logo, conclui-se que a seleção espermática dos espermatozoides criopreservados recuperados da cauda do epidídimo não apresentou vantagem na viabilidade destes.

Palavras-chave: Cinética espermática, equinos, integridade de membrana, sêmen.

Keywords: Equine, membrane integrity, semen, sperm kinetic.



Efeito do *Saccharomyces cerevisiae* no tratamento de diarreia do cio do potro

Effect of Saccharomyces cerevisiae on foal heat diarrhea treatment

Lucas Facundo Moura Tobal¹, Avaniel Marinho da Silva², Gilvannya Gonçalves de Sobral¹, Sandra Lacet Victalino de Mello³, Maria Clécia Machado Costa¹, Breno Barros de Santana^{1,*}, Marcelo Mendonça¹, Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹UFRPE/UAG Garanhuns, PE, Brasil; ²HEBRON Farmaceutica Caruaru, PE, Brasil; ³Veterinária autônoma, Macaé, RJ, Brasil.

*E-mail: brenobarrossantana@hotmail.com

A diarreia denominada do cio do potro que é considerada a causa mais comum de diarreia nos potros neonatos, desenvolve-se geralmente dos quatro aos catorze dias de idade, o que frequentemente é correspondido ao primeiro estro da égua após o parto. Trata-se de uma diarreia transitória, entretanto, pode levar a desconforto, perda de peso e estresse. Objetivou-se com esse trabalho testar a eficácia do tratamento através de probióticos a base de *Saccharomyces cerevisiae* (Florax®) na melhoria dos principais parâmetros fisiológicos nos potros afetados, minimizando assim os efeitos negativos dessa diarreia. Foram utilizados 40 potros, provenientes de Haras localizados nos municípios de Macaé-RJ, Garanhuns e Gravatá-PE. Todos os animais seguiram o mesmo manejo alimentar e foram submetidos à avaliação clínica para comprovação de higidez e possibilidades de participar do delineamento experimental, de acordo com os parâmetros fisiológicos. Foram feitas duas aplicações por via oral do probiótico a base de *Saccharomyces cerevisiae*, em torno do sétimo ao décimo quarto dia após o nascimento e aparecimento dos sintomas, utilizando-se dois flaconetes por aplicação. Cinco animais foram aleatoriamente alocados como grupo controle e estes tomaram soro fisiológico como placebo via oral, enquanto que os demais entraram no grupo tratamento (tomando o probiótico - Florax®, Hebron) Foram feitos em uma unidade amostral dos animais (6), hemogramas, leucograma e parasitológico de fezes no D7 e no D10, descartando assim a possibilidade de outra causa etiológica para a diarreia. Todos os 40 animais apresentaram diarreia, e destes, 6 (15%) animais apresentaram um quadro de diarreia mais grave, sendo medicados com antibiótico, soroterapia, e 4 deles vieram a óbito apresentando sintomas de uveíte e pneumonia. No grupo controle, não houve nenhum óbito. Os 34 animais (85%) do grupo tratamento apresentaram uma diferença na consistência nas fezes de líquida para pastosa, em até no máximo 48 horas após a administração do probiótico. Os animais da unidade experimental não apresentaram nenhuma alteração em relação ao hemograma e leucograma, se mantendo nos parâmetros aceitáveis, indicando que nenhuma causa infecciosa foi acometida da etiologia da diarreia naquela amostragem. O exame parasitológico de fezes apresentou resultado negativo para *Strongyloides westeri* e *Parascaris equorum* indicando que a diarreia não foi por causa parasitária. A utilização de probióticos a base de *Saccharomyces cerevisiae* foi eficiente em 85% dos potros estudados no tratamento de diarreia do cio do potro na melhora dos principais parâmetros fisiológicos, minimizando assim os efeitos negativos desta diarreia em potros que podem vir a comprometer o desenvolvimento futuro desses animais com consequente impacto econômico. Nos casos de diarreia grave não houve uma melhora do quadro com o uso do probiótico nem tampouco com o uso de antibioticoterapia. Os animais do grupo controle, sem tratamento, se recuperaram da diarreia em aproximadamente 10-12 dias enquanto que o grupo tratamento com 48 horas da administração já apresentaram melhoras na consistência das fezes. Essa diarreia que aparentemente apresentou uma melhora sem tratamento no grupo controle pode levar a uma queda da imunidade o que pode comprometer o desenvolvimento e performance desses animais no futuro. Maiores estudos são necessários para entender os casos de diarreias mais graves que aparentemente diferem dos sintomas clássicos da diarreia do cio do potro para minimizarmos casos de mortalidade de potros nos criatórios.

Palavras-chave: neonatologia, equino, diarreia.

Keywords: neonatologia, equine, diarrhea.

Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response and spermatic transport in mares inseminated with frozen semen

Efeito da dose e sitio da inseminação na resposta inflamatória uterina e transporte espermático em éguas inseminadas com sêmen congelado

Nicolas Cazales^{1,2*,‡}, Daniel Cavestany¹, Rodrigo Costa Mattos²

¹Departamento de Reproducción animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay; ²Reprolab-Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinaria, UFRGS, Brasil.

*E-mail: nicolascazales@hotmail.com

Rectally controlled deep intracornual artificial insemination (AI) is a commonly used technique with frozen stallion semen. It is unclear whether this practice causes more or less inflammation of the endometrium than conventional AI within the uterine body or whether could improve the spermatic transport. Since frozen/thawed semen induces a pronounced inflammatory response and results in low pregnancy rates for many stallions, it is important to determine whether AI deep into the uterine horn causes more problems in uterine clearance than conventional AI. This study compared the endometrial inflammatory reactions and the spermatic transport of mares inseminated with two different doses of frozen-thawed semen in the tip of the uterine horn (UH) ipsilateral to the preovulatory follicle with those of mares inseminated into the uterine body (UB) at 2 and 12 hours after insemination. Experimental subjects were forty-eight estrous mares with a dominant follicle ≥ 35 mm in diameter and no neutrophils detected in the uterine smears. Each mare was randomly assigned to receive one of the following intrauterine treatment: insemination with 50×10^6 sperm/0.5 ml into UB (2h n= 6; 12h n= 6); 50×10^6 sperm/0,5 ml into the UH (2h n= 6; 12h n= 12); 400×10^6 sperm/4 ml into the UB (2h= 6; 12h n= 6) or 400×10^6 sperm/4 ml into the UH (2h n= 6; 12h n= 6). Mares were humanly slaughtered at 2 or 12 hours after insemination. Oviducts were separated from the uterus, and uterus and oviducts were then flushed with phosphate-buffered saline (PBS). A sample of each tubal flushing was examined for sperm count, and a sample of each uterine flushing was examined for polymorphonuclear neutrophils (PMN) count in a hemocytometer chamber. At 2 hours after insemination no significant difference in the inflammatory reaction were detected in either local of insemination UH or UB ($p= 0,654$), whereas the mares inseminated with 400×10^6 sperms had greater number of PMN than mares inseminated with 50×10^6 sperms ($p= 0,001$). At 12 hours, UH insemination with 400×10^6 presented less PMNs than mares inseminated in the UH with 50×10^6 , UB with 50×10^6 and UB with 400×10^6 ($p= 0,009$). At 12 hours after insemination, the inflammatory reaction decreased with increasing sperm dose and volume ($p=0.02$). This study shown that insemination in the UH with 400×10^6 presented less inflammatory reaction at 12 hours after insemination and higher percentage of mares with sperm cells in their oviducts ($p= 0,069$). It seems, that deposition of sperms into the tip of the UH facilitate the spermatic transport. So, when we use a low insemination dose like 50×10^6 it is important the place of insemination whereas with higher doses like 400×10^6 no difference we found between UH or UB in the spermatic transport. It is concluded that the site of insemination and the total sperm number affects the endometrial inflammatory reaction and the spermatic transport with frozen thawed semen.

Keywords: Inflammation, Frozen semen, PMN.

Palavras-chave: Inflamação, sêmen congelado, PMN.

[‡]Bolsista CAPES/UDELAR.



Eficácia da solução coloidal na filtragem do sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Colloidal solution efficiency in filtering cryopreserved semen of stallions of Mangalarga Marchador breed

**Isadora Martins Fernandes Pereira^{1,*}, Paula Piccolo Maitan², Lucas Pereira Balieiro¹,
Bruna Waddington de Freitas³, José Domingos Guimarães⁴**

¹Graduanda de Medicina Veterinária, Faculdade de ciências e Tecnologia de Viçosa (Univiçosa); ²Doutoranda em Reprodução Animal, Universidade Federal de Viçosa; ³Professora da FACISA/UNIVIÇOSA; ⁴Professor de Reprodução Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

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

A centrifugação com gradiente de densidade vem sendo usada há muitos anos para melhorar a qualidade do sêmen humano como o uso nas biotécnicas de fertilização *in vitro* (FIV) e injeção espermática intracitoplasmática (ICSI). Na FIV de bovinos essa técnica também é utilizada, porém ainda não tão eficaz para a IA nas outras espécies, devido à falta de protocolos adequados e a dificuldade no processamento de grandes volumes de ejaculado de algumas espécies. O uso de uma solução coloidal capaz de separar por filtragem os espermatozoides viáveis dos não viáveis vem sendo utilizada em maior escala em sêmen fresco e refrigerado, e em menor escala no sêmen congelado de garanhões. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi verificar a eficácia de uma solução coloidal na filtragem do sêmen congelado de garanhões da raça Mangalarga Marchador por meio da análise de viabilidade de membrana plasmática (por meio da sonda fluorescente iodeto de propídeo) e acrossomal (por meio da sonda fluorescente FITC-PSA) via citometria de fluxo, da população espermática filtrada e presente no sobrenadante. As variáveis foram analisadas pelo teste t pareado. Após a centrifugação verificou-se que o sobrenadante reteve a maior porcentagem de espermatozoides com algum tipo de lesão ou desordem metabólica em relação aos espermatozoides centrifugados (porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesionada presentes no sobrenadante - $71,2 \pm 1,3$; e no centrifugado - $48,6 \pm 2,0$; porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesionada no sobrenadante $94,4 \pm 0,4$; e no centrifugado - $77,7 \pm 1,3$). Isso indica que a solução coloidal é eficaz na seleção de espermatozoides viáveis criopreservados, podendo ser utilizada no sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: equino, espermatozoides, viabilidade.

keywords: equine, sperm, viability.



Hidrocele associada a orquite em *Equus asinus* marchador – relato de caso

Hydrocele associated with orchite in jumento marchador - case report

Jennifer Muñoz Castellaneta Peter¹, Liédge Camila Simioni Felício^{1,2*}, João Filipi Scheffer Pereira^{1,2}, Gabriel Barcellos Felício³, Luiz Ernandes Kozicki², Ana Paula Kaminski², Emanoele Rebeca Gomes¹, Alessandra Lazarin¹

¹Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Brasil; ²Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil; ³Médico Veterinário Doutor em Reprodução Animal.

*E-mail: liedge@hotmail.com

A hidrocele é caracterizada pelo acúmulo anormal de fluido seroso e de coloração âmbar no interior da túnica vaginal do testículo. Os animais acometidos apresentam edema escrotal de origem inflamatória ou não. O volume acumulado geralmente encontra-se entre 100 a 1000 mL. Geralmente consiste em um transudato com aspecto seroso e coloração âmbar. Após um trauma testicular as prostaglandinas aumentam o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, que associadas às citocinas alteram o centro termorregulador resultando no extravasamento de fluidos e proteínas do espaço vascular para o interstício, ocasionando um edema local e orquite. A orquite é uma reação inflamatória testicular que apresenta na fase aguda, aumento de tamanho, calor, dor, flacidez, hemorragia e necrose no parênquima testicular. A ocorrência de alterações no trato reprodutivo de machos é uma situação alarmante durante a estação reprodutiva, podendo resultar em alteração na potência *coeundi* e *generandi*, necessitando monitoramento e avaliação periódica do reprodutor. O objetivo desse relato é expor um caso de hidrocele associada a orquite por trauma em um jumento marchador. Foi realizado um atendimento no Hospital Veterinário da Universidade Tuiuti do Paraná de um jumento marchador, 12 anos de idade. O animal apresentava aumento do volume escrotal, exposição de pênis e sensibilidade local. À anamnese o proprietário relatou que o animal estava sendo utilizado para cobertura de 1 a 3 vezes/semana, sendo observado aumento de volume no escroto há 3 dias. No exame clínico geral foi verificado que o animal apresentava aumento de temperatura (40.2 °C) e os demais parâmetros normais. O animal foi submetido a exames hematológicos e ultrassonográficos (US) da genitália externa. Considerando o histórico, a avaliação clínica, a ultrassonográfica e a hematológica, foi diagnosticado hidrocele associada ao processo de orquite. O tratamento inicial foi baseado na administração de flunixin meglumine 1,1 mg/kg e dexametasona 0,01 mg/kg (ambos IV) 1x/dia/3 dias e 20 min de ducha fria local por 7 dias. Após 7 dias, ao exame clínico foi verificado redução nos sinais inflamatórios locais, porém ao exame US ainda era observado um líquido acumulado na túnica vaginal, sendo então feita a aspiração do líquido com agulha fina 0,70 x 0,30 guiada pelo ultrassom. Na sequência foi administrado mais 3 dias de dexametasona 0,01 mg/kg de peso. Após 25 dias, o macho apresentava ausência de edema no escroto e parênquima testicular com ecogenicidade homogênea. O exame ultrassonográfico foi essencial para caracterização da lesão e realização de diagnóstico diferencial. A associação de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais utilizados tiveram efeito sinérgico, reduzindo os sinais clínicos da inflamação em função de que estes fármacos atuam em diferentes locais na cascata inflamatória. Concluiu-se que o tratamento instituído logrou sucesso, reduzindo os sinais inflamatórios e proporcionando uma drenagem eficiente. Posteriormente o reprodutor foi avaliado periodicamente e respondeu a abordagem terapêutica, com prognóstico favorável.

Palavras-chave: Hidrocele, Orquite, *Equus asinus* marchador.

Keywords: Hydrocel, orchite, *Equus asinus* marchador.



Histerectomia em égua da raça Mangalarga com piometra crônica: Relato de Caso *Hysterectomy in Mangalarga mares with chronic pyometra: Case Report*

Felipe Erison Medrado Rocha de Sousa*, Lucas Troncarelli Rodrigues, Lucas Emanuel Ferreira Canuto, Nereu Carlos Prestes

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

*E-mail: felipeerison10@hotmail.com

Piometra é definida como acúmulo de pus no interior do útero, com persistência do corpo lúteo nesta espécie animal. A histerectomia constitui-se em um dos maiores desafios em termos de acesso cirúrgico na espécie equina, podendo ser total ou parcial em casos de tumores. Sua indicação mais comum é para piometra crônica que não responde a terapia preconizada. Outras indicações são torção uterina, neoplasias, rupturas de impossível síntese e raramente, aplasia segmentar com acúmulo de secreção. O presente relato trata-se de um equino fêmea, da raça Mangalarga, 23 anos de idade, pesando 470 kg, atendido no setor de grandes animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, tendo sido a segunda intervenção similar em 54 anos. O citado animal havia apresentado parto distócico há dois anos sendo submetido a uma fetotomia em outro hospital veterinário e como consequência de um puerpério negligenciado com relação as consequências da intervenção, apresentou laceração cervical grave, dentre outras sequelas, com perda da conformação anatômica e total cicatrização de sua abertura natural tendo acumulado lóquios que progrediram para piometra. Um ano após, o animal foi atendido em um hospital veterinário particular, tendo sido rompida a membrana obliterante e drenado o material purulento. Preconizou-se tratamento intensivo padrão para esta situação, baseado no cultivo e antibiograma do material coletado naquele momento, porém o mesmo mais uma vez foi negligenciado havendo nova reação cicatricial do anel cervical em grau superior ao anteriormente verificado. Passado vários meses o animal foi encaminhado ao HV Botucatu, submetida a exame ginecológico completo com diagnóstico definitivo de piometra de impossível resolução técnica, restando como última opção a histerectomia com a concordância do proprietário, que foi devidamente esclarecido. Após os procedimentos pré anestésicos e operatórios o animal foi submetido à cirurgia tomando-se o cuidado de coletar material para eventual futura clonagem e preservação de ambos os ovários, tendo em vista o vislumbre de no futuro utilizar-se da biotecnologia para perpetuação do potencial genético da égua. No trans-operatório pela impossibilidade de expor o útero volumoso, houve a necessidade da drenagem do conteúdo totalizando 22 litros de material purulento expesso e inodoro. No pós-operatório foi instituído cuidados com a ferida cirúrgica, antibióticoterapia, antiinflamatório-analgésico e exame físico completo diário bem como exames laboratoriais, que demonstraram valores flutuantes no decorrer de oito dias. Uma vez estabilizado todos os parâmetros, os pontos foram removidos no 10º dia tendo sido dado alta ao mesmo.

Palavras-chave: égua, aderência cervical, piometra, histerectomia.

Keywords: mare, cervical adhesion, pyometra, hysterectomy.



Imunoexpressão da proteína de choque térmico HSP90 no endométrio de éguas *Immunoexpression of heat shock proteins HSP90 in mare's endometrium*

Ana Camacho Benítez¹, Rossana Vasconcellos², Paula Lombide³, Graciela Pedrana^{3,*}

¹Professional Student in Development, Postgraduate Program, Faculty of Veterinary Medicine, Montevideo, Uruguay;

²Degree student, Faculty of Veterinary Medicine, Montevideo, Uruguay; ³Lecturer of Histology and Biology of Development, Faculty of Veterinary Medicine, Montevideo, Uruguay.

*E-mail: gpedrana@gmail.com

Heat shock proteins (HSPs) play an essential role in cells, being expressed both in physiological conditions as well as in pathophysiological conditions in prokaryotic and eukaryotic cells. The expression of the HSP90 protein in human endometrium was associated with the expression of hormonal steroid receptors. However, in mare endometrium the expression patterns of HSP90 has not yet been described. Therefore the aim of the present study was to determine the expression of HSP90 in mare's endometrium during both reproductive and anoestrus period. Endometrial biopsies were collected in adult quarter horses mares during anoestrus, oestrus and dioestrus. Endometrial samples were formaldehyde fixed and paraffin embedded. Histological sections of 5 µm thickness were obtained to perform immunohistochemistry against HSP90 protein using mouse monoclonal antibody. Endometrial microscopic images were obtained and percentage (%) of HSP90 immunostaining area in the surface lining epithelium, glands and endometrial connective stroma were analysed by image analysis. The results were expressed as mean ± standard error, compared by analysis of variance considering significant differences when $P < 0.05$. HSP90 immunoexpression was localized in the endometrial lining epithelium in perinuclear region of basal cells, and the immunostaining area was higher in oestrus than dioestrus and anoestrus. However, no differences were observed in the immunostaining area in the endometrial lining epithelium between mares in anoestrus and dioestrus. Concerning endometrial glandular epithelium, HSP90 was localized in supranuclear region of cells, and occasionally in cells nuclei in overall periods analysed. The HSP90 immunostaining area in endometrial glands was higher in the oestrus than dioestrus and anoestrus. In addition in the immunostaining area in endometrial glands in dioestrus was higher than anoestrus. Regarding the endometrial connective stroma, HSP90 was localized in the cytoplasm of mesenchymal cells, in all periods. No differences were registered between anoestrus and oestrus in relation to stroma HSP90 immunostaining area, and both were higher than dioestrus. Altogether the immunoexpression of HSP90 protein in the endometrium was higher in oestrus than in both dioestrus and anoestrus, increasing during the proliferative phase compared to the secretory phase. Our results agree with previous studies in human endometrium, showing that HSP90 is involved in the functional regulation of sex steroid hormones that modulate the oestrus cycle. We suggest that the increase in HSP90 protein immunoexpression during oestrus period might be due to an upregulation of estrogen receptors to HSP90. We conclude that given the role of the HSP90 and the observed changes in its expression during the oestrus, dioestrus and anoestrus, it should mediate important reproductive process of mares. Moreover, HSP90 protein in endometrial tissue should determine an adequate environment in the uterus for embryo implantation. Consequently, we suggest HSP90 regulate crucial cellular process as differentiation, proliferation and cell death in lining and glandular epithelium in the endometrium in mare. Finally, our results will provide the basis for future comparative analyses of the expression of HSP90 in mare's endometrium under different reproductive dysfunctions, sub nutrition environments and other pathological conditions.

Palavras-chave: proteína de choque térmico, endométrio, éguas.

Keywords: *heat shock protein, endometrium, mares.*



Inclusão de colesterol e seus efeitos nos parâmetros de motilidade total e progressiva de espermatozoides criopreservados de jumentos da raça Pêga

Cholesterol inclusion and its effects on total and progressive motility parameters of Pêga donkeys cryopreserved spermatozoa

Flávia Vieira de Freitas^{1*}, Maria Eduarda Borges Figueira², Thiago Augusto Teles de Souza², Cristian da Silva Teixeira², Larissa Marques de Oliveira², Bruna Waddington de Freitas², Carlos Mattos Teixeira Soares², Simone Maria Massami Kitamura Martins¹, Marina da Silva Passarelli¹, Mariana Andrade Torres¹, André Furugen Cesar de Andrade¹, Giovanni Ribeiro de Carvalho²

¹Núcleo de Pesquisa em Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), USP, Pirassununga, SP, Brasil;

²Setor de Equideocultura, Departamento de Zootecnia (DZO), UFV, Viçosa, MG, Brasil.

*E-mail: flavia.vet10@gmail.com

A criopreservação do sêmen pode ocasionar injúrias aos diversos compartimentos da célula espermática, comprometendo seu potencial fertilizante. A membrana plasmática (MP) parece ser a estrutura mais vulnerável aos efeitos deletérios da criopreservação e, considerando sua importante funcionalidade para a célula, qualquer dano à MP pode ocasionar alteração da função celular, comprometendo o processo de fertilização. Um dos principais desdobramentos da lesão à MP é a piora dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides. Neste sentido, a inclusão de colesterol à MP de espermatozoides de jumentos se destaca por promover maior estabilização desta estrutura ao longo do processamento do sêmen precedente a criopreservação, viabilizando melhores parâmetros pós-descongelamento. O presente estudo foi conduzido com o intuito de avaliar os efeitos da inclusão de colesterol à MP de espermatozoides criopreservados de jumentos nos parâmetros de motilidade total e progressiva. Foram utilizadas 5 colheitas de sêmen de 5 jumentos da raça Pêga, com idade entre 3 e 10 anos e peso médio de 300 Kg. Após as avaliações do sêmen in natura, este foi dividido em duas alíquotas, destinadas ao grupo controle (GC) e o grupo tratado (GT). O sêmen do GC foi diluído em meio à base de leite em pó (Botu-Sêmen[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) em proporção 1:1, centrifugado a 600 g durante 15 minutos, ressuspenso com meio à base de gema de ovo (Botu-Crio[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) para obtenção de concentração de 200 x 10⁶ espermatozoides/mL, envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, refrigerado à 5°C durante 20 minutos, mantido a 4 cm do vapor de nitrogênio durante 15 minutos e mergulhado em nitrogênio líquido para congelamento do sêmen. O sêmen do GT foi previamente incubado com 1,5 mg de ciclodextrina carregada com colesterol a cada 120 x 10⁶ espermatozoides/mL durante 15 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Após este tempo, o sêmen do GT foi diluído em meio à base de leite em pó (Botu-Sêmen[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) em proporção 1:1 e procedeu-se com as mesmas etapas de criopreservação do GC. Para avaliação dos parâmetros de motilidade total e progressiva, as palhetas foram descongeladas em banho-Maria à 37° C durante 30 segundos, e analisadas em sistema automatizado de análise de sêmen (SCA- Microptic, Microptic S.L., Barcelona, Spain). Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc., 2010). Houve diferença estatística (p<0,05) para a motilidade total entre o GC (29,92% ± 2,76) e o GT (17,33% ± 1,49), assim como para a motilidade progressiva do GC (12,44% ± 1,20 e do GT (5,33% ± 0,56). Estes resultados evidenciam que a incorporação de colesterol ao sêmen de jumentos, na concentração utilizada, não foi capaz de melhorar os parâmetros de motilidade, o que poderia ser justificado pela interação do colesterol com outros compartimentos espermáticos, afetando o aparato contrátil do flagelo e, consequentemente, a motilidade total e progressiva. Diferentes concentrações de colesterol devem ser testadas para determinação da quantidade mais apropriada a ser incubada ao sêmen de jumentos.

Palavras-chave: jumento, colesterol, espermatozoide.

Keywords: donkey, cholesterol, spermatozoa.



Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de asininos da raça Pêga

Electrophoresis of seminal plasma proteins of Asinine Pêga

Lais Ângelo de Abreu^{1*}, Pedro de Almeida Rezende Fumagalli¹, Thiago Victor Damasceno Teixeira², Arabela Guedes de Azevedo Viana³, Antônio Carlos de Albuquerque Teles Filho³, Sandro Estevan Moron⁴, Arlindo de Alencar Araripe Moura⁵, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes⁶

¹Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, TO, Brasil; ²Acadêmico do Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; ³Doutorando em Medicina Veterinária Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; ⁴Professor no Curso de Biologia, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, TO, Brasil; ⁵Professor no Departamento de Zootecnia, Laboratório de Fisiologia Animal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil; ⁶Professor no Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, TO, Brasil;

*E-mail: laisangeloabreu@hotmail.com

O presente trabalho teve como objetivo identificar o perfil das proteínas do plasma seminal de jumentos da raça Pêga. Foram utilizados quinze jumentos adultos, com peso e circunferência escrotal média de 243 Kg e 30,5 cm, respectivamente. Os animais foram criados em propriedades do estado do Tocantins e sul do Pará, Brasil. As amostras de sêmen foram coletadas através de vagina artificial. As amostras de sêmen foram centrifugadas durante 10 minutos a 600 g para separação do plasma seminal e este, acondicionado em nitrogênio líquido. Para fins de comparação com o padrão das proteínas do plasma seminal dos jumentos Pega, no presente estudo, também selecionou-se amostras de sêmen de cinco equinos adultos da raça Quarto de Milha, com circunferência escrotal média de 51,3 cm. As proteínas do plasma seminal dos jumentos e garanhões foram submetidas à eletroforese unidimensional, utilizando-se 12% de acrilamida, utilizando-se 30 µg de proteína total por amostra. A corrida do gel foi mantida em 500V, 75mA e 90W. Os géis foram corados com Coomassie Blue coloidal e as imagens, digitalizadas e analisadas através do aplicativo *Quantity One*® (Bio Rad, USA). Para o presente estudo, foram realizados três géis de poli-acrilamida. Os géis 1 e 2 apresentam a avaliação de oito e sete jumentos, respectivamente, e no gel 3, três jumentos e cinco equinos. Os dados foram analisados através do programa SAS. O sêmen obtido dos jumentos apresentou, em média, concentração de 285.7×10^6 espermatozoides/mL, vigor 4 e 80% de motilidade espermática progressiva. O sêmen obtido dos equinos apresentou média de 158×10^6 espermatozoides/mL, vigor 3,8 e 78,3% de motilidade progressiva. Foram detectadas, em média, 22 e 20 bandas nos géis com plasma seminal de jumentos e equinos, respectivamente. As proteínas mais abundantes detectadas nos géis com jumentos apresentaram peso de 66 kDa, semelhante ao da albumina. Esta proteína está presente no plasma seminal de várias espécies de mamíferos, atuando durante a capacitação e na proteção dos espermatozoides contra processos oxidativos. No gel 3, foram detectadas 18 bandas em comum, sendo que uma não apresentou significância com relação ao valor médio de intensidade ($P < 0,05$). Os jumentos, diferentemente dos equinos, expressam uma proteína de 37 kDa (P2), peso molecular próximo ao da anidrase carbônica e proteínas anti-inflamatórias. A intensidade da banda P2 nos géis 1-D do plasma seminal de jumentos apresentou correlação negativa ($r = -0,15585$; p -value $< 0,05$) com a banda de 12,9 kDa (P13), de peso molecular próximo a β 2-microglobulina e a SFP, que têm expressão no Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I e redução da peroxidação lipídica de membrana, respectivamente. Em conclusão, o presente estudo descreve, pela primeira vez, o padrão eletroforético das proteínas do plasma seminal de jumentos da raça Pêga. Investigações mais avançadas permitirão a identificação do proteoma do plasma seminal desta espécie e avaliar aspectos funcionais e associações das proteínas seminais com parâmetros espermáticos e de fertilidade.

Palavras-chave: Proteômica; biotecnologia; marcador molecular.

Keywords: Proteomics; biotechnology; molecular marker.



Sexagem de embriões equinos pré-implantacionais por reação da cadeia em polimerase (PCR) a partir do DNA livre na blastocele

Preimplantation equine embryo sexing by polymerase chain reaction (PCR) from free DNA in blastocoel fluid

Erica Rodrigues Ferraz de Andrade¹, Luiz Daniel de Barros², Fernanda Saules Ignácio^{3,*}

¹Graduanda Medicina Veterinária, Faculdades Integradas de Ourinhos, Ourinhos, SP, Brasil; ²Professor do Curso de Medicina Veterinária, Faculdades Integradas de Ourinhos, SP, Brasil.

*E-mail: nandasauls@gmail.com

A sexagem pré implantacional garante o planejamento prévio do sexo dos potros agregando e gerando vantagens à programação do criatório e comercialização dos animais. Até o presente momento, a sexagem tem sido realizada pela determinação dos cromossomos sexuais por PCR de células do trofoblasto obtidas por biópsia embrionária. Apesar de eficiente, esta técnica apresenta alto custo devido aos equipamentos laboratoriais caros, o que limita o uso na rotina. O objetivo do presente trabalho foi testar a possibilidade de determinação do sexo dos embriões a partir do DNA livre na blastocele obtido por meio de simples colapso do embrião com agulha hipodérmica. Foram utilizados oito equinos: um macho de fertilidade conhecida e sete fêmeas. As éguas foram acompanhadas ultrassonograficamente para acompanhamento do crescimento folicular, indução da ovulação (1mg de deslorrelina i.m.) quando folículo de 35mm e edema uterino foram identificados e inseminadas 24h após indução. Foram coletados nove embriões blastocisto expandido no D8 (D0 = dia da ovulação). Após serem lavados em 10 gotas de meio TQC HOLDING, cada embrião foi transferido em 50 µL do mesmo meio, onde foi realizado o colapso via perfuração com agulha hipodérmica (0,45X13mm) estéril. Após colapso, o embrião foi removido para que toda a gota fosse aspirada e armazenada à -20°C em microtubo estéril. As células de cinco embriões colapsados foram transferidas para um microtubo para determinação do sexo e comparação dos resultados. Após extração do DNA das amostras de células, foram realizadas duas PCR que amplificam os genes TSPY e AMEL. Cada reação foi composta de 12,5µL de 2X Taq DNA polimerase master mix, 0,2µM de cada primer (forward e reverse), 5µL de DNA da amostra e água ultrapura estéril em um volume final de 25µL. A amplificação das amostras foi realizada de acordo com programação previamente descrita e por meio da utilização do termociclador Veriti (Life Technologies, EUA). Após esta etapa as amostras foram submetidas à eletroforese em ágar gel 3% com brometo de etídio, e lidas através de transluminador (Mini Bis). O resultado da PCR detectou amplificação dos genes em 66,7% (6/9) das amostras de líquido da blastocele e em 100% (5/5) das células dos embriões. Foi possível determinar o sexo em 55,6% das amostras de líquido e 80% das amostras de células, sendo todas machos, no entanto, para um embrião o resultado foi considerado inconclusivo, pois ocorreu a amplificação compatível para ambos os sexos em ambos os genes, tanto para amostras de líquido quanto de células. Todas as amostras que amplificaram tanto nas amostras de líquido e células do mesmo embrião apresentaram concordância nos resultados. Conclui-se que o colapso de embriões equinos blastocistos expandidos com agulha hipodérmica demonstrou-se suficiente para coleta de material suficiente para determinação do sexo do DNA livre no líquido da blastocele em 66,7% das amostras analisadas por PCR no presente trabalho.

palavras-chave: sexagem de embriões, embriões pré-implantacionais, DNA livre, blastocele, PCR.

Keywords: *embryo sexing, preimplantation embryos, free DNA, blastocell, PCR.*



Suscetibilidade dos espermatozoides de garanhão à diferentes desafios oxidativos: papel do plasma seminal

Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma

Thiago L. Souza*, Giulia K.V. Kawai, João R.C. Gurgel, João D.A. Losano, Andressa Dalmazzo, Carolina C. Rocha, Roberta H. Tsunoda, Paola A.A. Góes, Bruno R. Rui, Daniel S.R. Angrimani, Mayra E.O.A. Assumpção, Camila M. Mendes, Valquiria H. Barnabe, Marcilio Nichi

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*E-mail: thiagolezardo@hotmail.com

As espécies reativas de oxigênio (EROs) atuam como gatilhos de diversos eventos fisiológicos do espermatozoide como a hiperativação, capacitação espermática e ligação espermatozoide – oócito. No entanto, um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante caracteriza o estresse oxidativo seminal. Neste contexto, as EROs podem causar danos oxidativos às diferentes estruturas espermáticas, proteínas e lipídios. Além disso, produtos da peroxidação são tão deletérios ao espermatozoide quanto as espécies reativas de oxigênio. Ademais, esta célula é extremamente susceptível ao estresse oxidativo devido à sua baixa quantidade antioxidante intracelular em função de seu citoplasma extremamente reduzido. Além disso, a membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados, facilmente oxidados. Apesar desta susceptibilidade, o plasma seminal (PS) contém diversos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que possuem a função de debelar o excesso de compostos oxidativos. Por outro lado, durante o processo de criopreservação espermática em equinos, a remoção do plasma seminal é uma etapa necessária e conseqüentemente os espermatozoides se tornam mais susceptíveis à danos oxidativos. Uma possível alternativa seria a terapia antioxidante espermática durante a criopreservação. No entanto, para realizar este tratamento torna-se necessário saber qual ERO é mais deletéria ao espermatozoide, com o intuito de direcionar uma terapia antioxidante específica. Baseado nestas assertivas, o objetivo do nosso estudo foi submeter o espermatozoide equino à diferentes desafios oxidativos na presença ou ausência do plasma seminal objetivando detectar qual composto é mais deletério ao espermatozoide, assim como avaliar o papel protetor do plasma seminal contra injúrias oxidativas. Para tanto, ejaculados provenientes de 13 garanhões (N=13) foram divididos em 2 alíquotas (com ou sem plasma seminal). Estas alíquotas foram divididas novamente em 4 frações e submetidas ao desafio oxidativo à diferentes espécies reativas de oxigênio e ao produto da peroxidação lipídica malondialdeído (O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, OH^\cdot : radical hidroxil e MDA: malondialdeído), durante um período de 30 minutos à 37°C. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade e vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal (colorações Eosina-Nigrosina e Fast Green - Rose Bengala, respectivamente), atividade mitocondrial (3'3 Diaminobenzidina) e integridade de DNA (SCSA[®]). Observamos que na presença do plasma seminal o radical hidroxil foi extremamente deletério à motilidade (O_2^- : 30,76±2,76%; H_2O_2 : 31,15±2,05%; OH^\cdot : 23,07±2,86%; MDA: 32,69±2,01), além de aumentar a porcentagem de células com ausência de atividade mitocondrial (OH^\cdot : 61,38±3,88%; MDA: 12,23±1,95%). Por outro lado, na ausência de plasma seminal, o malondialdeído foi altamente prejudicial à motilidade (O_2^- : 28,46±2,55%; H_2O_2 : 30,38±2,29%; OH^\cdot : 6,92±0,90%; MDA: 5,76±3,91%), integridade de membrana plasmática (O_2^- : 50,07±4,53%; H_2O_2 : 46,15±5,43%; OH^\cdot : 50,23±6,31%; MDA: 7,84±4,90%), atividade mitocondrial (Ausência de atividade mitocondrial: O_2^- : 14,07±2,51%; H_2O_2 : 14,76±2,04%; OH^\cdot : 54,76±4,28%; MDA: 84,61±9,31%) e integridade de DNA (Fragmentação de DNA: O_2^- : 3,09±1,49%; H_2O_2 : 2,67±0,92%; OH^\cdot : 92,70±3,25%; MDA: 30,76±11,42%). Estes resultados nos sugerem que o plasma seminal possui um papel protetor contra danos oxidativos causados pelo malondialdeído. De fato, a carnosina (dipeptídeo responsável por debelar o MDA) já foi detectada e quantificada no plasma seminal equino. Portanto, podemos sugerir a terapia com carnosina na criopreservação dos espermatozoides de equinos, objetivando compensar a remoção deste dipeptídeo durante o processamento seminal, e conseqüentemente prevenir danos oxidativos.

Palavras-chave: Antioxidantes, Malondialdeído, EROs, plasma seminal, espermatozoide equino.

Keywords: Antioxidants, Malondialdehyde, EROs, seminal plasma, equine sperm.



Taxa de recuperação embrionária e a idade de éguas submetidas à transferência de embriões com a utilização de sêmen refrigerado

Embryonic recovery rate and age of mares submitted to embryo transfer procedure with the use of refrigerated semen

Liédge Camila Simioni Felício^{1,2,*}, Jennifer Muñoz Castellaneta Peter¹, João Filipi Scheffer Pereira^{1,2}, Gabriel Barcellos Felício³, Luiz Ernandes Kozicki², Ana Paula Kaminski², Emanoele Rebeca Gomes¹, Alessandra Lazarin¹

¹Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Brasil; ²Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil; ³Médico Veterinário Doutor em Reprodução Animal, autônomo.

*E-mail: liedge@hotmail.com

A transferência de embrião equina é uma biotécnica de suma importância para a indústria do cavalo. Uma vez que a versatilidade desta espécie é o principal fator responsável pelo crescimento mundial da equideocultura, esta biotecnologia possibilita o maior desenvolvimento do setor através do ganho na eficiência reprodutiva e no incremento do melhoramento genético, favorecendo o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. Para a seleção da égua doadora deve ser considerado o histórico reprodutivo, a fertilidade e genitores, as diretrizes do registro da raça, o valor potencial do potro resultante, e o número de gestações desejadas. A relação negativa entre o avançar da idade e a fertilidade na égua torna-se evidente, embora os motivos ainda não estejam elucidados. O objetivo do estudo foi avaliar a idade de éguas doadoras de embrião em relação a taxa de recuperação embrionária durante a estação de monta. A pesquisa foi realizada com diferentes raças de éguas na região metropolitana de Curitiba e no interior de São Paulo. Foram analisados 96 dados de colheitas entre os anos de 2016 e 2017 de 26 éguas doadoras. Neste trabalho foi utilizado a inseminação artificial com sêmen refrigerado (5°C) e os embriões recuperados entre os dias 6 e 9 após a ovulação. Foram constituídos três grupos de animais de acordo com intervalos de idade: Grupo 1 (G1;n=4) éguas jovens entre 2 e 4 anos e tiveram 80% de recuperação embrionária (RE); Grupo 2 (G2;n=18) animais adultos (4,1 e 18 anos) 77,4%; e Grupo 3 (G3;n=4) (éguas idosas > 18,1 anos) e tiveram 33,3% de RE (P<0,05). Squires et al. (1999) comentam que a taxa de RE de éguas com ovulação única está em torno de 50% consistente com os resultados obtidos nos grupos G1 e G2 do presente estudo. O G3 não mostrou elevado índice de RE devido ao declínio do número de folículos em função da idade. Os dados permitem concluir que a taxa de RE em éguas jovens e adultas é significativamente (P<0,05) mais eficiente do que a taxa RE de éguas idosas.

Palavras-chave: éguas, recuperação embrionária, idade.

Key words: mares, embryo recovery, age.