



## **Efeito de diferentes temperaturas de descongelamento na motilidade progressiva de sêmen equino criopreservado**

*The Influence of different thawing temperatures on progressive motility of cryopreserved equine semen*

**Tainá Oliveira<sup>1,2,\*</sup>, Verônica Bueno<sup>2</sup>, Ilusca Finger<sup>1</sup>, Márcio Nunes<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>UNIRITTER – Centro Universitário Ritter dos Reis, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>2</sup>REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>3</sup>MINITUBE, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*E-mail: tainavitoriafarias@hotmail.com

A inseminação artificial é uma ferramenta para acelerar o ganho genético e viabilizar acasalamentos com garanhões distantes ou indisponíveis. Um dos impedimentos para a utilização do sêmen criopreservado de alguns garanhões é a variabilidade na qualidade seminal pós-descongelamento entre indivíduos. Esta variabilidade está relacionada à habilidade de a membrana espermática manter sua integridade e com isso a capacidade de fertilização da célula durante o processo de criopreservação, incluindo o descongelamento. Cada garanhão tem uma característica espermática individual segundo a composição de sua membrana, fazendo com que cada garanhão tenha predileção por diferentes diluidores, tempos de equilíbrio, curvas de congelamento e, possivelmente, temperaturas de descongelamento. Este trabalho objetivou comparar duas técnicas de descongelamento de sêmen equino com tempos e temperaturas diferentes, avaliando diversos parâmetros da cinética espermática por método computadorizado, dentre os quais a motilidade espermática progressiva (MP) após o descongelamento, característica muito associada à fertilidade e, portanto, escolhida para ser demonstrada e comparada neste resumo. Foram utilizadas 53 palhetas comerciais de sêmen equino, provenientes de reprodutores de diferentes raças, criopreservadas por diferentes metodologias indicadas para a espécie e submetidas a diferentes protocolos de descongelamento. As palhetas foram divididas em dois grupos: Grupo A (descongelamento a 37°C por 30s) e Grupo B (descongelamento a 75°C por 7s). Cada palheta ainda congelada foi bipartida e cada metade foi descongelada em banho-maria protegida por um envoltório plástico à temperatura correspondente ao seu grupo. Após o descongelamento, a avaliação computadorizada da motilidade espermática foi realizada através do sistema AndroVision® em 3 momentos: Momento T0 (a análise foi realizada logo após o descongelamento); Momento T1 (análise logo após a diluição com meio comercial à base de caseinatos - Equiplus®); e momento T2 (análise após 30 min de estabilização em mesa aquecedora a 37°C). As médias da motilidade progressiva foram analisadas através de teste T, com sensibilidade <0,05. Os resultados obtidos da MP entre os grupos em cada momento estão apresentados como média±SEM. A diferença da MP entre grupos em cada momento está indicada por diferentes letras minúsculas. T0A (31,34±2,14a), T0B (26,71±2,39a); T1A (24,64±2,10a), T1B (17,27±1,63b), T2A (24,21±1,74a), T2B (18,49±1,36b). Logo após o descongelamento (T0) não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados. Nos momentos após a diluição (T1) e após a estabilização de 30 minutos (T2), as palhetas descongeladas a 37°C (grupo A) apresentaram valores superiores significativamente para a análise de motilidade progressiva quando comparadas ao grupo B. O descongelamento a 37°C (grupo A) demonstrou maior motilidade progressiva possivelmente porque houve tempo mais adequado para a reidratação das células espermáticas. Em conclusão, o protocolo de descongelamento a 37°C por 30s apresentou melhor motilidade progressiva média, para sêmen equino criopreservado em comparação ao procedimento utilizando 75°C por 7s, apontado em alguns estudos como o mais indicado para a MP superior pós-descongelamento.

**Palavras chaves:** criopreservação, sêmen, espermatozoides, equino, temperatura.

**Keywords:** cryopreservation, semen, sperm cells, equine, temperature.

## Ovulação múltipla de cinco folículos em égua Mangalarga Marchador – Relato de Caso

*Five follicles multiple ovulation in a Mangalarga Marchador mare - Case Report*

**Armando Martins Teixeira Cota<sup>1\*</sup>, Ana Clara Bueno Gomes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Central de Transferência de embriões CRIOHORSE, S. José do Goiabal, MG, Brasil;

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: armandomtc@gmail.com

O Mangalarga Marchador (MM) é uma das raças em maior ascensão no mundo, comunicando no ano de 2017 e 2018 um total de 34.968 e 37.225 nascimentos respectivamente. Em contrapartida, ainda são poucos as pesquisas relacionadas aos padrões reprodutivos da raça. A espécie equina é considerada monovulatória, ou seja, cada onda folicular apresenta um folículo dominante. Apesar disso, algumas raças apresentam uma maior incidência de múltiplas ovulações, como PSI e Polo Argentino (Carmo MT, 2007. Tese Doutorado, UNESP). Já foi demonstrado que a ocorrência de múltiplas ovulações aumenta a taxa de recuperação embrionária e por isso, múltiplas ovulações espontâneas são altamente desejáveis em éguas doadoras de embrião (Panzani D et al. 2014. *Theriogenology*, 82:807-814). Segundo um trabalho realizado com éguas abatidas de diversas raças, do total 441 múltiplas ovulações 415 (94,1%) foram duplas, 25 foram triplas (5,7%), e somente 1(0,2%) foi quadrupla (Henry M et al. 1982. *ZtblVetMed A*, 29:170-184). O presente trabalho tem como objetivo relatar a ovulação de cinco folículos em um único ciclo de uma égua (MM) com recuperação embrionária de três embriões. Uma égua MM de 8 anos, pesando 430Kg, em atividade esportiva, se encontrava em um programa de TE comercial situado na cidade de Belo Oriente, Minas Gerais. Cinco dias após ovulação foi administrado 5mg de dinoprost (Lutalyse®) por via intramuscular. Foi iniciado o controle folicular cinco dias seguintes à aplicação da droga, sendo identificados na ultrassonografia cinco folículos dominantes, sendo três folículos no ovário esquerdo (40 e 39 mm de diâmetro, não sendo possível mensurar o tamanho exato do terceiro devido sobreposição de imagem) e dois folículos no ovário direito (40 e 42 mm de diâmetro) e edema uterino grau 3; por razão desses achados foi administrado 1mg de deslorelina intramuscular para indução da ovulação e posterior inseminação artificial (IA). Doze horas após a indução, no momento antes da IA a égua foi examinada e observou-se ao exame ultrassonográfico a presença dos 3 folículos no ovário esquerdo; e no ovário direito foi observado a ovulação de um dos folículos e a presença do outro folículo dominante (45mm Ø). Deste modo, a égua foi inseminada com sêmen refrigerado de garanhão MM de fertilidade comprovada. A égua havia ovulado todos os três folículos do ovário esquerdo 16 horas após a inseminação e a ovulação do folículo dominante ainda presente no ovário direito foi conferida 24 horas após IA. A coleta embrionária foi realizada 10 dias após a verificação da primeira ovulação, sendo realizada a coleta transcervical utilizando sonda do tipo Bivona CH 32 (Minitub®), soro ringer lactato e copo coletor. No primeiro lavado foram recuperados dois blastocistos expandidos grau 1; sendo recuperado o terceiro embrião de mesma classificação no segundo lavado. Foi realizado mais um lavado para verificar a presença de mais embriões, mas não foi observada a presença destes durante o rastreamento em placa no microscópio estereoscópio. Os três embriões resultaram em duas prenhez. Estudos brasileiros com as raças Crioula e Brasileiro de Hipismo (BH) têm relatado taxas de ovulações múltiplas de 7,1% e 53% respectivamente, demonstrando mais uma vez que a raça tem grande influência em relação ao número de ovulações. No MM não foi encontrado até o momento estudos que comprovem o índice de múltiplas ovulações, principalmente correlacionando o número de ovulações à idade e fase da estação de monta. Apesar de o relato apresentar somente um caso de ovulação múltipla de cinco folículos dentro da raça Mangalarga Marchador, não é incomum encontrar ovulações duplas dentro da raça, porém mais estudos precisam ser realizados para termos um padrão ovulatório desta raça nacional, para que assim possamos ter uma base de dados sólida para comparação de dados obtidos dos demais estudos com ovulações múltiplas espontâneas.

**Palavras-chave:** múltipla ovulação, égua, Mangalarga Marchador.

**Keywords:** multiple ovulation, mare, Mangalarga Marchador.

## Relação entre a expressão gênica do PLC $\zeta$ no espermatozoide e motilidade total em garanhões

*Relationship between the gene expression of PLC $\zeta$  in spermatozoa with total motility in stallions*

**Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2,\*</sup>, Henrique Boll de Araujo Bastos<sup>2</sup>, Luiz Augusto Machado Centeno<sup>2</sup>, Néelson Alexandre Kretzmann Filho<sup>2</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1,2</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil; <sup>2</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

\*E-mail: veronicalacruzbueno@hotmail.com

A avaliação seminal do garanhão é de extrema importância para determinação do seu desempenho reprodutivo, auxiliando a indicar a fertilidade potencial de um determinado reprodutor e determinar se o sêmen é capaz de ser submetido a procedimentos como o resfriamento e o congelamento. Em todas as espécies de mamíferos estudadas, o gene PLC $\zeta$  (*Fosfolipase C Zeta*) é responsável pelo aumento de cálcio no momento da fecundação do oócito. O objetivo desse estudo foi avaliar se há relação a expressão gênica de PLC $\zeta$  e a motilidade total do espermatozoide a fresco e pós-descongelamento de garanhões. Foram utilizados ejaculados de 40 garanhões da raça Crioula, localizados próximo a Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. Para a coleta do sêmen, utilizou-se vagina artificial modelo Hannover. A avaliação da Motilidade Total (MT) no sêmen fresco e após descongelamento foi realizada através do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, AndroVision®, Minitube). O sêmen fresco de cada garanhão foi dividido em dois grupos de acordo com as características de MT: Grupo 1 (MT > 60 %) (n=20) e Grupo 2 (MT < 60 %) (n=20). Para a realização do congelamento um total de 200 x 10<sup>9</sup> espermatozoides viáveis foram distribuídos em tubos Falcon (15 mL) e centrifugados a 600 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* formado foi ressuspenso em um diluente comercial próprio para congelamento a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida, previamente aquecido a 37°C, diluído a uma concentração para 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis/mL. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml, refrigeradas a 5°C por 20 min, expostas ao vapor de nitrogênio durante 20 min imersas no nitrogênio líquido. Após o descongelamento de acordo com as características de MT os animais foram divididos em dois grupos em: Grupo 1 (MT > 50 %) e Grupo 2 (MT < 50%). Uma fração do ejaculado foi separada para análise da expressão gênica utilizando a técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados quantitativos da qPCR foram determinados usando uma curva padrão absoluta (fórmula=10<sup>-(ct alvo - CT padrão)/slope</sup>). Foi observada diferença na expressão do PCL $\zeta$  entre o grupo 1 e 2 (P = 0,001) com sêmen fresco. Ocorreu também uma diferença de expressão entre o grupo 1 e 2 (P = 0,018) no sêmen pós- descongelamento. Desta forma a maior taxa de MT é observada nos espermatozoides com maior expressão de PLC $\zeta$ , tanto nos espermatozoides frescos quanto nos que passaram pelo processo de criopreservação. Para que a célula espermática fecunde o ovócito, são necessários, alguns atributos após o descongelamento, como por exemplo, a motilidade total. A disponibilização de biomarcadores na área de reprodução possibilitará o desenvolvimento de novos critérios para a predição e aumento da fertilidade do macho. Concluímos que os espermatozoides com maior capacidade de fecundação (motilidade) possuem maior expressão do PCL $\zeta$  e que a expressão do gene PCL $\zeta$  no espermatozoide equino pode ser utilizada como um biomarcador para a motilidade total de garanhões da raça Crioula.

**Palavras-chave:** biomarcador, espermatozoide, equino.

**Keywords:** biomarker, spermatozoon, equine.



## The load of bacteria and fungi affects the sperm morphology of equines

*A carga de bactérias e fungos afeta a morfologia espermática dos equinos*

Sandra Bautista Jaimes<sup>1</sup>, Angélica Marcela Correa<sup>2</sup>, Shirley Andrea Florez Rodriguez<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Student of the Zootechnics Program, Industrial University of Santander, Málaga, Colombia; <sup>2</sup>Teacher of the Zootechnics Program, Industrial University of Santander, Málaga, Colombia; <sup>3</sup>Agroindustrial Research Center – CIAGRO, Zootechnics Program, Industrial University of Santander, Málaga, Colombia.

\*E-mail: saflorez@uis.edu.co

Multiple species of microorganism had been cultured from mucosal sites, especially from the surface of the penis/prepuce and from the urethral fossa of horses, with ample chance to contaminate semen during collection. These microorganisms may affect the sperm quality and subsequent the fertility. The aim was to study the relationship between the total microbiota load and sperm quality of fresh semen. Semen samples were collected from 7 healthy Colombian Creole Horses used for natural mating, with no evidence of any reproductive track pathology, and with ages ranging from 4 to 12 years of age. In order to collect the samples, the penis/prepuce was washed with water at 37°C and dried with clean paper towels, according to good praxis. Two collections were made with an interval of 2 days. Samples of free gel semen were evaluated in terms of volume, pH, total motility (%), vigor (1-5), sperm concentration ( $\times 10^6/\text{mL}$ ), sperm morphology (%), structural defects (%) and sperm membrane integrity (%) with Eosin-Nigrosin test. Immediately after, bacteriological and mycological quantification was carried out. A sample of 1ml was diluted in 9ml peptone water (Merck®), then, 100 $\mu\text{L}$  of the resulting solution were split into three Petri dish, using a method of sowing on the surface with glass handle on Nutrient agar (Merck®) under aerobic conditions at 37°C for 24 hours of incubation for quantification of bacteria and on agar Saboraud 4% dextrose agar (Merck®) at 25°C for 72 hours for filamentous fungi and yeast quantification. Colonies were visually quantified and then multiplied by 100 to obtain the number of CFU/mL (colony-forming units per milliliter). The samples were divided into two groups: Group 1 (<1500 CFU/ml of bacteria) and Group 2 (>1500 CFU/ml of bacteria). The data were examined using the nonparametric Mann-Whitney U-test to compare the groups. Results are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Spearman's Correlations were analyzed between the number of CFU/ml and the sperm quality parameters. The results showed that the bacteria concentration in CFU/ml was for minor in the Group 1 (923 $\pm$ 114,57<sup>a</sup>) than the group 2 (2142 $\pm$ 177,76<sup>b</sup>), ( $p=0,0006$ ), similarly, for filamentous fungi and yeast the group 1 had 540,86 $\pm$ 104,45<sup>a</sup> and group 2 had 1296 $\pm$ 168,63<sup>b</sup> ( $p=0,023$ ). No differences were found between groups for sperm parameters, such as, volume (Group 1: 54,00 $\pm$ 11,09<sup>a</sup> and Group 2: 55,71 $\pm$ 7,51<sup>a</sup>), total motility (Group 1: 77,86 $\pm$ 3,60<sup>a</sup> and Group 2: 72,14 $\pm$ 4,86<sup>a</sup>), vigor (Group 1: 3,36 $\pm$ 0,26<sup>a</sup> and Group 2: 3,14 $\pm$ 0,32<sup>a</sup>), sperm concentration (Group 1: 182,14 $\pm$ 38,35<sup>a</sup> and Group 2: 156,07 $\pm$ 32,12<sup>a</sup>) and sperm membrane integrity (Group 1: 68,00 $\pm$ 20,84<sup>a</sup> and Group 2: 69,50 $\pm$ 2,08<sup>a</sup>). Conversely, totals defects were high for Group 2: 60,57 $\pm$ 5,95<sup>a</sup> compared Group 1: 41,71 $\pm$ 4,47<sup>b</sup>), ( $p=0,034$ ), the mayor defects were high for Group 2: 45,43 $\pm$ 3,60<sup>a</sup> that Group 1: 30,29 $\pm$ 3,47<sup>b</sup>), ( $p=0,035$ ) and the defects of intermediate piece were 17,25 $\pm$ 4,13<sup>a</sup> for group 1 and 5,50 $\pm$ 1,77<sup>b</sup> for the group 2 ( $p=0,028$ ). There was a correlation between the CFU/ml of bacteria and of fungi of 0.65 ( $p = 0,01$ ). As the concentrations of CFU/ml of bacteria increases, the motility decreases ( $r = -0,34$ ,  $p = 0,02$ ), on the contrary, there is direct correlation with total defects ( $r = 0,60$ ,  $p = 0,02$ ). The CFU/ml of fungi was direct correlation with the defects of intermediate piece ( $r=0,71$ ,  $p= 0,0044$ ). Possibly this is caused by the production of reactive oxygen species, originating mainly from the mitochondria as a consequence of the microbiological contamination of semen. In conclusion the bacterial load and fungi was associated with the damage in sperm morphology, owing to structural damages in the intermediate piece.

**Keywords:** semen, spermatozoon, bacterium, fungus and seminal quality.

**Palavras-chave:** sêmen, espermatozoide, bactérias, fungos e qualidade seminal.



## Ocorrência de genes de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de casos de endometrite aguda nas éguas

*Occurrence of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from cases of acute endometritis in mares*

**Fabiana Santos Castro<sup>1\*</sup>, Ivan Cunha Bustamante Filho<sup>2</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>,  
Giovani Casanova Camozzato<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Reprolab, Faculdade de Veterinária; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, RS, Brasil.

\*E-mail: fscfab@gmail.com

O papel da *Escherichia Coli* na patogenia da endometrite equina é em grande parte desconhecida. Tem sido sugerido que a *E. coli* induz uma resposta inflamatória menos exsudativa e provoca uma maior lesão no tecido endometrial do que *Streptococcus zooepidemicus*. Geralmente as infecções por *E. coli* são relatadas como as mais problemáticas a resolver. A determinação de fatores de virulência das *E. coli* pode ser um ponto fundamental para caracterizar cepas que induzam uma maior resposta inflamatória e que de acordo com sua composição antigênica capsular, flagelar ou somática tenham um comportamento de autodefesa, tornando-as difíceis de serem isoladas e até mesmo eliminadas do ambiente uterino por mecanismos de defesas celulares. O objetivo do presente foi identificar se existe associação entre *E. coli* com genes de virulência e endometrite na égua. Para tanto, foram isoladas 7 cepas de *E.coli*, causadoras de endometrite em éguas. As cepas isoladas foram genotipadas por PCR para a presença dos genes de virulência *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaea*, *ehxA*, *hlyA*, *iuc*, *ibeA*, *FimH*, *KpsMII*. A porcentagem de presença dos genes *stx*<sub>1</sub> (28,57%); *stx*<sub>2</sub> (57,14%); *eaea* (14,28%); *ehxA* (14,28%); *hlyA* (28,57%); *iuc* (28,57%); *ibeA* (14,28%); *fimH* (85,71%); *KpsMII* (14,28%). cepa 1 - *iuc*; cepa 2 - *stx*<sub>2</sub>, *hlyA* e *fimH*; cepa 3 - *stx*<sub>2</sub> e *fimH*; cepa 4 - *stx*<sub>1</sub>, *eaea*, *iuc*, e *fimH*; cepa 5 cepa *stx*<sub>2</sub>, *hlyA*, *ibeA*, *fimH*, *KpsMII*; a cepa 6 apresentou somente o gene *fimH*; e a cepa 7 identificou os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *ehxA*, *fimH*. Após, as cepas isoladas dos casos clínicos foram inoculadas experimentalmente em duas éguas clinicamente normais com exame citológico e bacteriológico negativos. Um dia após a infecção, foi realizado exame clínico do trato genital incluindo vaginoscopia, ultrassonografia, citologia endometrial e bacteriologia. Estes procedimentos foram repetidos diariamente até que fossem diagnosticadas cultura e citologia negativa. A endometrite causada pelas *E.coli* provocou citologia positiva e as éguas desenvolveram sinais clínicos vaginais de endometrite e líquido uterino. As cepas apresentaram além de líquido no útero, líquido vaginal e sendo que a cepa 3 tinha uma maior quantidade de líquido e aspecto mais leitoso. As quatro cepas tiveram desaparecimento do quadro de endometrite tanto exame citológico quanto bacteriológico, entre o 3º e 4º dia em média. Conclui-se até momento, pelos dados parciais, todos os genes testados possuem relação direta com a endometrite equina, além disso, foi constatado que todas as *E.coli* que foram coletadas de animais com quadro clínico de endometrite, quando isoladas e inoculadas no útero de éguas provocaram quadros de endometrite aguda.

**Palavras-chave:** endometrite, égua, *Escherichia coli*, PCR.

**Key-words:** endometritis, mare, *Escherichia coli*, PCR.

## Relato de Caso: Bipartição testicular em asinino (*Equus asinus*)

*Case Report: Testicular bipartition in donkey (Equus asinus)*

Rodrigo Alves Monteiro<sup>1\*</sup>, Rodolfo Marinho Cunha<sup>2</sup>, Riany Silva Vidal<sup>2</sup>,  
José Felipe Napoleão Santos<sup>2</sup>, Gabrielly Medeiros Araújo Morais<sup>2</sup>, Carlos Enrique Peña-Alfaro<sup>3</sup>,  
Valdir Morais de Almeida<sup>3</sup>, Norma Lúcia de Souza Araújo<sup>4</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campus II, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil; <sup>2</sup>Graduandos de Medicina Veterinária, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, PB, Brasil;

<sup>3</sup>Professores do Curso de Medicina Veterinária, Campus Patos, Universidade Federal de Campina Grande, PB, Brasil;

<sup>4</sup>Professora do Curso de Medicina Veterinária, Campus II, UFPB, PB, Brasil. <sup>5</sup>Professora do Curso de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Campus I, UFPB, PB, Brasil.

\*E-mail: rodrigoalves\_1983@hotmail.com

Os asininos (*Equus asinus*) desempenham papel de fundamental importância econômica e social nas diversas regiões rurais ao redor do mundo. A bipartição testicular é uma adaptação morfológica consequente das condições ambientais de extremo calor, observada em caprinos e ovinos na África e América do Sul e esta característica morfológica proporciona aumento na ventilação testicular e na superfície do escroto, favorecendo a dissipação de calor e resultando na melhoria dos parâmetros espermáticos, o que aumenta a fertilidade nestas espécies. A melhora dos parâmetros espermáticos nesses animais é justificada pela termorregulação testicular, sendo atribuída à distribuição e o arranjo anatômico das artérias e veias do funículo espermático, proporcionam um mecanismo contracorrente, diminuindo a temperatura do sangue arterial. Baseado na exposição, observou-se o seguinte caso: foi adquirido um asinino da raça nordestina, com quatro anos de idade, 105 kg de peso vivo, com finalidade de realização de projeto pesquisa, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (UFPB) em parceria com o laboratório e clínica de Reprodução Animal da UFCG. O animal deu entrada no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, onde ficou estabulado no setor de Reprodução Animal. No exame clínico-andrológico, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, foi observada a bipartição testicular, sendo realizada palpação testicular e não foi constatado nenhuma alteração de ordem patológica; em seguida foi realizada ultrassonografia testicular como exame complementar. Em sequência, o animal apresentou testículos esquerdo (comp. 9 cm, larg. 6,5 cm, alt. 5 cm) e direito (comp. 8,5 cm, larg. 5,5 cm, alt. 5 cm) simétricos, formatos ovoides, epidídimos com posição dorso-medial, consistência firme, mobilidade normal e ausência de sensibilidade dolorosa. Na colheita de sêmen, por vagina artificial, foi observado ejaculado com volume de 45,0 mL, cor branca, aspecto leitoso, odor *sui generis*, motilidade 90%, vigor 5, concentração de  $202 \times 10^6$  espermatozoides/mL de sêmen. No exame de patologia espermática, método de dupla coloração com eosina-nigrosina, as características morfológicas apresentaram 85,5% de espermatozoides normais e 14,5% com patologias. Foram realizados testes de refrigeração, congelamento, com o objetivo de avaliar a viabilidade espermática do animal, no método automatizado (TK 3000®; curva P2.S2). O sêmen apresentou-se antes da congelamento com volume 45,0 mL, motilidade 80%, vigor 5, concentração ( $109 \times 10^6$ /mL), pH 7, 88% das células com integridade de membrana (eosina-nigrosina) e 62,5% de membranas funcionais (teste hiposmótico). Na pós-descongelamento, mensurou-se motilidade de 60%, vigor 4, 70% de integridade de membrana e 81,5% de membranas funcionais. Na pós-descongelamento verificou-se que a bipartição testicular não causou nenhuma interferência negativa sob os parâmetros espermáticos tanto no sêmen fresco quanto ao criopreservado. Desta forma, é possível inferir que a bipartição testicular atua nos asininos da mesma forma que registrada nos pequenos ruminantes, auxiliando positivamente na termorregulação testicular e conferindo índices satisfatórios de avaliação espermática tanto no sêmen fresco quanto ao submetido à criopreservação.

**Palavras-chave:** jumentos, fertilidade, espermatozoides.

**Keywords:** donkeys, fertility, spermatozoa.



## **Efeito da condição corporal na eficiência reprodutiva em éguas da raça Crioula**

*Effect of body condition on the reproductive efficiency in Criollo breed mares*

**Lucas Correa Lau<sup>1,4</sup>, Felipe Pires Hartwig<sup>2</sup>, Vinícius Azevedo Folle<sup>2</sup>, Giulia Soares Latosinski<sup>3</sup>,  
Sandra Fiala Rechsteiner<sup>1,4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>2</sup>HISTOREP – Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil; <sup>3</sup>Médico veterinário autônomo;

<sup>4</sup>Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

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

A eficiência reprodutiva em fêmeas obesas têm sido descrita em algumas espécies domésticas e também em humanos, porém na espécie equina existem poucos estudos, ainda não havendo relatos na raça Crioula. Embora esta raça tenha grande importância na economia e na equinocultura brasileira, as técnicas reprodutivas nesta raça foram liberadas apenas em 2012. O efeito dos hormônios ligados a obesidade e à reprodução merece ser estudado, uma vez que as alterações hormonais em éguas com sobrepeso e/ou obesas podem ser causa de infertilidade ou subfertilidade. O objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência reprodutiva em éguas obesas, doadoras de embrião, da raça Crioula. O experimento foi realizado em uma central de reprodução, localizada no Sul do estado do Rio Grande do Sul, utilizando 21 éguas, com histórico reprodutivo conhecido. Foi realizado um exame clínico geral antes do início do experimento, e somente éguas sem alterações clínicas detectáveis foram utilizadas. O escore corporal (EC) foi verificado pela escala de 1 a 9, considerando 7 e 8 como obesas. O acúmulo de gordura no pescoço (GP) foi avaliado de 0 à 5. O tamanho do folículo pré-ovulatório foi anotado. Uma amostra de sangue foi coletada para avaliação dos níveis séricos de leptina. Os embriões foram coletados nos D7 ou D8. Para fins de análise estatística as éguas foram divididas em dois grupos: G1: éguas com idade < 15 anos (n=11); G2: éguas com idade ≥ 15 anos (n=10). A média do EC foi de 6,29 e do GP foi 3. A taxa de recuperação de embriões foi de 41,96% (n=47). A porcentagem de éguas com duas ou mais coletas de embriões positivas foi de 66,67% (n=14), enquanto que a porcentagem de éguas com duas ou mais coletas sem recuperação de embriões foi de 80,95% (n=17). Apenas uma égua apresentou alteração no lavado (4,76%) e 23,81% (n=5) dos embriões apresentaram alterações de desenvolvimento. A média de leptina observada foi de 3,53. Não foi verificada correlação entre o tamanho do folículo e o escore corporal (R= 0,06221, p=0,5835) ou acúmulo de gordura no pescoço (R= 0,01208, p= 0,9153), enquanto que houve forte correlação entre escore corporal e acúmulo de gordura no pescoço (R= 0,74072, p= <0,0001). Não há correlação linear entre o tamanho do folículo e a leptina (R= 0,06402, p= 0,5726). Foi realizada regressão logística para avaliar se o tamanho do folículo ou o escore corporal estavam associados a uma maior recuperação de embriões no lavado, porém o tamanho folicular não está associado a um aumento na taxa de recuperação de embriões (p=0,7609), assim como o escore corporal (p=0,5482). Não houve associação entre taxa de recuperação de embriões e as demais variáveis analisadas (p>0,05). Diferente de outros experimentos já realizados, em outras raças equinas, as éguas da raça Crioula não apresentaram relação entre sobrepeso e/ou obesidade com os índices de leptina, e também com o tamanho do folículo ovulatório. A leptina é o hormônio descrito como principal responsável pela queda nas taxas reprodutivas em éguas com sobrepeso, e a ausência de hiperleptinemia nas fêmeas Crioulas elucidam a não relação do elevado escore corporal com eficiência reprodutiva. O elevado escore corporal e o acúmulo de gordura no pescoço aparentemente não estão associados com a eficiência reprodutiva nas éguas Crioulas. A baixa taxa de recuperação de embriões pode estar relacionada a outros fatores individuais das éguas, tais como a idade. As divergências entre os resultados obtidos no presente estudo em relação aos descritos na bibliografia, e por se tratar de um primeiro panorama específico da raça Crioula, indicam a necessidade de outros estudos que possibilitem elucidar, se existe e de que maneira acontece a relação entre sobrepeso/obesidade e eficiência reprodutiva nas fêmeas da raça Crioula.

**Palavras-chave:** égua, leptina, folículo ovulatório.

**Keywords:** mare, leptin, ovulatory follicle.

## Coleta negativa de embrião equino. Nova tentativa no dia seguinte?

*Negative collection of equine embryo. Try again the next day?*

**Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>2</sup>, Jhonnatha Paulo Oliveira<sup>1,\*</sup>, Paula Junqueira Ferraz<sup>2</sup>,  
Marcus André Ferreira de Sá<sup>3</sup>, Diego Rodrigues Gomes<sup>1</sup>, Vera Lucia Teixeira de Jesus<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Médico Veterinário autônomo; <sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estácio de Sá (UNESA, Campus Barra III) - Bolsista do Programa Pesquisa Produtividade da UNESA.

\*E-mail: jhonnatha@ig.com.br

Apesar dos índices de recuperação embrionária e gestação atualmente serem bastante consistentes, a maior dificuldade em operar um programa TE bem-sucedido é a administração e coordenação das muitas variáveis que pode afetar essas taxas. Essas variáveis incluem a gestão das doadoras e receptoras, a qualidade da receptora, sincronização da ovulação, competências técnicas do operador e métodos utilizados para realizar a transferência de embriões, a qualidade do embrião, condições uterinas e nutricionais das doadoras e receptoras. As taxas de recuperação embrionária em programas de TE apresentam grande variação dependendo do tipo de doadora utilizada, idade, dia de coleta, rotina de exercícios físicos da doadora, entre outros fatores, chegando a oscilar de 45% a 80%. O presente trabalho teve como objetivo verificar a taxa de recuperação embrionária alcançada no segundo lavado uterino (no dia seguinte ou 1 hora após aplicação de prostaglandina), realizado quando não houve recuperação embrionária já no primeiro lavado uterino. Esse trabalho foi realizado em Haras do estado do Rio de Janeiro, totalizando 14 doadoras de embrião. O lavado uterino padrão para recuperação embrionária foi realizado em D8 ou D9, utilizando 1 litro de ringer lactato e o procedimento sendo realizado 3 vezes consecutivas. Quando não houve recuperação embrionária, no dia seguinte nova tentativa de coleta de embrião foi realizada, procedendo os lavados da mesma forma. Em outras éguas, quando o lavado foi negativo, fez-se o uso de 10 mg de Dinoprost trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis Brasil, São Paulo/SP, Brasil).IM e uma hora após administração nova coleta de embrião foi realizada. O critério para escolha das doadoras a serem submetidas a nova tentativa de coleta no dia seguinte foi: histórico de alta taxa de recuperação embrionária, ( $\geq 70\%$ ) boa qualidade seminal (motilidade progressiva  $\geq 80\%$  e vigor  $\geq 4$ ) no momento da inseminação artificial (IA) e tempo de ovulação em até 48h após a IA. De 10 lavados uterinos realizados no dia seguinte, obteve-se 70% (7/10) de recuperação embrionária. Em relação aos lavados uterinos realizados 1h após a aplicação do Lutalyse<sup>®</sup> (após o primeiro lavado uterino não obter recuperação embrionária), 75% (3/4) de recuperação embrionária foi alcançada. Sugere-se realizar nova tentativa de recuperação embrionária 24h após o primeiro lavado uterino ou aplicar PGF após a coleta negativa e uma hora após fazer nova tentativa de coleta para éguas doadoras de embrião com histórico favorável de recuperação embrionária pois aumenta. Pois nessas éguas que ao primeiro lavado foram negativas para embrião, quando realizou o segundo houve um aumento de 71%.

**Palavras-chave:** transferência de embrião, éguas, gestação.

**Keywords:** *embryo transfer, mares, pregnancy.*

## **Avaliação da conformação vulvar pelo Índice Caslick e sua correlação com a idade e o sucesso reprodutivo em receptoras de embrião mestiças Bretão**

*Evaluation of vulvar conformation by the Caslick Index and its correlation with age and reproductive success in cross-breeding Breton embryo recipients*

**Ytalo Galinari Henriques Schuartz<sup>1,\*</sup>, Cristian Silva Teixeira<sup>2</sup>,  
Victoria Kanadani Campos Poltronieri<sup>1</sup>, Thiago Vieira e Silva<sup>1</sup>, Fabyano Fonseca e Silva<sup>3</sup>,  
Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>UEPE em Equideocultura DZO/UFV, Viçosa, MG, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: ytalo78@hotmail.com

A vulva representa a primeira proteção do sistema reprodutor da fêmea ao ambiente externo e sua má conformação propicia diversos problemas como pneumovagina, urovagina, vaginites, metrite e cervicites, interferindo na fertilidade. Como método de avaliação da conformação vulvar, foi criado em 1979, por Pascoe, o Índice Caslick (IC), obtido pela fórmula  $IC = CE \times A$ , onde CE (comprimento efetivo da vulva) é multiplicado por A (ângulo vulvar). Assim sendo, esse trabalho teve como objetivo avaliar se a conformação vulvar por meio do IC varia conforme a idade e sua correlação com a taxa de prenhez positiva de embriões transferidos em éguas receptoras de embrião mestiças da raça Bretão. O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino Pesquisa e Extensão em Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. De posse de um transferidor e um paquímetro foram mensurados a angulação e o comprimento vulvar efetivo, respectivamente, dos animais. Verificou-se o histórico de taxa de prenhez de embriões transferidos para as receptoras avaliadas, durante as estações de monta 2016-2017, 2017-2018 e 2018-2019. Os diagnósticos de gestação foram realizados aos seis dias após transferência de embrião (D14) por meio de ultrassonografia modo-B (ALOKA SSD-500), com reavaliação no D16 em caso de diagnóstico negativo. Ao total, 30 éguas, foram divididas em três grupos, G1 (até 3 anos), G2 (3 a 9 anos), e G3 (9 a 15 anos). Os dados obtidos, em um delineamento inteiramente casualizado, foram analisados via ANOVA pelo pacote ExpDes do software R. Uma vez verificada a significância do teste F do ANOVA, a comparação entre as médias foi avaliada via teste de Tukey. A correlação de Pearson foi calculada usando a função `cor.test` do software R. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$  e tendência quando  $p < 0,10$ . Verificou-se que não houve diferença do IC entre as diferentes faixas etárias (G1:  $42,9 \pm 8,88^a$ ; G2:  $42,5 \pm 10,47^a$ ; G3:  $88 \pm 12,35^a$ ). Porém, ao correlacionar o IC com a idade, verificou-se correlação positiva ( $0,56$ ;  $p = 0,00087$ ), comprovando que a idade possui interferência na conformação vulvar dos animais. Além disso, ao correlacionar o IC com a fertilidade dos animais avaliados, levando em consideração a sobrevivência do embrião ao ambiente uterino aos seis dias após TE, observou-se uma tendência ( $p = 0,05$ ), indicando que éguas com o IC elevado possuem uma menor probabilidade de manter o embrião após a TE. Portanto, conclui-se que animais mestiços da raça Bretão com idade mais avançada apresentam um IC mais elevado e quanto maior o IC, menor a probabilidade da égua receptora confirmar o embrião em um programa de TE.

**Palavras-chave:** angulação vulvar, reprodução equina, transferência de embrião, fertilidade.

**Keywords:** vulvar angulation, equine reproduction, embryo transfer, fertility.



## **Derivados de produtos naturais são capazes de romper biofilme *in vitro* de bactérias isoladas de útero de éguas**

*Natural products derivatives are able of biofilm disruption in vitro of bacteria isolated from mare uterus*

**José Adelson Alves do Nascimento Júnior<sup>1</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1</sup>, Nadine Gabryella Pontes Maciel<sup>2</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE Brasil; <sup>2</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns, PE, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)/DMV, Recife, PE, Brasil.

\*Email: carneirogustavo1@gmail.com

A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência para bactérias se adaptarem ao meio ambiente. O tratamento de infecções por biofilme representa um desafio para microbiologistas e clínicos. Sob a proteção do biofilme, as células microbianas tornam-se tolerantes e resistentes aos antibióticos, às respostas imunes, o que aumenta as dificuldades para os tratamentos e diagnósticos. As infecções bacterianas que atuam no endométrio das éguas estão constantemente associadas à capacidade de produção de biofilme, fazendo com que os tratamentos se tornem menos eficazes. Foi relatado que a administração de antibióticos por si só é incapaz de eliminar a infecção crônica suspeita de estar envolvida na formação da biomassa do biofilme. O principal objetivo no tratamento de uma infecção associada ao biofilme é romper a massa de um biofilme e eliminar as bactérias associadas a este. Nesse contexto, há uma grande necessidade na busca de novas terapias para controle ou prevenção de infecções cujos microorganismos utilizam a formação de biofilme como estratégia protetora. Os produtos derivados de plantas medicinais ainda fornecem uma fonte potencial de novos fármacos devido à sua diversidade estrutural, com evidências na literatura sobre sua eficácia na ação antimicrobiana no biofilme. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro*, a atividade de produtos naturais contra isolados clínicos de endometrite em éguas. A formação do biofilme foi comprovada através da técnica de cristal violeta descrita por Stepanovic et al, 2000 (J Microbiol Methods, 40(2):175-179). A erradicação do biofilme foi demonstrada através de métodos espectrofotométricos e visuais em placas de microtitulação de poliestireno, como descrito por Darwish & Asfour, (The Scientific World Journal, 2013, Article ID 378492, 9 pages). Compostos voláteis apresentados em óleos essenciais da Região da Caatinga (ecossistema do bioma do Nordeste do Brasil (Bessa CMAS et al. 2016, J. Med. Plants Res. Vol. 10 (23): 310-317) foram testados. Os compostos testados foram (ácido decanoico, dodecanoico e octanoico) em concentrações de 4mg e 2mg para quebra de biofilme. Como resultados, observou-se atividade de quebra do biofilme em todos os extratos, com variações entre 44% e 97% na dose de 4mg e entre 29% e 77% na dose de 2mg. O composto que apresentou melhor quebra de biofilme foi o ácido octanoico, apresentando índices de quebra de biofilme de até 97% ( $p < 0,05$ ). Como conclusão, nosso estudo demonstrou que o ácido octanoico, um derivado do produto natural do bioma da Caatinga do Nordeste do Brasil, provou ser um agente potente na ruptura do biofilme. A combinação com terapias alternativas usando produtos naturais pode ter um grande potencial para melhorar o tratamento com antibióticos em infecções por biofilme bacteriano no útero de éguas e levar a desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chave:** fitoterápico, endometrite, biofilme.

**Keywords:** *phytotherapics, endometritis, biofilm.*

## Proteínas do histotrofo equino envolvidas em rotas metabólicas

*Proteins of equine histotroph involved in metabolic pathways*

**Henrique Boll de Araujo Bastos<sup>1,\*</sup>, Maria Noel Martinez<sup>2</sup>, Giovani Casanova Camozzato<sup>1</sup>, Vanessa Jegan<sup>1</sup>, Gustavo Rupp Larentis<sup>1</sup>, Camilo Elber Vital<sup>3</sup>, Pedro Marcus Pereira Vidigal<sup>3</sup>, Edvaldo Barros<sup>3</sup>, Maria Inês Mascarenhas Jobim<sup>1</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>2</sup>Facultad de Veterinária, UDELAR, Montevideu, Uruguai; <sup>3</sup>NuBioMol, Núcleo de Análise de Biomoléculas, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: henriquebastosvet@gmail.com

O reconhecimento materno da prenhez e o desenvolvimento embrionário inicial na égua são eventos ainda pouco elucidados. O objetivo do presente estudo foi analisar as proteínas identificadas no fluido uterino de éguas que estão envolvidas em rotas metabólicas. No primeiro ciclo, amostras de fluido uterino de 30 éguas cíclicas foram coletadas no dia 7 (n = 10), 10 (n = 10) e 13 (n = 10) pós-ovulação constituindo o grupo Cíclico. No segundo ciclo, as mesmas éguas foram cobertas por um garanhão fértil. Nos dias 7, 10 e 13 pós-ovulação foram coletadas amostras de fluido uterino. Imediatamente após a coleta da amostra, realizou-se a lavagem uterina, e aquelas éguas que apresentaram recuperação embrionária constituíram o grupo Prenhez. Os embriões foram coletados de 6 éguas no dia 7, 6 éguas no dia 10 e 6 éguas no dia 13. As éguas que não apresentaram recuperação embrionária foram excluídas de ambos os grupos. O fluido uterino foi coletado com o uso de tampões vaginais. As amostras foram processadas pela técnica de eletroforese bidimensional, sendo utilizadas tiras de 13 cm (pH 3 – 10 linear) e géis de 12.5% de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sódio. Os géis foram analisados pelo software ImageMaster™ 2D Platinum seguido pela identificação dos spots relevantes através da espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) modelo Ultraflex III. A porcentagem relativa de pixels de cada spot foi determinada considerando a porcentagem total de pixels presente no gel. Rotas e mapas metabólicos foram recuperados usando o software do banco de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG-Pathway). Todas as proteínas identificadas foram mais abundantes no grupo Prenhez em relação ao Cíclico. A Enolase 1 (ENO1) demonstrou maior abundância no dia 13 no grupo Prenhez em relação ao grupo Cíclico, e a proteína Alcohol dehydrogenase (NADP+) like protein (AKR1A1) foi mais abundante no dia 7 no grupo Prenhez do que no grupo Cíclico. Através do KEGG foi verificada a participação da ENO1 e AKR1A1 na via da glicólise/gliconeogênese. Também foram identificadas a Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1) e 14-3-3 protein epsilon-like protein (14-3-3) que apresentaram maior abundância nos dias 7, 10 e 13 no grupo Prenhez em relação ao Cíclico, sendo estas proteínas relacionadas com a via de sinalização do PI3K-AKT. As vias da glicólise/gliconeogênese e PI3K-AKT estão relacionadas com as vias metabólicas importantes para o rápido crescimento e desenvolvimento embrionário. Algumas destas proteínas são comuns ao “efeito de Warburg” já relacionado em embriões suínos e bovinos, sendo importante para a adaptação metabólica, como suporte para rápida proliferação celular. Sugere-se que a secreção destas proteínas dentro do lúmen uterino pode ser necessária para o metabolismo celular, conduzindo à rápida proliferação das células embrionárias. Em conclusão a secreção de ENO1, AKR1A1, HSP90AA1 e 14-3-3 pode ser importante para o desenvolvimento e metabolismo celular embrionário em equinos.

**Palavras-chave:** proteômica, desenvolvimento embrionário, égua.

**Keywords:** proteomics, embryonic development, mare.



## **Avaliação precoce de marcadores sanguíneos como preditores do risco de morte em potros neonatos**

*Early evaluation of peripheral blood markers in neonatal foals to predict non-survival*

**Luciana Araujo Borba<sup>1</sup>, Gabriela Casto Silva<sup>1\*</sup>, Carlos Eduardo Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Fábio Bruhn<sup>2</sup>, Camila Gervini Wendt<sup>1</sup>, Lorena Feijó<sup>1</sup>, Augusto Postal Dalcin<sup>1</sup>, Bruna da Rosa Curcio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel; <sup>2</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

\*E-mail: gabicastrovini@gmail.com

Potros sépticos apresentam diversas alterações endócrinas e metabólicas, entretanto, muitas das alterações bioquímicas e inflamatórias apresentadas por estes indivíduos imediatamente ao nascimento e a sua relação com o prognóstico não estão completamente estabelecidas. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilidade de marcadores sanguíneos nas primeiras 48h de vida como preditores de risco de morte em potros neonatos. Vinte e oito potros provenientes de éguas submetidas à indução experimental de placentite ascendente foram divididos em dois grupos de acordo com a sobrevivência no primeiro mês de vida em: não-sobreviventes (n=9) e sobreviventes (n=19). Amostras de sangue foram obtidas ao nascimento, com 12, 24 e 48h de vida. Os níveis de glicose, lactato, triglicerídeos, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas plasmáticas totais (PPT), fibrinogênio, gama-glutamil transferase (GGT), amiloide A sérica (SAA) e alfa-feto proteína (AFP) foram mensurados. Dos 28 animais avaliados, 19 (67,86%) foram classificados como não-sépticos e 9 (32,14%) como sépticos. A taxa de sobrevivência nos potros sépticos foi menor (n=2/9; 22,2%) em comparação com potros não-sépticos (n=17/19; 89,5%) (P<0,001). As concentrações de SAA, PPT, fibrinogênio e ureia não diferiram entre os grupos durante as primeiras 48h de vida. Ao nascimento, potros não-sobreviventes apresentaram elevadas concentrações de AFP (P=0,04), colesterol total (P<0,001), triglicerídeos (P=0,03) e reduzidas concentrações de glicose (P=0,02) e GGT (P=0,02) em relação aos potros sobreviventes. Baixos níveis de glicose foram mantidos durante as 24 e 48h em potros não-sobreviventes (P<0,05). Ao nascimento, a glicose <42 mg/dL foi o parâmetro mais específico (94,44%) para predizer o risco de morte, com elevado valor preditivo positivo (83,3%). Com 12h, o melhor parâmetro para predizer a não-sobrevivência foi a concentração de triglicerídeos acima de 64 mg/dL. Conclui-se que a determinação dos níveis de glicose ao nascimento, e triglicerídeos nas 12h demonstraram ser bons preditores do risco de morte em potros nos primeiros 30 dias de vida, apresentando elevada especificidade na predição de não-sobrevivência de potros, podendo ser utilizados para auxiliar no prognóstico dentro da rotina clínica.

**Palavras-chave:** Septicemia, placentite, amiloide A, alfa-fetoproteína, glicose, triglicerídeos.

**Keywords:** *Septicemia, placentitis, serum amyloid A, alpha-feto protein, glucose, triglycerides.*

## **Avaliação de três meios *holding* de manutenção de embrião equino produzidos no Brasil**

*Evaluation of three holding medium for equine embryo made in Brazil*

**Paula Junqueira Ferraz<sup>2\*</sup>, Flavia Crespo Vieira de Leal Fonseca<sup>2</sup>, Yuri Barbosa Guerson<sup>2</sup>,  
Jhonnatha Paulo de Oliveira<sup>1</sup>, Marcus André Ferreira Sá<sup>3</sup>, Vera Lúcia Teixeira de Jesus<sup>2</sup>,  
Diego Rodrigues Gomes<sup>2</sup>, Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Médico Veterinário autônomo; <sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; <sup>3</sup>Universidade Estácio de Sá (Campus Vargem Pequena), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*E-mail: paula.ferraz@reproducaoequino.com.br

A transferência de embrião (TE) em equino, assim como qualquer outra biotecnologia reprodutiva, apresenta algumas limitações. Apesar dos índices de recuperação embrionária e gestação atualmente serem bastante consistentes, a maior dificuldade em obter um programa bem-sucedido de TE é a administração e coordenação das muitas variáveis que podem afetar as taxas reprodutivas. Essas variáveis inclui a gestão das doadoras e receptoras, a qualidade da receptora, sincronização da ovulação, competências técnicas do operador e métodos utilizados para realizar a transferência de embriões, a qualidade do embrião, condições uterinas e nutricionais das doadoras e receptoras. Outro fator importante para melhorarmos a taxa de gestação na TE são os meios *holding* de manutenção embrionária utilizados no Brasil. Holding é uma solução complexa desenvolvida para proporcionar um desenvolvimento mais próximo possível ao que os embriões teriam no útero, permitindo que eles sejam mantidos expostos ao ar atmosférico sob temperaturas de 18 a 25°C por mais de 12 horas. Alguns que já estão no mercado há mais tempo permanecem com a mesma eficiência. Outros, porém, mais recentes, apresentam baixas taxas de gestação. O presente trabalho visou avaliar a influência de diferentes meios de manutenção de embrião equino na TE. O trabalho foi desenvolvido em um centro de reprodução equina no município de Seropédica – RJ. Foram utilizados 40 embriões de 14 éguas da raça Mangalarga Marchador, distribuídos da seguinte forma: GI (n=10) meio de embrião 1 (Biodux<sup>®</sup>); GII (n=16) meio de embrião 2 (Vitrocell embriolife<sup>®</sup>); e GIII (n=14) meio de embrião 3 (Minitube<sup>®</sup>). Todos os meios de embrião são produzidos no Brasil. Porém o meio 2 é o meio tradicionalmente utilizado em reprodução equina. Os demais meios de manutenção embrionária estão mais recentemente disponíveis no mercado. Após a coleta do embrião, o mesmo era colocado em placa de Petri contendo 10 gotas de um dos diferentes tipos de meio de manutenção embrionária. Após os embriões passarem pelas 10 gotas de meios *holding* de manutenção embrionária, foram transferidos via transcervical para receptoras previamente selecionadas por ultrassonografia (US) e citologia uterina. Uma semana após a transferência embrionária, foi realizado o diagnóstico de gestação por US, obtendo os seguintes taxas de gestações: GI - 10% (1/10), GII 68,75% (11/16) e GIII 28,75% (4/14). Estes resultados foram submetidos ao teste de Qui Quadrado a 5% de significância. O GII foi significativamente superior (p=0,0066) que os grupos GI e GIII. A taxa de gestação para o GII está de acordo com a maioria das pesquisas relacionadas a TE. Porém, bem superior ao resultado encontrado nos grupos GI e GIII. É possível concluir que meio *holding* de manutenção embrionária influencia a taxa de gestação obtida. Apesar do grande número de variáveis existentes para o sucesso da TE, é muito importante avaliar a eficiência dos meios *holding* de manutenção embrionária utilizados. Uma vez que a maioria dos médicos veterinários que trabalham a campo não creditem os resultados do programa aos meios *holding* utilizados, este será a última variável avaliada diante de possível insucesso no programa de TE.

**Palavras-chave:** transferência de embrião, éguas, gestação.

**Keywords:** *embryo transfer, mares, pregnancy.*

## Perfil proteômico do plasma seminal de asininos da raça Pêga

### *Proteomic profile of Pêga breed donkey's seminal plasma*

**Lais Ângelo de Abreu<sup>1,\*</sup>, Pedro de Almeida Rezende Fumagalli<sup>1</sup>, Thiago Victor Damasceno Teixeira<sup>2</sup>, Arabela Guedes de Azevedo Viana<sup>2</sup>, Antônio Carlos de Albuquerque Teles Filho<sup>2</sup>, Fábio Roger Vasconcelos<sup>2</sup>, Sandro Estevan Moron<sup>1</sup>, Arlindo de Alencar Araripe Moura<sup>2</sup>, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Embriologia e Genética, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, TO, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Laboratório de Fisiologia Animal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

\*E-mail: laisangeloabreu@hotmail.com

O objetivo do estudo foi descrever o perfil proteômico do plasma seminal de jumentos da raça Pêga (*Equus asinus*). Foram utilizados seis animais púberes com peso e circunferência escrotal média de 238 Kg e 36,8 cm, respectivamente, criados em propriedades no estado do Tocantins e sul do Pará, Brasil. As amostras de sêmen foram coletadas através de vagina artificial, centrifugadas e, ao plasma seminal obtido, foi adicionado inibidor de protease para acondicionamento em nitrogênio líquido. As proteínas do plasma seminal foram quantificadas e submetidas à eletroforese unidimensional, utilizando 12,5% de acrilamida e 30µg de proteína. Os géis foram corados com Coomassie Blue coloidal, as imagens digitalizadas e analisadas através do software *Quantity One*<sup>®</sup> (Bio Rad, USA). As bandas identificadas foram descoradas e digeridas com tripsina para análise em espectrômetro de massa ESI-Q-TOF. Através de bioinformática, as proteínas foram identificadas utilizando banco de dados UniProtKB e os termos da ontologia genética foram obtidos a partir do software STRAP<sup>®</sup>. O sêmen apresentou concentração média de 345,4x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, vigor 4±0,7 e 77%±0,1 de motilidade espermática progressiva. A média da concentração proteica do plasma seminal foi 23,6±12,6 µg/µl. Foram detectadas pelo menos 26 bandas por animal (*Quantity One*<sup>®</sup>). Um total de 19 bandas e 52 proteínas, com pesos entre 9,51 e 155,9 kDa, foram identificadas por espectrometria de massa. Algumas das proteínas detectadas foram; *hypoxia up-regulated protein 1*, que exerce papel fundamental nos mecanismos celulares citoprotetores desencadeados pela privação de oxigênio; *heat shock cognate 71 kDa protein 1*, que atua na proteção do proteoma celular contra o estresse térmico; *seminal plasma protein HSP-1*, relacionada com a capacidade de fertilização dos espermatozoides, uma vez que interage com glicosaminoglicanos presentes no trato genital feminino; *sperm-associated acrosin inhibitor*, que por sua vez, inibe a acrosina, que é liberada pela membrana acrossômica interna e facilita a penetração do espermatozoide na zona pelúcida. Os processos biológicos mais relevantes ligados às proteínas identificadas foram a regulação (24%) seguida por processo celular (22%). As funções moleculares das proteínas foram descritas como ligação (42%) e atividade catalítica (31%). Os componentes celulares mais abundantes foram extracelulares (26%), citoplasmáticos (12%) e complexos macromoleculares (9%). Em conclusão, o presente estudo identificou diferentes proteínas envolvidas em diversos eventos fisiológicos relacionados à proteção espermática, além de proteínas envolvidas na maturação, capacitação e reação acrossômica. Mais estudos são necessários para identificar também as proteínas espermáticas de jumentos e compreender a dinâmica da célula espermática desta espécie.

**Palavras-chave:** Plasma seminal, jumento, fertilidade, proteômica, espectrometria de massas.

**Keywords:** *Seminal plasma, donkey, fertility, proteomic, mass spectrometry.*



## **Correlação da taxa de gestação com a idade embrionária e dia da transferência de embrião em uma central comercial de reprodução equina**

*Correlation of pregnancy rate with embryo age and day of embryo transfer at a commercial equine breeding center*

**Natália de Figueiredo<sup>1</sup>, Fernanda Dutra<sup>2</sup>, Gabriel de Oliveira Dutra<sup>1</sup>, Paula Junqueira Ferraz<sup>2</sup>, Jhonnatha Paulo Oliveira<sup>2</sup>, Vera Lucia Teixeira de Jesus<sup>1</sup>, Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Médico Veterinário autônomo.

\*E-mail: juliorep@ufrj.br

O rebanho equino do Brasil encontra-se entre os cinco maiores do mundo, o que movimenta cerca de 16 bilhões de reais/ano. O crescente desenvolvimento da equinocultura está intimamente ligado aos avanços das biotécnicas de reprodução animal, com destaque para a transferência de embrião (TE), que possibilita ganhos na eficiência reprodutiva e melhoramento genético. Apesar da baixa complexidade da técnica, alguns fatores podem afetar o sucesso dos resultados, como a seleção e manejo das éguas receptoras e doadoras, monitoração através de palpação transretal e ultrassonografia e o uso de hormônios exógenos para sincronizar o estro e ovulação. O presente trabalho foi realizado através de estudo retrospectivo com análise de fichas de controle reprodutivo de éguas localizadas em uma central de transferência de embriões equinos no Estado do Rio de Janeiro, avaliando parâmetros reprodutivos como grau de sincronia, idade embrionária e dia da ovulação da égua receptora em comparação com a taxa de gestação, com intuito de aprimorar a rotina prática de centrais de transferência de embrião. Os dados analisados estão compreendidos no período de 2005 a 2015 e os resultados foram avaliados através dos testes Qui-quadrado ( $X^2$ ) e Correlação Linear ( $r$ ). Foram realizadas 976 transferências de embriões, dentre as quais 59,53% (581) resultaram em diagnósticos de gestação positivos. Embriões com 6, 7, 8, 9 e 10 dias de idade apresentaram taxas de gestação de 50,88% (86/169), 62,47% (243/389), 64,16% (213/332), 56,14% (32/57) e 30% (3/10). Dessa forma, foi possível observar que entre os grupos de embriões GE7, GE8 e GE9 houve maior taxa de gestação quando comparados com embriões dos grupos GE6 e GE10 ( $p < 0,05$ ). Um dos fatores que pode influenciar diretamente no sucesso da técnica é o grau de sincronia entre as éguas receptoras e doadoras. No presente trabalho, ao utilizar os graus de sincronia de -1 a +5 em coletas embrionárias realizadas entre 7 e 9 dias, foi possível observar que não houve interferência significativa em relação às taxas de gestação ( $p > 0,05$ ). Ao analisar, isoladamente, o dia pós ovulação da receptora, não houve diferença estatística ( $p = 0,3044$ ) entre os grupos de receptoras com 3 a 9 dias de ovulação em relação às taxas de gestação que foram respectivamente, GR3 (47,37%), GR4 (66,23%), GR5 (56,88%), GR6 (61,54%), GR7 (66,07%), GR8 (57,69%) e GR9 (61,54%). Porém, quando correlacionadas as variáveis dia da coleta embrionária e dias pós ovulação da receptora, houve correlação linear significativa ( $r = -0,745$ ) nos lavados realizados no dia 7. Concluiu-se no presente estudo que: durante um programa de transferência de embrião equino, deva-se evitar a coleta de embrião nos dias 6 e 10 pós ovulação da égua doadora. O grau de sincronia entre éguas doadoras e receptoras não precisa ser tão restrito e pode ser utilizado de forma ampla (até 5 dias posteriores de ovulação da receptora em relação à doadora) sem que haja prejuízos na taxa de gestação. Assim como não houve interferência nas taxas de gestação ao utilizar éguas receptoras compreendidas entre D3 e D9, independente do dia de ovulação das éguas doadoras e da coleta embrionária. Porém, quando correlacionados dia da transferência e dia de ovulação da receptora, existe a possibilidade de maior taxa de gestação quando éguas receptoras são usadas precocemente em lavados embrionários com 7 dias pós ovulação da égua doadora.

**Palavras-chave:** Transferência de embrião, ovário, éguas, gestação.

**Keywords:** Embryo transfer, ovary, mares, gestation.

## **Efeito da antissepsia da genitália externa sobre a condição microbiológica da fossa clitoriana, prega vestibulo-vaginal e do lavado uterino de éguas**

*Effect of antiseptics of the external genitalia on the microbiological condition of clitoral fossa, vaginal vestibular fold and uterine flushing of mares*

**Victoria Kanadani Campos Poltronieri<sup>1,\*</sup>, Bruna Waddington de Freitas<sup>2</sup>, Felipe Sperandio de Mattos<sup>3</sup>, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira<sup>2</sup>, Paulo Roberto Cecon<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Professores, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>3</sup>Graduando de Medicina Veterinária, UNIVIÇOSA, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: vicapoltronieri@hotmail.com

Com o objetivo de otimizar a produção e melhoramento genético em plantéis, as biotecnologias relacionadas a reprodução animal vêm sendo amplamente difundidas nas últimas décadas, dentre elas, a transferência de embriões (TE) na espécie equina. Todavia, a utilização frequente e por longo tempo de tal técnica vem trazendo consequências danosas aos animais submetidos, tais como, as endometrites subclínicas. Essas, geram diminuição nas taxas de fertilidade e recuperação embrionária e em parte podem ser associadas a frequente manipulação da genitália e contaminações por falhas na antissepsia da técnica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de contaminação frente os tratamentos utilizados na higienização da vulva e períneo de éguas que participam do programa de TE. O experimento foi realizado no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3x3. Para tal, 3 éguas da raça Mangalarga Marchador, com histórico reprodutivo normal e conformação perineal ideal foram submetidas a higienização da genitália externa com agentes distribuídos em três grupos, sendo o grupo 1 sabão de coco, 2 detergente e 3 clorexidina degermante 2%. Foram coletados de cada animal, um swab da fossa clitoriana pré e pós higienização, swab do vestibulo pós higienização e o conteúdo proveniente do lavado uterino em baixo volume, submetido ao exame bacteriológico. Tais amostras foram destinadas ao laboratório, onde foram semeadas em placas de ágar sangue para contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), caracterização morfológica de colônias e coloração de GRAM. As placas semeadas, apresentaram 20 colônias morfológicamente distintas, sendo destas, 8 classificadas como Gram negativas. Colônias características de *Streptococcus equi* (pequena, brilhante, β hemólise, gram positiva-A), *Klebsiella pneumoniae* (pequena, acinzentada, mucoide, sem hemólise e com bordas regulares, gram negativa-B) e *Pseudomonas aeruginosa* (média, acinzentada, bordas escurecidas, β hemólise, gram negativa-C) foram isoladas com maior frequência, sendo A e B presentes em todas as amostras de swab de fossa clitoriana pré higienização. Todos tratamentos testados foram eficientes na eliminação de A, B e C em tal região. Ao se avaliar a contaminação da prega vestibulo vaginal todas as éguas apresentaram contaminação com *Streptococcus equi* ou *Klebsiella pneumoniae* quando utilizado o tratamento 2 ou 3. A contaminação observada na prega vestibular se manteve no útero em 2 dos 3 lavados realizados, pré higienizados com clorexidina e em 1 após a lavagem da genitália externa com detergente. O tratamento 2 também apresentou uma menor eficiência na redução das contagens de UFC, sendo essa de 62%. Por outro lado, o tratamento 1 (sabão de coco) mostrou-se o mais efetivo, com contagens não significantes de UFC em região de fossa e vestibulo e negativas em útero, tendo eliminado A, B e C em todas as placas semeadas. A escolha do agente sanitizante associado à antissepsia adequada são fatores que devem ser levados em consideração na aplicação de biotécnicas reprodutivas, por poderem influenciar diretamente a condição microbiológica da genitália da fêmea equina.

**Palavras-chave:** reprodução, equinos, antissépticos, microbiologia.

**Keywords:** reproduction, equine, antiseptic, microbiology.



## **Case report: 3D ultrasonography in the early equine pregnancy evaluation**

*Relato de caso: Ultrassonografia 3D na avaliação da prenhez inicial equina*

**Cesar Augusto Camacho\*, Sabrina Bellaver Cousseau, Gustavo Henrique Zimmermann Winter, Rodrigo Costa Mattos**

REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

\*E-mail: cesarkmacho@gmail.com

Ultrasonography is a tool widely used in animal and human reproduction. The application of ultrasound to animals have a very close relationship to medical applications. The 3D ultrasonography is a tool widely used in the human medicine. Previous reports in equines showed the first demonstration of 3D ultrasonography in evaluating equine fetal development at nearly 60 days of gestation. Images in 3D are processed with B mode last frames by the ultrasound equipment itself, a feature only available on specific models. Ultrasonography in 3D mode allows the visualization of the structures such as gestational vesicle and embryo proper generating images in three axes. Through the image processing it is possible to search for all angles of vision of the structures scanned, and save still images. The present case report aimed to documents the practice of 3D mode ultrasonography on early equine pregnancy, performed from day 12 to 35 after ovulation. The first images processed by days 12 to 18 only showed the embryonic vesicle beneath uterine lumen with its spherical characteristic shape. After this time, as the embryonic vesicle encroaches the thickening endometrium, the 3D images became more interesting allowing the operator to perform better views in many points of interest. With this technic it was possible to visualize the embryo proper emerging since day 21 and his development towards dorsal aspect of vesicle over the course of following days. As the gestation advances it has become easier to explore the embryo and its structures. At the 35 day of pregnancy, a fully exploration of the embryo and its membrane dividing the yolk from allantoic sac were well denoted. During this period, it was possible to visualize early differentiation of embryo membranes by fully rotating the images in 360°. The authors do not consider 3D ultrasonography a difficult technique, but an initial training is necessary. The 3D ultrasonography can be a tool to evaluate early conceptus in many species, improving the understanding and evaluation of risk pregnancies. However, this technique does not have a clinical application yet. In the other hand, 3D images provide excellent material for educational and academic purposes, for practitioners and researchers, as well as client education.

**Key word:** embryo, risk pregnancy, mare.

**Palavras chave:** embrião, prenhez de risco, égua.



## **Prevalência de gestação gemelar na Raça Crioula comparando a redução manual ou fisiológica dos gêmeos**

*Prevalency of twin pregnancy on Criollo Breed and a comparison of the manual or physiologic reduction of the twins*

**Isadora Giorgis de Macedo<sup>1,\*</sup>, Luan Robaina Sousa<sup>2</sup>, Liana de Salles van der Linden<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade da Região da Campanha, Bagé, RS, Brasil; <sup>2</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária, Instituto de Desenvolvimento Educacional de Bagé, Bagé, RS, Brasil; <sup>3</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária, Instituto de Desenvolvimento Educacional de Bagé, Bagé, RS, Brasil.

\*E-mail: isa.giorgis@gmail.com

A gestação gemelar é vista como um problema devido as perdas econômicas geradas pelo índice de abortos, natimortos, mortalidade perinatal e queda da fertilidade da égua. Nos dias atuais, as biotecnologias reprodutivas são amplamente utilizadas na reprodução equina visando melhoramento genético e melhores índices de prenhez. Para a utilização das biotécnicas, a indução hormonal é frequentemente utilizada, pois o uso de hormônios em éguas possibilita o controle do tempo de ovulação, adiantando o processo de ovulação de folículos, e consequentemente aumentando as possibilidades de dupla ovulação. O presente estudo é um levantamento de dados como objetivo de avaliar a ocorrência de prenhez gemelar na Raça Crioula e relacionar com a influência do uso de hormônios, fatores climáticos, nutrição e manejo. Foram avaliadas 1414 éguas, com idade entre 3 e 22 anos em criatórios na região sul do Rio Grande do Sul entre os anos de 2012-2018, com acompanhamento folicular através de exames de palpação, utilizando ultrassom transretal, sendo que todos os exames foram registrados em fichas individuais das éguas, cada ficha contendo, exame do ovário esquerdo, ovário direito, útero e observações. As fêmeas avaliadas encontravam-se em condições similares de manejo, alimentadas estritamente de campo nativo e com controle sanitário adequado. As éguas avaliadas foram divididas em dois grupos: G1 éguas inseminadas com utilização de indutores de ovulação (n=1228) e G2 éguas sem indução hormonal, que se encontravam em manadas, e obtiveram acompanhamento apenas no diagnóstico de prenhez (n=186), sendo que o índice geral de prenhez não variou entre os grupos, resultando em 77,19% no G1 e 77,41% no G2. As taxas de prenhez gemelar no G1 foram de 10 (1,09%) sendo que no G2 o índice foi 0. Ao considerar as gestações gemelares, subdividimos as fêmeas em 2 grupos: Grupo A(N=5): éguas que sofreram interferência por compressão manual de uma das vesículas e Grupo B(N=5): éguas que não sofreram intervenção. O percentual de êxito no grupo A foi superior (80%) que o do Grupo B (0%). Todas as éguas tiveram diagnóstico entre o 14º e 16º dia, independente das vesículas estarem no mesmo corno ou não, optou-se pela técnica de compressão manual de uma das vesículas, em todos os casos esse procedimento foi realizado no mesmo dia do diagnóstico, considerando que as possibilidades de levar a gestação a termo sem interferência nesta espécie é mínima. Das 10 matrizes, 8 levaram a gestação a termo. Não foi observado repetição de gestação gemelar na mesma égua nas temporadas de monta subsequentes. Com a avaliação dos dados observamos a importância do diagnóstico de gestação em fases iniciais para descarte de gestações gemelares. Apesar do baixo índice de gestação gemelar, quando utilizada a indução de hormônios o índice é elevado comparado as éguas de manada, assim observamos a interferência do mesmo nas gestações gemelares. Conclui-se que se torna relevante a interferência manual na redução de uma das vesículas, aumentando os índices de prenhez a termo.

**Palavras-chave:** gestação gemelar, éguas, perda embrionária.

**Keywords:** *twin pregnancy, mares, embryo loss.*



## **Características Reprodutivas em Equinos da Raça Crioula** *Reproductive Characteristics in Equine of the Crioula Breed*

**Elisa Brun<sup>1,\*</sup>, Mariana Vilela Kaiser<sup>2</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Médica veterinária autônoma; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Animal:equinos, UFRGS; <sup>3</sup>Historep – Departamento de Morfologia, IB/UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

\*E-mail: elisa\_brun@hotmail.com

O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar as características reprodutivas de equinos da raça Crioula em diferentes regiões do estado Rio Grande do Sul (Central e Norte). Foram utilizadas 243 éguas Crioulas, pertencentes a 7 propriedades, com idade entre 2 a 30 anos e 414 ciclos estrais. As éguas foram cobertas por monta natural ou inseminadas com sêmen de 22 garanhões, com idades entre 3 a 22 anos. A taxa de prenhez foi de 68,2%. As éguas jovens com idade de 3 a 8 anos (61,7%) apresentaram taxa de prenhez menor ( $P < 0,05$ ) comparado a éguas adultas (entre 9 a 14 anos) (66,7%), porém similar ( $P > 0,05$ ) à éguas de 15 até 30 anos (59%). Os diâmetros dos 410 folículos ovulatórios apresentaram uma variação de  $38,4 \pm 3,5$  mm e  $44,1 \pm 4,7$  mm entre as temporadas. Observamos que 227 (55,36%) ovulações ocorreram no ovário direito e 183 (44,63%) ovulações no ovário esquerdo, sem diferença na taxa de prenhez, sendo que 63,9% das éguas gestantes tiveram ovulação no ovário direito e 65% no ovário esquerdo. O efeito do tamanho do folículo pré-ovulatório e a fertilidade foi avaliado, não houve diferença nas taxas de prenhez ( $P = 0,87$ ). O diâmetro pré-ovulatório médio de 264 éguas que emprenharam foi de 41,66 mm, enquanto que o tamanho médio do folículo pré-ovulatório nas 146 éguas que ficaram vazias foi de 41,57 mm. Os 414 ciclos ovulatórios ocorreram entre os meses de agosto a maio, sendo os meses de outubro a janeiro os de maior ocorrência de ciclo. A maioria das coberturas foi realizada no mês de dezembro (32,9%). O número de ciclos/prenhez foi de 1,55. As taxas de prenhez no 1º, 2º e 3º ciclos foram de 67%, 24% e 7,5%, respectivamente. O 4º e 5º ciclo apresentaram 0,7% das prenhez, devido ao baixo número de éguas que chegaram até este estágio. Nos grupos de idades avaliados neste estudo, garanhões jovens de 3 a 6 anos tiveram 72,6% de taxa de prenhez, os maduros de 7 a 12 anos com 68,8% e os velhos de 13 a 22 anos com 57,6% de prenhez, o que revela outro ponto positivo para a raça Crioula, onde garanhões velhos mantém sua fertilidade e qualidade reprodutiva. O conhecimento das características reprodutivas desta raça é de extrema importância, a fim de que se possa adequar as biotecnologias utilizadas na reprodução.

**Palavras-chave:** égua, Crioula, eficiência.

**Keywords:** mare, Creole, efficiency.



## **Imunolocalização da leptina e do receptor de leptina na placenta equina a termo**

*Immunolocalization of leptin and leptin receptor in equine placenta at term*

**Fernanda Maria Pazinato<sup>1,\*</sup>, Bruna da Rosa Curcio<sup>1</sup>, Camila Gervini Wendt<sup>1</sup>, Gabriela Castro<sup>1</sup>,  
Lorena Soares Feijó<sup>1</sup>, Carine Dahl Corcini<sup>2</sup>, Antônio Sérgio Varela Júnior<sup>3</sup>,  
Carlos Eduardo Wayne Nogueira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

\*E-mail: fernandamariapazinato@gmail.com

A leptina é um hormônio peptídico produzido e liberado pelo tecido adiposo. Contudo, na gestação tem demonstrado ação angiogênica, imunomoduladora e participação no crescimento placentário assim como no próprio feto, devido suas atividades autócrinas e parácrinas. A expressão da leptina já foi descrita na placenta de equinos, entretanto, não há descrição da imunolocalização da leptina e de Ob-R nesse tecido. O objetivo deste estudo foi identificar a presença da leptina e seu receptor na placenta equina no pós-parto através da técnica de imunofluorescência. Foram utilizadas oito éguas mestiças Crioulas que tiveram suas gestações monitoradas e permaneceram saudáveis até o momento do parto. Todos os partos foram assistidos e as placentas coletadas imediatamente após sua expulsão. As placentas foram dispostas em formato de “F” para avaliação macroscópica e coletados fragmentos do cordão umbilical, âmnion, estrela cervical, alantoide, corpo uterino, corno gravídico e corno não-gravídico para avaliação por microscopia de luz, através da coloração de hematoxilina-eosina. Fragmentos do corioalantóide correspondentes ao corno gravídico e corpo uterino foram coletados em duplicata para avaliação pela técnica de imunofluorescência. Foram utilizados como anticorpos primários: anti-leptin [Ob antibody; A-20, sc-842-rabbit (IgG)] na diluição de 1:1000, e anti-leptin receptor [anti-ObR-b; pAb M-18-goat (IgG)] na diluição de 1:100. Já como anticorpos secundários foram utilizados: Alexa Fluor 488 anti-rabbit [Goat Anti-rabbit (IgG H&L); Abcam] para anticorpo anti-leptin, e Alexa Fluor 647 anti-mouse [Donkey Anti-mouse (IgG H&L); Abcam] para anticorpo anti-leptin receptor, ambos na diluição de 1:200. Para coloração dos núcleos foi utilizado bisbenzimidaz 2% (Hoescht 33342-ab145597; Abcam). As lâminas foram cobertas por lamínulas de 0,7mm através de Fluoroshield (ab104135; Abcam). As imagens foram obtidas em microscópio confocal espectral TCS SP8 (Leica). Na avaliação macroscópica e pela microscopia de luz foi confirmado padrão característico de placentas saudáveis da espécie equina. A imunomarcagem para leptina foi observada no citoplasma das células epiteliais de microcotilédones e nas células epiteliais de região areolar da face coriônica. Enquanto, raras células de estroma apresentaram presença da imunomarcagem para leptina a nível nuclear. Já o Ob-R foi também observado nas células epiteliais de microcotilédones e de porção areolar, entretanto, sua presença foi mais evidente na porção apical do citoplasma. A imunomarcagem para Ob-R foi discreta nas células do estroma alantoideano, semelhante ao observado para leptina. A presença de leptina e seu receptor na placenta equina é similar ao descrito em outras espécies, nas quais sugere-se que a placenta é um órgão de controle endócrino da leptina durante a gestação. Conclui-se que tanto a leptina como o Ob-R estão presentes nos epitélios microcotiledonar e de região areolar da placenta, e a presença de ambos no tecido placentário pode sugerir participação da leptina na regulação da gestação em equinos.

**Palavras-chave:** gestação, equinos, imunomarcagem, leptina.

**Keywords:** pregnancy, equine, immunostaining, leptin.



## Microbiota of the seminal fluid from healthy and fertile stallions

*Microbiota do fluido seminal de garanhões saudáveis e férteis*

Sandra Bautista Jaimes<sup>1</sup>, Angélica Marcela Correa<sup>2</sup>, Shirley Andrea Florez Rodriguez<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Student of the Zootechnics Program, Industrial University of Santander, Málaga, Colombia; <sup>2</sup>Teacher of the Zootechnics Program, Industrial University of Santander, Málaga, Colombia; <sup>3</sup>Agroindustrial Research Center – CIAGRO, Zootechnics Program, Industrial University of Santander, Málaga, Colombia.

\*E-mail: saflorez@uis.edu.co

Seminal microbiota is the ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms, such as, bacteria and fungi, that reside in the reproductive tract and semen. They are not closely associated with infection in the horse, but related to endometritis in mare. The aims of this study were to describe the bacterial and fungal flora present in the semen of healthy and fertile horses and to determine the susceptibility or resistance of some bacteria to specific antibiotics. Semen samples were collected from 7 healthy Colombian Creole Horses. The stallions with ages ranging from 4 to 12 years of age, are used for natural mating, with no evidence of any reproductive track pathology. Previously, the surface of the penis/prepuce was cleaned using water (37°C). An aliquot of free gel semen was deposited in a sterile conical centrifuge tube immediately after collection and transported to the laboratory for analysis. Then, a sample of 1ml was diluted in 9ml peptone water (Merck®). For isolation and identification of bacteria, this dilution was plated in the following culture mediums: Nutrient agar (Merck®), MacConkey plate, CHROMagar ORIENTATION(Annar®), at 37 °C for 24 h. Also, biochemical tests were used to characterize accurately the bacteria. For the recovery of fungi was used Sabouraud 4% dextrose agar (Merck®), at 25 °C for 72 h. Antibiotic susceptibility test was verified using Mueller Hinton agar for five antibiotics (Cefepime, Gentamicin, Penicillin, Amoxicillin plus clavulanic acid and Amikacin). The prevalence was calculated and described as a percentage (%). Results showed that all the ejaculates presented bacteria and fungi, despite of an appropriate hygienic conditions during the collect. Of the 5 bacterial species isolated in the ejaculate, the most frequently isolated bacteria were *Enterococcus* (100%), followed by, *Escherichia coli* (85.71%), *Acinetobacter* (85.71%), *Staphylococcus saprophyticus* (71,43%), *Staphylococcus epidermis* (42,86%) and *Pseudomonas aeruginosa* (42.86%). The most represented mycelial fungi were *Aspergillus spp.* (90%), *Levadura spp.* (53%), *Penicillium spp.* (26%), *Fusarium spp.* (20%), and *Rhodotorula spp.* (10%). The results show that contamination with bacteria and fungi was found in all the samples. The microbiota present in the equine ejaculate was similar to some previous reports for the specie. The frequency of isolation of fungi in semen was high, however, those species cultivated are generally considered airborne contaminants. The presence of *Pseudomonas aeruginosa*, that is an opportunistic pathogen of clinical relevance, have been associated with reduced fertility. Additionally, *P. aureginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter*, and *Aspergillus spp.*, have been found in straws. In the current study, Amoxicillin plus clavulanic acid and Amikacin offered better control of bacterial growth, whereas that, the other antibiotics were ineffective for *E coli*. Ejaculates collected from healthy and fertile stallions contain bacteria and fungi with high prevalence. This microbiota could be pathogenic for susceptible mares to endometritis. Therefore, it is important to find efficient antibiotic alternatives for the control of microorganisms in semen. As well as, to verify the type of microbial contamination in fresh semen.

**Keywords:** Semen, bacterial, fungi, Antibacterial efficacy.

**Palavras-chave:** Sêmen, bacterial, fungos, eficácia antibacterial.



## **Parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador pós administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) nas diferentes estações do ano**

*Seminal parameters of Mangalarga Marchador stallions after administration of human chorionic gonadotrophin (hCG) in the different seasons*

**Rita de Cássia Lima Morais\***, **Diego Rodrigues Gomes**, **Flávia Crespo Vieira de Leal Fonseca**,  
**Carla Fernanda Paranhos de Moura Carvalho**, **Vera Lúcia Teixeira de Jesus**,  
**Júlio Cesar Ferraz Jacob**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil.

\*E-mail: morais.l.cassiavet@hotmail.com

Ao longo da estação de monta pode ocorrer um decréscimo qualitativo em alguns parâmetros reprodutivos dos garanhões como, por exemplo, na libido e na qualidade espermática. O hCG tem sido usado para avaliar os receptores de hormônio luteinizante (LH), em células de Leydig de equinos com a vantagem de ser mais estável que o LH equino, apesar de ambas as gonadotrofinas estimularem a esteroidogênese. Observando essas informações, essa pesquisa objetivou avaliar possíveis alterações nos parâmetros seminais de garanhões férteis após a administração de hCG durante as diferentes estações do ano. O experimento foi realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), durante os meses de janeiro (verão), abril (outono), julho (inverno) e outubro (primavera) do ano de 2016, sendo utilizados quatro garanhões, da raça Mangalarga Marchador, em idade reprodutiva (5-10 anos). Os animais foram divididos em dois grupos: GI (n=4), administrando 5ml de solução salina e GII (n=4), administrando 5000 UI (5ml) de hCG, ambos *i.v.* Em cada mês os protocolos foram subdivididos em dois ciclos (C1 e C2), com seis dias cada e com um intervalo de três dias entre os ciclos seguindo o esquema “cross over”, onde: C1 = animal 1 (GI) e 2 (GII) avaliados nos dias D1, D3 e D5 e animal 3 (GI) e 4 (GII) em D2, D4 e D6; C2 = animal 1 (GII) e 2 (GI) avaliados nos dias D1, D3, D5 e animal 3 (GII) e 4 (GI) em D2, D4 e D6. O tratamento foi realizado apenas no primeiro dia de cada ciclo. Uma égua em estro foi contida, sempre no mesmo local, para realização da coleta de sêmen. Terminada a coleta, o sêmen foi encaminhado ao laboratório para avaliação do volume filtrado, motilidade, vigor e concentração. Os valores médios dos seguintes parâmetros espermáticos estão demonstrando GI e GII respectivamente, sendo o volume de sêmen filtrado no verão (44,6±25 e 48,3±33,8), outono (50±17 e 55,4±15,7), inverno (45,5±28,7 e 42±21,1) e primavera (57,8±17,5 e 55,3±11,1). Quanto a motilidade (%), os resultados foram, verão (69,1±13 e 60,8±17,7), outono (61,6±18,7 e 70,5), inverno (65,4±10,8 e 69,1±11,3) e primavera (71,6±7,4 e 68,9±12,6). O vigor espermático (1-5) obtido foi, no verão (3,2±0,6 e 3±0,6), outono (3,3±0,8 e 3,2±0,4), inverno (3,2±0,4 e 3,3±0,5) e primavera (3,1±0,3 e 3,1±0,7). Os valores observados em relação a concentração espermática (x 10<sup>6</sup> spz/ mL) foram no verão (62,3±36,3 e 51,2±31,3), outono (53,7±32,5 e 49,4±21,3), inverno (209,1±181 e 180,4±129,4) e primavera (155±37,66 e 172,5±123,6). Em relação a todos os parâmetros seminais avaliados, os resultados obtidos não apresentaram diferenças entre os tratamentos com solução salina e com hCG e nem entre as estações do ano (P>0,05). Concluiu-se que mesmo entre as diferentes estações do ano no município de Seropédica-RJ e com ou sem administração de uma única dose de 5000 UI de hCG não houve alterações nos parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen em garanhões da raça Mangalarga Marchador nas condições pesquisadas.

**Palavras chave:** andrologia, garanhões, hCG.

**Keywords:** andrology, stallions, hCG.

## **Piometra equina após endometrite severa: conduta terapêutica (relato de caso)**

*Equine pyometra after severe endometritis: therapeutic management (case report)*

**Marcus André Ferreira Sá<sup>1\*</sup>, Paula Junqueira Ferraz<sup>3</sup>, Flavia Vieira Crespo de Leal Fonseca<sup>2</sup>, Yuri Barbosa Guerson<sup>2</sup>, Vera Lúcia Teixeira de Jesus<sup>2</sup>, Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estácio de Sá (UNESA, Campus Barra III), Vargem Pequena, Rio de Janeiro, Brasil. Bolsista do Programa Pesquisa Produtividade da UNESA; <sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil; <sup>3</sup>Médico Veterinário autônomo.

\*E-mail: marcus.ferreira85@hotmail.com

A piometra é uma importante causa de infertilidade em éguas, caracterizada pelo acúmulo de exsudatos purulentos no útero além da persistência do corpo lúteo acima da sua vida normal. Negligenciar o correto diagnóstico da piometra em éguas pode representar alta perda econômica. Frequentemente, a piometra equina não é diagnosticada até a descarga vulvar ser observada ou durante a realização de lavado uterino. A realização do exame clínico e exames complementares como ultrassonografia do trato reprodutivo e amostragens uterinas (citologia e cultura endometrial) podem fornecer valiosas informações que conduzem a terapêutica precisa. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo descrever a resolução de caso de piometra equina após estabelecimento de terapia de acordo com exames complementares. Égua Quarto de Milha, 23 anos de idade, foi selecionada pelo proprietário como doadora de embrião. Após exame ultrassonográfico para controle folicular visando a TE foi identificado aumento do volume uterino, cornos uterinos bem dilatados e teste do balotamento negativo. Ao realizar ultrassonografia transretal, foi observada presença de corpo lúteo (CL) no ovário direito e grande quantidade de conteúdo anecóico com pontos hiperecogênicos por toda a extensão do útero, característico de piometra. Segundo informações obtidas no haras, durante a estação reprodutiva anterior, essa égua foi submetida a vários tratamentos devido a endometrite aguda. Desde então, a égua não manifestou sinais de cio. Após a confirmação do diagnóstico, o conteúdo uterino foi drenado com auxílio de sonda uterina tipo “Bivona”, retirando 9 litros de conteúdo purulento e altamente viscoso. Procedeu-se então a lavagem uterina com solução Ringer com Lactato, realizando a infusão e subsequente drenagem de um litro por vez, totalizando 12 litros. O procedimento de lavagem uterina foi realizada até que a solução Ringer com Lactato drenada se apresentasse translúcida, livre de celularidade. Neste momento, foi coletado material uterino para exame citológico, cultura e antibiograma. A cultura microbiológica apresentou crescimento de *Enterococcus sp*, *Streptococcus sp* e *Escherichia coli*. O antibiograma revelou sensibilidade a Gentamicina, Enrofloxacina e Cefalosporina e resistência a Penicilina. O exame citológico apresentou com enorme quantidade de neutrófilos por campo ( $\geq 40$ ), macrófagos e eosinófilos, típicos de endometrite crônica. Foi realizada antibioticoterapia de acordo com o resultado do antibiograma: infusão uterina com 100 ml de Gentrin<sup>®</sup> (Ourofino Saúde Animal, Cravinho, SP) e administração por via intramuscular (IM) de Gentamax<sup>®</sup> (Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP), 4 mg/kg, ambos por 5 dias, além de 10mg de Lutalyse<sup>®</sup> (Zoetis Brasil), IM, a cada 24h durante três dias. Após dois ciclos subsequentes foi realizada nova coleta de material uterino. Desta vez, não houve crescimento bacteriano e identificação de neutrófilos, demonstrando ter ocorrido resolução completa do caso, apesar da gravidade e duração prolongada do quadro apresentado. É possível concluir que o tratamento de acordo com a cultura e antibiograma foi eficaz em eliminar os sinais clínicos da piometra.

**Agradecimento:** Programa Pesquisa Produtividade da UNESA pela concessão da bolsa.

**Palavras-chave:** corpo lúteo persistente, prostaglandina, senilidade, útero,

**Keywords:** *persistent corpus luteum, prostaglandin, senility, uterus,*



## **The Horse 4MID® kit as a promising tool to compare different freezing media to preserve stallion semen**

**D. Blommaert<sup>1</sup>, T. Franck<sup>2</sup>, J.P. Lejeune<sup>1</sup>, M. Selleslagh<sup>3,4</sup>, N. Jouy<sup>3</sup>, N. Sergeant<sup>3,4,\*</sup>, D. Serteyn<sup>1,2</sup>, M. Delehedde<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup>LINALUX-MLS, Centre Européen du Cheval, Mont-le-Soie, 1, Vielsalm 6698, Belgium; <sup>2</sup>Center for Oxygen Research and Development (CORD), University of Liège, Liège, Belgium; <sup>3</sup>Univ. Lille, Inserm UMRS 1172, Place de Verdun, 59045 Lille, France; <sup>4</sup>SPQI - 4BioDx, 4BioDx-Breeding Section, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France.

\*E-mail: nsergeant@4biodx.com

Appropriate molecular indicators of sperm quality in post-thawed stallion semen is still lacking. Over the years, the proAKAP4 sperm protein has been described as a good indicator of sperm quality that is correlated with fertility in humans and more recently in pigs and bulls. Structurally, proAKAP4 must be processed to release the functional protein A-kinase anchor protein 4 (AKAP4). In this study, we evaluate the pertinence of the proAKAP4 concentrations as a sperm quality parameter using the Horse 4MID® kit (4BioDx, France) in post-thawed semen of stallions. Ejaculates were collected from 4 stallions at Mont Le Soie (Linalux, Belgium). Sperm samples were diluted and cryopreserved using 2 different extenders referenced as extender A and extender B. Straws in both extenders were packed at 0.5 mL with 150 million spermatozoa/mL. To analyze the processing of proAKAP4 during cryopreservation, several orthogonal methods were performed. Sperm motility was obtained by computer assisted semen analysis (CASA) (IVOS version 12.0, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), viability and cell death were assessed by flow cytometry using the Zombie NIR™ Die and proAKAP4 concentrations were determined by the Horse 4MID® methods, flow cytometry and western blotting. All these assessments were performed at 0 and 4 hours after thawing of stallion straws. At T0 in post thawed conditions, and for all stallions, the concentrations of proAKAP4 were always lower in extender A when compared to the extenders B, showing that the cryo-extender can impact the processing of proAKAP4 and thus the quality of semen. At 4 hours post thawing, the amplitudes of variation of proAKAP4 concentrations were higher in extender B than in extender A (from 2- to 8-fold) and associated with loss of motility and vitality as assessed by flow cytometry and western blotting. Furthermore, the proAKAP4 concentrations are predicting the numbers of spermatozoa that will remain motile and fertile up to 4 hours after thawing. In conclusion, the Horse 4MID® appears as pertinent tool to evaluate the processing of proAKAP4 and the efficiency of different extenders in cryopreservation of equine semen to predict the number of spermatozoa that will remain motile and functional to reach and fertilize the oocyte.

**Keywords:** semen quality, stallion, fertility, marker, proAKAP4, extender, cryopreservator.



## Duas técnicas para coleta de histotrofo em éguas

### *Two techniques for collection of histotroph in mares*

**Augusto de Paiva Palhares<sup>1</sup>, Fernanda Marcelo dos Santos<sup>1</sup>, Máira Rodrigues de Sousa<sup>1</sup>, Ana Carolina Bahia Teixeira<sup>1</sup>, Bruna Alves Branco de Souza<sup>1</sup>, Rafael Andrade Brandão<sup>1</sup>, Daniela Taynara Pereira<sup>1</sup>, Júlia Campos Bezerra<sup>1</sup>, Fabíola Paes Leme<sup>2</sup>, Guilherme Ribeiro Valle<sup>3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos do Curso de Medicina Veterinária da PUC Minas Betim; <sup>2</sup>Professora da Escola de Veterinária da UFMG/Laboratório de Apoio à Pesquisa (LAPEQ) do Hospital Veterinário da UFMG; <sup>3</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária da PUC Minas/Programa de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados da PUC Minas, Betim, MG, Brasil.

\*E-mail: guilhermeribvalle@gmail.com

A composição do histotrofo pode estar relacionada à morte embrionária seletiva de acordo com o sexo do embrião, uma das formas propostas de ajuste da razão sexual (Trivers RL & Willard DE 1973. *Science*, 179:90-92). Entretanto, poucos estudos caracterizaram a composição do histotrofo em equinos. Considerando a incompatibilidade dos procedimentos de coleta de histotrofo e a sobrevivência embrionária nas éguas coletadas, este estudo pretendeu descrever e validar duas técnicas de coleta de histotrofo “in vivo” em éguas. Em oito éguas mestiças foram coletadas aos 13 dias pós-ovulação amostras de plasma sanguíneo e histotrofo utilizando duas técnicas. A primeira com introdução pela cervix de um aparelho metálico de citologia uterina com uma gaze guardada na sua extremidade e presa a um fio de algodão que ia até a extremidade oposta. Com camisa sanitária, o aparato era introduzido e, no corpo do útero, a haste metálica interna introduzia a gaze na luz uterina, onde permanecia por 30-40 minutos. Em seguida a gaze era tracionada pelo fio de algodão novamente para o interior do aparelho, e o conjunto retirado da égua. A gaze embebida com histotrofo (“in natura”) era colocada em um tubo com fluoreto de sódio e submetida a centrifugação a 2.000rpm/10min. Imediatamente após, um aparelho plástico descartável de coleta de citologia uterina era introduzido com camisa sanitária e o suabe de algodão depositado na luz uterina, onde permanecia por 5min. A extremidade embebida com histotrofo era mergulhada em 1,0mL de solução composta por sulfato de gentamicina 5%, fluoreto de sódio (1 gota/3,0mL) e H<sub>2</sub>O d.d. (histotrofo em solução). Utilizando kits comerciais para dosagem de glicose e microproteína em espectrofotômetro automático Cobas-Mira (Roche), foram feitas as dosagens e calculada a relação glicose/proteína (G/P) no histotrofo. Nenhuma correlação foi verificada (Pierson; P>0,05) entre: G/P histotrofo “in natura” vs. G/P histotrofo em solução; G/P histotrofo “in natura” vs. glicemia; G/P histotrofo em solução vs. glicemia; glicose histotrofo “in natura” vs. glicemia. Estes resultados indicam ter sido eficiente a técnica de coleta de histotrofo “in natura”, mas inadequada a técnica de coleta de histotrofo com suabe uterino como realizada, possivelmente por uma forma de coleta ter afetado o resultado da outra, sugerindo-se fazer a validação da técnica de suabe durante o estro, com coleta simultânea pelas duas técnicas, e sem uso de antibióticos no meio. Entretanto, pôde-se verificar que a glicemia do momento não parece influenciar a composição de glicose do histotrofo. Aprovação CEUA PUC Minas 012/2017; financiamento FIP PUC Minas 2018/1107-1S.

**Palavras-chave:** equino, histotrofo, composição, avaliação, técnica de coleta.

**Keywords:** equine, histotroph, composition, evaluation, collection technique.

## Ureia e creatinina no líquido amniótico e sérico em neonatos provenientes de éguas com placentite

*Urea and creatinine in the amniotic fluid and serum in neonates from mares with placentitis*

**Rafaela Bastos da Silva\***, Camila Gervini Wendt, Fernanda Maria Pazinato,  
Lorena Soares Feijó, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Bruna da Rosa Curcio

Departamento de Clínicas Veterinária – Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

\*E-mail: rafaelaaa.bastos@gmail.com

A placentite é a principal causa de perdas gestacionais tardias em equinos, pois compromete a unidade útero-feto-placentária e interfere na difusão de metabólitos entre as circulações materna e fetal. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de creatinina e ureia do líquido amniótico (LA) de éguas com placentite e relacionar com os níveis séricos desses metabólitos nos respectivos neonatos. Foram utilizadas 36 éguas gestantes da raça Puro Sangue Inglês e seus respectivos potros, dessas 31 éguas sadias e 5 com placentite. As éguas foram monitoradas durante a gestação e os animais com sinais clínicos de placentite tratados com Sulfa-trimetoprim (Trissulfim®, Ouro Fino Agronegócio, Brasil), na dose 30mg/kg, endovenoso, a cada 12 horas, durante 10 dias, Flunixin meglumine (Desflan®, Ouro Fino Agronegócio, Brasil), na dose 1,1mg/kg, endovenoso, a cada 24 horas, com duração de sete dias e Altrenogest na dose de 0,088 mg/kg, oral, a cada 24h, até os 320 dias de gestação. Todos os partos foram assistidos, as coletas de LA realizadas na segunda fase do parto e as coletas séricas do neonato em até 5 minutos após o nascimento. O diagnóstico de placentite foi confirmado através da avaliação histopatológica da placenta. As análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria. A estatística foi realizada através do software Statistix 10.0, sendo utilizado o teste de T Two sample para comparação entre as médias e a correlação pelo método de Pearson, os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão, com significância  $P < 0,05$ . O tempo gestacional não diferiu entre os grupos e todos os potros foram viáveis sem sinais de imaturidade. Os valores de creatinina (mg/dL) do LA de éguas com placentite foram menores que de éguas sadias, sendo, respectivamente,  $2,88 \pm 0,38$  e  $5,1 \pm 0,59$ . Já a ureia (mg/dL) não diferiu entre os grupos sendo  $34,25 \pm 4,52$  para as placentites e  $33,59 \pm 2,34$  para as sadias. Na avaliação sérica, a ureia apresentou-se mais elevada em potros oriundos de gestações com placentite, sendo  $100 \pm 7,17$  e  $83,6 \pm 2,20$  para as sadias, enquanto a creatinina não diferiu entre os grupos, sendo  $2,58 \pm 0,19$  para os potros do grupo placentite e  $3,01 \pm 0,16$  do grupo sadias. Foi observado correlação moderada ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,0004$ ) entre creatinina e ureia LA, correlação fraca ( $r = 0,38$ ,  $p = 0,0242$ ) entre a creatinina do LA e sérica, não houve correlações dentre os demais parâmetros. Em humanos, níveis baixos de creatinina no LA estão relacionados a imaturidade fetal e baixo peso ao nascer. Os níveis de creatinina encontrados no LA das éguas com placentite sugerem que alterações placentárias promovem mudanças neste parâmetro, mesmo associadas ao nascimento de potros viáveis. Potros provenientes de éguas com placentite, apresentaram elevada concentração de ureia sérica ao nascimento, possivelmente devido ao balanço energético negativo, que ocorre em potros que sofreram estresse e catabolismo durante o período fetal, ou devido a reduzida atividade de depuração placentária nesses casos. Conclui-se que a presença de placentite na gestação promoveu redução nos valores de creatinina do líquido amniótico e incremento da uréia sérica dos potros.

**Palavras-chave:** potros, bioquímico, equinos.

**Keywords:** foals, biochemistry, equine.

## Estudo comparativo da biometria testicular em garanhões de diferentes raças

### *Comparative study of testicular biometry in different breed stallions*

**Ana Clara Bueno Gomes<sup>1,\*</sup>, Kamilla Dias Paes Silva<sup>1</sup>, Cristian Teixeira Silva<sup>2</sup>,  
Armando Martins Teixeira Cota<sup>2</sup>, Fabyano Fonseca e Silva<sup>2</sup>, Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: anaclarabuenogomes@hotmail.com

A biometria testicular permite identificar anormalidades, calcular o volume total (VT) e estimar a produção diária de espermatozoides (DSO) de um garanhão. A determinação da DSO contribui com o planejamento da estação de monta, permitindo prever quantas éguas poderão ser inseminadas com um único ejaculado, propiciando um melhor controle do mercado de venda de coberturas. Objetivou-se com esse trabalho comparar as medidas testiculares (comprimento, altura e espessura), o VT e a DSO de 13 garanhões de diferentes raças (Bretão - BT, Campolina - CP, Quarto de Milha - QM, e Mangalarga Marchador - MM), com idade média de 6,3 anos. Além disso, objetivou-se comparar dois diferentes métodos de mensuração testicular, bem como verificar se há simetria entre os pares testiculares. As mensurações testiculares foram determinadas de duas formas: com o auxílio de um paquímetro testicular (PAQ) e por ultrassonografia modo-B (US) com probe linear transretal de 5 MHz (ALOKA SSD-500). A fórmula matemática  $0,5233 \times (\text{comprimento em cm}) \times (\text{espessura em cm}) \times (\text{altura em cm})$  foi utilizada para o cálculo do volume testicular individual e o volume testicular total foi calculado somando os volumes testiculares direito e esquerdo. Posteriormente, o cálculo da DSO foi determinado pela fórmula  $0,024 \times (\text{VT total}) - 0,76^3$ . Todas as comparações entre médias foram realizadas por meio do teste t-Student considerando variâncias desiguais via função t.test do software R, sendo diferenças consideradas quando  $p < 0,05$ . Os animais da raça Bretão apresentaram maior valor de VT total (BT:  $553,0 \pm 106,0^a$ ; CP:  $256,0 \pm 20,0^b$ ; QM:  $259,25 \pm 40,754^b$ ; MM:  $260,4 \pm 15,870^b$ ) e maior DSO (BT:  $13,031 \times 10^9 \pm 2,741^a$ ; CP:  $5,705 \times 10^9 \pm 0,48^b$ ; QM:  $5,783 \times 10^9 \pm 0,978^b$ ; MM:  $5,811 \times 10^9 \pm 0,381^b$ ) entre as raças avaliadas, não havendo diferença entre as demais raças. As médias da altura (PAQ:  $7,194 \pm 0,416$ ; US:  $6,007 \pm 0,254$ ) e espessura (PAQ:  $5,997 \pm 0,382$ ; US:  $5,496 \pm 0,446$ ) testicular diferiram entre os métodos de mensuração, sendo maior com o uso do paquímetro em comparação a ultrassonografia. Não houve diferença estatística entre as dimensões do testículo direito e esquerdo. Verificou-se, ainda, que existe uma correlação positiva entre a idade e o volume testicular ( $p < 0,05$ ), de forma que ao acréscimo de um ano na idade do animal, há um aumento de  $12,09 \text{ cm}^3$  no VT. O VT é um parâmetro amplamente utilizado na bovinocultura na seleção de reprodutores, por ter elevada correlação com produção espermática e fertilidade. No presente trabalho foi possível observar elevada correlação entre o VT e o DSO em diferentes raças equinas, sendo parâmetros de grande interesse a serem incluídos no exame andrológico para seleção de garanhões. A diferença encontrada na mensuração da altura e espessura testicular, com os diferentes métodos, pode estar relacionada à dificuldade em se excluir estruturas contidas na bolsa escrotal utilizando o paquímetro, como por exemplo o epidídimo, superestimando a medida encontrada. Assim como previsto em condições normais, em que se tolera até 10% de diferença entre órgãos altímetros, observou-se simetria entre todos os pares testiculares. Dessa forma, conclui-se que os métodos de mensuração testicular influenciam na mensuração das dimensões testiculares, tendo a ultrassonografia apresentado maior acurácia do que o paquímetro. Todos os garanhões apresentaram simetria entre os pares testiculares, no entanto, os garanhões da raça Bretão possuem maior VT total, o que influencia em uma maior produção espermática diária em comparação as demais raças.

**Palavras-chave:** testículo, produção espermática, equinos.

**Key words:** testicle, sperm production, equine.



## **Congelamento de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador: efeito de crioprotetores na qualidade seminal**

*Mangalarga Marchador semen freezing: effect of cryoprotectants on seminal quality*

**Victoria Kanadani Campos Poltronieri<sup>1,\*</sup>, Bruna Waddington de Freitas<sup>2</sup>,  
Ytalo Galinari Henriques Schuartz<sup>1</sup>, José Domingos Guimarães<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Professores do Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: vicapoltronieri@hotmail.com

O melhoramento genético e o aumento da produtividade na criação de equinos tem elevado consideravelmente a demanda pela propagação de material genético de linhagens consagradas. Visando favorecer a logística, o uso do sêmen congelado vem difundindo-se no mercado. Entretanto, na espécie equina tal processo ainda não se encontra tão bem consolidado como na espécie bovina, onde a biotecnologia é amplamente difundida. Em função disso, a busca por um crioprotetor que mantenha uma boa viabilidade espermática vem sendo objeto de muitos estudos. No presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da dimetilformamida e do glicerol, associados ou não, sobre a viabilidade espermática do sêmen equino criopreservado. O experimento foi realizado em Viçosa, MG, em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 4x4. Para tanto, foram utilizados 4 garanhões aptos à reprodução, da raça Mangalarga Marchador. Os ejaculados foram coletados entre junho e julho de 2013, totalizando 30 partidas congeladas. As características de todos ejaculados adquiridos apresentaram-se dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (2013) para o congelamento de sêmen comercial. A tais, foram aplicados 4 tratamentos, tendo como base o diluente Botu-Crio<sup>®</sup>, sem crioprotetor: diluente base adicionado de glicerol 5% (1); diluente base adicionado de dimetilforfamida 5% (2); diluente base adicionado de glicerol 2% e dimetilforfamida 3% (3) e Botu-Crio<sup>®</sup> comercial (grupo controle 4). As amostras descongeladas foram submetidas à citometria de fluxo, para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal (A), potencial mitocondrial (B), peroxidação da membrana espermática (C), produção de peróxido de hidrogênio intracelular (D) e organização da bicamada lipídica (E). Nas análises A, C, D e E os melhores resultados foram aqueles obtidos com tratamento a base de 5% de dimetilformamida ou quando esta foi associada a glicerol 2%. O tratamento realizado a partir de glicerol 5% resultou na menor porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática e acrossomal íntegra, além de uma maior quantidade de células com desorganização da bicamada lipídica e altas concentrações de peróxido de hidrogênio intracelular por célula viável. Tais evidências indicam que o congelamento seminal com glicerol tenha resultado em capacitação espermática e reação acrossomal precoces. A dimetilformamida, associada ou não ao glicerol, foi responsável pelas melhores características *in vitro* do sêmen congelado de garanhões, sendo uma melhor alternativa ao uso de glicerol em concentrações de 5%.

**Palavras-chave:** reprodução, equinos, criopreservação.

**Keywords:** reproduction, equines, cryopreservation.

## Higienização da região perineal da égua antes de procedimentos: qual o melhor método? Hygiene of the mare's perineal region before procedures: which is the best method?

**Mariana Vilela Kaiser<sup>1,3,\*</sup>, Silvia Leal Ladeira<sup>2</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Animal:equinos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Laboratório Regional de Diagnóstico - Universidade Federal de Pelotas; <sup>3</sup>Historep – Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas.

\*E-mail: marikaiser95@gmail.com

Em decorrência do aumento no número de criadores de equinos, há uma maior aceitação de biotécnicas reprodutivas, visando vantagens econômicas e sanitárias, além de possibilitar o progresso genético da espécie. A contaminação uterina apresenta impacto negativo no índice de sucesso após a utilização de biotecnologias. Falhas nas barreiras físicas que protegem o útero são uma causa comum de subfertilidade em éguas. Uma cérvix fraca como barreira física, longo período de estro, contaminação de materiais ou materiais carreando patógenos que se encontram na vulva em direção ao útero, durante o exame clínico ou durante a aplicação de biotecnologias, podem tornar as éguas predispostas a infecções, tais como a endometrite persistente causando infertilidade. Devido a este fato, a limpeza da região perineal é de grande importância para evitar esse tipo complicação, uma vez que a correta higienização antes de procedimentos reduz o risco de carrear agentes contaminantes para o interior do útero. O presente estudo teve como objetivo avaliar a carga bacteriana presente na região perineal de éguas após a utilização de diferentes métodos de higienização. Para realização do estudo, foram utilizadas 9 éguas da raça Crioula, alojadas em uma propriedade na cidade de Capão do Leão, Rio Grande do Sul. Todas as fêmeas se encontravam vazias e em manejo extensivo com pastagem nativa e água *ad libitum*. As éguas foram colocadas em tronco de contenção para a realização da limpeza da região perineal, por um técnico experiente, apenas com papel toalha (Grupo 1) e logo em seguida, foi realizada a coleta de um *swab* da região; Após, a mesma região foi lavada por três vezes com sabão neutro e água e outro *swab* foi coletado (Grupo 2); e por fim, foi realizada uma limpeza com algodão embebido em água destilada e a última amostra foi coletada (Grupo 3). Os *swabs* (27 amostras) foram colocados em meio de transporte e as amostras encaminhadas para o Laboratório Regional de Diagnóstico/FAVET/UFPel, onde foram semeados em Agar sangue ovino 5% e Agar Mac Conkey por até 72 horas a 37°C. Após o crescimento das colônias foi realizada a coloração de Gram e provas de Catalase e Coagulase para caracterização dos gêneros. Nas amostras do Grupo 1 semeadas em meio Agar sangue foi observado crescimento bacteriano em 100% (n=9) das amostras, com predominância de bactérias do tipo *Staphylococcus* spp coagulase negativa e *Corynebacterium* sp, além de uma poliflora bacteriana abundante. No Grupo 2 houve redução na contagem bacteriana, com apenas 3 éguas (33,3%) apresentando *Staphylococcus* spp coagulase negativa, enquanto que o Grupo 3 apresentou 2 éguas (22,2%) com crescimento bacteriano (*Staphylococcus* spp coagulase negativa). No meio Mac Conkey não houve crescimento bacteriano. Os resultados encontrados no estudo sugerem que a higienização da região perineal das éguas utilizando apenas papel toalha pode comprometer a saúde reprodutiva dos animais, uma vez que as amostras coletadas demonstraram que após a higienização com este método, ainda havia altos níveis bacterianos, porém as demais práticas de higienização utilizadas, mesmo quando realizadas por técnico treinado, ainda podem trazer riscos de contaminação. Recomenda-se que a limpeza da região perineal das éguas seja realizada utilizando o método utilizado no Grupo 3. A limpeza da região perineal da égua antes de procedimentos é de suma importância para prevenção de possíveis endometrites, e a correta higienização pode diminuir a carga bacteriana e reduzir o risco de contaminação quando ocorrer falhas do sistema imunológico da égua.

**Palavras-chave:** endometrite, égua, biotecnologia.

**Keywords:** endometritis, mare, biotechnology.



## **Efeito da diluição pós-descongelamento sobre a cinética espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal de sêmen congelado de jumentos da raça Pêga**

*Effect of post-thaw dilution on sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen semen of Pêga donkeys*

**Maria Eduarda Borges Figueira<sup>1\*</sup>, Arabela Guedes de Azevedo Viana<sup>1</sup>,  
Ciro Alexandre Alves Torres<sup>2</sup>, Bruna Waddington de Freitas<sup>1</sup>, Flávia Vieira de Freitas<sup>3</sup>,  
Cristian Silva Teixeira<sup>2</sup>, Carlos Mattos Teixeira Soares<sup>1</sup>, Maria Gazzinelli Neves<sup>2</sup>,  
Kamilla Dias Paes<sup>1</sup>, Lorraine Marcelle Lopes da Costa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG; <sup>3</sup>Departamento de Nutrição e Produção Animal, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: mebfvet@hotmail.com

A criopreservação de sêmen de asininos, apesar de apresentar vantagens, ainda possui limitações quanto aos danos causados aos espermatozoides, não só pela técnica como também pelo uso de determinados crioprotetores. Apesar de oferecer proteção contra a formação de cristais de gelo intracelulares, esses agentes causam danos diretos e indiretos às células espermáticas, além da hipótese de que sejam deletérios ao endométrio de jumentas, especialmente o glicerol. Em função disso, pode ser recomendada a diluição pós-descongelamento, na intenção de diluir ou retirar o crioprotetor presente nos espermatozoides, reduzindo seus efeitos deletérios. Com base no exposto, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar os efeitos da diluição pós-descongelamento do sêmen de jumentos. Para tanto, foram utilizados 25 ejaculados de 5 jumentos da raça Pêga, para congelados com o diluidor comercial BotuCrio®. Os tratamentos foram divididos em: BS – diluição do sêmen descongelado em Botusêmen® na proporção 1:1; PS – diluição do sêmen descongelado em plasma seminal na proporção de 10% v/v; BSPS – diluição do sêmen descongelado em diluidor comercial Botusêmen® 1:1 + plasma seminal 10% v/v; controle – sem diluição pós-descongelamento. O plasma seminal foi obtido por meio de centrifugação do ejaculado a 600g/15 minutos, no qual o sobrenadante foi centrifugado novamente e armazenado. Após o descongelamento foi realizada análise da cinética espermática por meio do *Computer Assisted Sperm Analyzer* (CASA) onde foram avaliados os parâmetros: MOT (motilidade total, %), PMOT (motilidade progressiva, %), VAP (velocidade de trajeto, µm/s), VSL (velocidade progressiva, µm/s), VCL (velocidade curvilínea, µm/s), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça, µm), BCF (frequência de batimentos flagelares, Hz), STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %). A integridade de membranas plasmática e acrossomal foi avaliada por citometria de fluxo utilizando as sondas iodeto de propídio e FITC-PSA. Os parâmetros MOT, PMOT, LIN e STR não diferiram entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Nos parâmetros VCL, VSL e VAP, não houve diferença entre o controle e os outros tratamentos ( $P > 0,05$ ), porém, PS teve valores menores do que BS nestes mesmos parâmetros ( $P < 0,05$ ). Em ALH e BCF, os grupos controle e PS mostraram valores menores em relação a BS e BSPS ( $P < 0,05$ ). Com relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, o grupo controle teve número menor de células com ambas as membranas lesionadas em relação aos outros grupos ( $P < 0,05$ ). Os resultados obtidos mostraram que a diluição não afetou diretamente a cinética espermática do sêmen, além de ter não apresentado efeito positivo sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, não sendo possível reverter possíveis danos causados durante o processo de congelamento com os tratamentos propostos.

**Palavras-chave:** criopreservação, sêmen, glicerol, diluição, jumento.

**Keywords:** cryopreservation, semen, glycerol, dilution, donkey.

## **Foliculogênese na égua: expressão gênica de gelatinase A e seu inibidor tecidual** *Folliculogenesis in mare: gene expression of gelatinase A and their tissue inhibitor*

**Luiz Augusto Machado Centeno\*, Henrique Boll de Araujo Bastos, Vanessa Jegan,  
Leonardo Glaeser Paul<sup>1</sup>, Verônica La Cruz Bueno, Nelson Alexandre Kretzmann Filho,  
Rodrigo Costa Mattos**

REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*E-mail: luizmachadocenteno@gmail.com

A gelatinase A também conhecida como metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) junto com seu inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP2), atuam durante o remodelamento tecidual. A MMP2 e a TIMP2 são descritos com funções importantes na lise da matriz extracelular durante a foliculogênese. O objetivo do presente estudo foi verificar a expressão gênica do MMP2 e TIMP2 em ovários de égua durante a foliculogênese. Foram coletados ovários de 12 éguas sem raça definida em abatedouro localizado na cidade de São Gabriel- RS (30°S, 54°O), Brasil. Somente ovários de éguas cíclicas foram selecionados. Baseados no diâmetro folicular e presença de corpo lúteo, os ovários foram divididos em dois grupos, constituídos por Grupo desenvolvimento (DEV) e Grupo dominância (DOM). Grupo DEV foi formado por 6 animais, com folículos <28mm de diâmetro (folículos em desenvolvimento) e o Grupo DOM foi formado por 6 animais, os quais possuíam folículos ≥28 mm de diâmetro (folículos dominantes), este grupo foi dividido em dois subgrupos: ovários com a presença do folículo dominante (DOM-D) (n=6) e ovários contralaterais (DOM-C) (n=6). Cada ovário foi seccionado longitudinalmente e dois fragmentos foram retirados de um hemi-ovário para realização da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR). Um dos fragmentos foi removido na região da fossa de ovulação e o outro foi removido na porção central do ovário (estroma). Nos hemi-ovários com folículos, o fragmento central foi removido junto com uma porção do maior folículo. Os fragmentos foram conservados em meio de estabilização e estocagem (RNAlater®, Life Technologies). Para o qPCR foram utilizados primers específicos para equi-MMP2 e TIMP2, a amplificação utilizada foi: 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60 e 58°C por 30 segundos respectivamente, e alongamento a 60°C por 30 segundos. A quantificação relativa foi realizada e os níveis de RNAm dos genes alvos foram normalizados contra os níveis de RNAm do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O método comparativo de “cycle threshold” (CT) ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi utilizado para calcular a expressão relativa de RNAm. No grupo DOM-D a fossa de ovulação apresentou menor expressão do que o estroma (P=0,032) para MMP2. Nenhuma diferença foi observada no grupo DEV para MMP2. A TIMP2 demonstrou maior expressão no estroma do que na fossa do grupo DEV (P=0,001). O estroma do grupo DEV apresentou uma tendência de maior expressão para TIMP2 do que o estroma do grupo DOMD (P=0,069). O estroma do grupo DOMC apresentou maior expressão do que a fossa do grupo DOMC (P=0,002) e que o estroma do DOMD (P=0,037) para TIMP2. Foi observada uma maior expressão de MMP2 no estroma do que na fossa no grupo DOMD e diferença de expressão da TIMP2 sendo menor no estroma do DOMD do que no estroma DEV e DOMC. Baseado na expressão destas enzimas demonstramos suas relações durante o desenvolvimento folicular. Sugerimos que a ação da MMP2 e seu inibidor TIMP2 possam ser fundamentais para a foliculogênese. A complexa interação entre essas enzimas, pode indicar um papel importante na degradação da matriz extracelular e na remodelação tecidual que é necessária para o crescimento folicular e formação da linha de menor resistência que conduz o folículo para fossa de ovulação.

**Palavras-chave:** MMP2, TIMP2, equino.

**Keywords:** MMP2, TIMP2, equine.

## Bioquímica sérica de potro neonato e do líquido amniótico proveniente de parto distócico – Relato de Caso

*Serum biochemistry of newborn foal and amniotic fluid from dystocic parturition - Case Report*

**Isadora Paz Oliveira dos Santos<sup>1,\*</sup>, Camila Gervini Wendt<sup>2</sup>, Fernanda Maria Pazinato<sup>2</sup>, Lorena Soares Feijó<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Wayne Nogueira<sup>3</sup>, Bruna da Rosa Curcio<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>2</sup>Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>3</sup>Professor Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

\*E-mail: isadorapazoliveirasantos@gmail.com

A avaliação de líquido amniótico no momento do parto pode indicar comprometimentos da unidade feto placentária, visto que seus componentes bioquímicos podem ter relação com a saúde fetal, podendo estar alterados em casos de sofrimento intrauterino. Alterações placentárias em éguas podem promover situações de hipóxia e redução do aporte de nutrientes afetando o processo de maturação fetal podendo resultar no nascimento de um potro dismaturo. O objetivo deste trabalho é relatar os parâmetros bioquímicos do líquido amniótico e séricos de um potro dismaturo proveniente de um parto distócico. Foi realizado o acompanhamento do parto de uma égua PSI, múltipara com oito anos de idade e 332 dias de gestação. Após a ruptura do cório-alantoide foi realizada a coleta do líquido amniótico através de punção da membrana amniótica. Na palpação transvaginal de rotina foi identificado que o potro encontrava-se em apresentação anterior, com cabeça e um membro anterior flexionado, caracterizando o parto distócico. Foram realizadas manobras de reposicionamento da estruturas e retirada do potro via vaginal em aproximadamente 50 minutos. Imediatamente após o nascimento foi realizada a coleta de sangue para avaliação da bioquímica sérica do neonato. O animal apresentava tônus muscular reduzido e sinais físicos de dismaturidade, alguns minutos após o nascimento apresentou agonia respiratória resultando em óbito. A placenta foi eliminada 20 min após a expulsão do feto, coletou-se uma amostra para posterior avaliação histopatológica não apresentando alterações características de placentite. A necropsia do potro revelou ruptura da veia cava. O líquido amniótico e soro sanguíneo foram encaminhados para avaliação bioquímica através de espectrofotometria. Os resultados da avaliação bioquímica do líquido amniótico foram: pH (7,47), uréia (24,4 mg/dL), creatinina (3,6 g/dL), GGT (5,5 UI/L), proteína total (139,07 g/dL), fosfatase alcalina (95 UI/L). Já os parâmetros bioquímicos séricos foram: uréia (75 mg/dL), creatinina (5,4 mg/dL), glicose (88 mg/dL), proteína total (5,6 g/dL), albumina (3,1 g/dL), AST (118 U/L), GGT (10 U/L), lactato (8,9 mmol/L), CK (440 U/L) e fosfatase alcalina - FA (1038 U/L). No líquido amniótico somente o valor de FA estava alterado, sendo maior que o observado em animais hígidos da mesma população (FA {Média±SE}=30,45±2,67; N=31). O aumento da FA está relacionado com a entrada de células de descamação da mucosa intestinal em fluídos fetais, resultante da isquemia tecidual, sendo descrito em casos de parto distócico. Na avaliação sérica neonatal foi identificada hipercreatinemia e hiperlactatemia, alterações sugestivas de hipóxia, disfunção placentária ou sepse. Pode-se concluir que a avaliação bioquímica sérica do potro e do líquido amniótico em conjunto podem ser utilizadas para auxiliar no diagnóstico de alterações perinatais em equinos.

**Palavras-chave:** líquido amniótico, fosfatase alcalina, bioquímica sérica, neonatologia.

**Keywords:** *amniotic fluid, alkaline phosphatase, serum biochemistry, neonatology.*

## Changes in the protein profile of the uterine fluid after the transfer of conceptus fragments

*Alterações no perfil proteico do líquido uterino após a transferência de fragmentos de conceptus*

**Cesar Augusto Camacho<sup>1,\*</sup>, Gabriel de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Jorge Emilio Caballeros<sup>1</sup>,  
Nicolas Cazales<sup>1,2</sup>, Camilo Jose Ramirez<sup>3</sup>, Pedro Marcus Pereira Vidigal<sup>3</sup>,  
Humberto Josué de Oliveira Ramos<sup>3</sup>, Edvaldo Barros<sup>3</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil; <sup>2</sup>Facultad de Veterinária, UDELAR, Montevideo, Uruguay; <sup>3</sup>Núcleo de Análise de Biomoléculas, UFV, Viçosa-MG, Brazil.

\*Email: cesarkmcho@gmail.com

The characterization of the uterine proteome in the embryo-maternal communication is essential to know the factors involved in the physiological events of the early pregnancy. Conceptus content has the clues of the pathways of signalization for the success in the pregnancy maintenance. The aim of this experiment was to compare the protein profile of the uterine fluid at day 7 after ovulation in mares in which fragments from day 13 concepti were transferred at day 5 after ovulation. Ten healthy and cyclic Quarter Horse mares, (ages ranging from 4 to 10 years) weighting  $510 \pm 53$  kg were used. Mares were kept in natural pastures with access to mineralized salt and water *ad libitum*. Once estrus was confirmed mares were examined daily to detect ovulation, considered day 0. After ovulation mares were examined daily by transrectal palpation and ultrasonography until day 7. In this first cycle intrauterine fluid was collected at day 7 after ovulation, which constituted the Cyclic group (n = 10). In the second cycle the same mares were examined daily until ovulation was detected. After ovulation mares were examined daily by transrectal palpation and ultrasonography until day 7. At day 5 after ovulation fragments from 13 days old concepti, previously collected and frozen were transferred into the uterus to each mare., Intrauterine fluid was collected at day 7 after ovulation, which constituted the Transferred group (n = 10). Uterine fluid was collected using commercial vaginal tampons. Tampons were placed in conical centrifuge tubes and immediately centrifuged at  $1500 \times g$  for 10 min and the supernatant stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . All samples were subjected to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). These gels were analyzed using software ImageMaster™ 2D Platinum (version 7.0; GE Life Sciences, USA). Relative volume of each spot (optical density  $\times$  area) was normalized to the total volume of spots detected on each gel to compare groups. A one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test was used to locate differences ( $P < 0.05$ ). The spots with differences were excised, trypsinized, lyophilized and submitted to matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry Ultraflex III model (Bruker Daltonics, Germany) for the identification of proteins. Proteins were identified by MASCOT and validated by the application SCAFFOLD, version 3.6.4. A total of 373 spots were visualized by 2D-PAGE. Five spots with greater abundance in Transferred than Cyclic group were selected for protein identification. The proteins identified were: Leukocyte elastase inhibitor (P05619), Fibrinogen beta chain (F6PH38), Fibrinogen gamma chain (F6W2Y1), Immunoglobulin gamma 7 heavy chain, partial (AAS18414) and Immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region, partial (CAC44624). The results determinate presence of acute phase proteins and immunoglobulins suggesting a high influence of the immunological system. It is clear that the mother is exposed to conceptus antigens during pregnancy, and the conceptus have mechanisms that protect the pregnancy from the maternal immune system. Increase of neutrophils has been documented in recipient mares 4 days after embryo transfer. Probably several proteins contribute to uterine immunosuppression and the maintenance of the delicate immunological balance. Conceptus fragments signalized changes in the protein profile of the uterine fluid associated to the subclinical inflammatory response, like the induced in embryo transfer.

**Key words:** Mare, proteomic, 2D-PAGE.

**Palavras-chave:** égua, proteômica, 2D-PAGE.



## **Eficácia do Lavado de Baixo Volume na coleta de amostras e diagnóstico da endometrite em éguas**

*Efficacy of low-volume uterine flush for sample collection and diagnostic endometritis in mares*

**Carlos Mattos Teixeira Soares<sup>1,\*</sup>, Iara Magalhães Ribeiro<sup>1</sup>, Mariana Machado Neves<sup>2</sup>, Maria Gazzinelli Neves<sup>3</sup>, Gilberto Guimarães Lourenço<sup>4</sup>, Maria Eduarda Borges Figueira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduando da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Docente do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG; <sup>3</sup>Docente do Departamento de Medicina Veterinária da FACISA/UNIVIÇOSA, Viçosa, MG, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário Autônomo.

\*E-mail: carlosmattos1991@gmail.com

A técnica de Lavado de Baixo Volume (LBV) é utilizada para coleta de amostras e como forma de diagnóstico da endometrite durante a avaliação ginecológica de éguas. A técnica possui como vantagem a maior amostragem uterina, uma vez que o fluido entra em contato com toda a superfície uterina, e rápida análise do efluente para o diagnóstico. LBV consiste na infusão intrauterina de um pequeno volume de solução estéril (60 a 150 mL) via transcervical e, após distribuído por todo o útero através de manipulação transretal, o fluido é então coletado por fluxo gravitacional ou sucção. Para amostragem o efluente é centrifugado e o sedimento resultante é submetido aos exames de citologia e cultura uterina, já para o diagnóstico, o aspecto, celularidade e presença de secreção são avaliados. Com objetivo de verificar a eficiência de LBV na coleta de amostras e no diagnóstico da endometrite, o presente estudo utilizou 40 éguas receptoras de embrião, mestiças, com idade entre cinco e 20 anos, retiradas do programa de TE por histórico de subfertilidade. 60 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% foram infundidas de forma transcervical a partir de uma sonda nasogástrica humana estéril (EMBRAMED®). Após manipulação transretal e um minuto de permanência da solução em contato com o útero, esta foi succionada com auxílio da seringa e recolhida para tubos plásticos estéreis de 50 mL para mensuração do volume recuperado e avaliação das características do efluente em aspecto, celularidade e presença de secreção. Os animais com aspecto turvo ou purulento, celularidade moderada ou alta e presença de secreção foram considerados positivos para este parâmetro examinado. Após, as amostras foram centrifugadas a 400 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado restando apenas 2 mL do mesmo junto ao sedimento, que foi então ressuspendido. Um *swab* e uma escova citológica foram mergulhados na solução resultante para a avaliação de cultura e citologia uterina respectivamente. O exame histológico endometrial foi considerado o padrão ouro para o diagnóstico da endometrite e o coletor comercial (PROVAR®) de amostras serviu de parâmetro de comparação para a amostragem. A avaliação do efluxo do LBV para o diagnóstico da endometrite apresentou sensibilidade de 0,26, resultado não satisfatório para o diagnóstico, porém pode ser utilizada como uma técnica auxiliar quando associada a outros métodos durante a avaliação ginecológica, uma vez que também pode ser usado para coleta de amostras. A sensibilidade nos exames de citologia e cultura uterina foram, respectivamente, de 0,76 e 0,80, as mesmas do coletor comercial, e foi recuperado em média 30 mL de efluente. A alta diluição da amostra e grande número de detritos dificultou a avaliação das lâminas citológicas, além disto, a realização de uma etapa extra que envolve a centrifugação e subsequente suspensão celular, tornou a técnica laboriosa em comparação ao coletor comercial, apesar dos resultados iguais, podendo ser um empecilho para sua aplicação a campo.

**Palavras-chave:** lavado uterino de baixo volume, exame ginecológico, endometrite.

**Keywords:** *low-volume uterine flush, gynecological examination, endometritis.*



## Equine follicular fluid proteome during different seasons of the year

*Proteoma do fluido folicular equino durante as diferentes estações do ano*

**Gabriel Almeida Dutra<sup>1,6,\*</sup>, Ghassan Mohamad Ali Ishak<sup>2,3</sup>, Olga Pechanova<sup>4</sup>, Tibor Pechan<sup>4</sup>, Daniel Peterson<sup>4</sup>, Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>1</sup>, Scoot Willard<sup>5</sup>, Peter Ryan<sup>5</sup>, Eduardo Leite Gastal<sup>2</sup>, Jean Magloire Feugang<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Department of Reproduction and Animal Evaluation, Federal Rural University of Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA; <sup>3</sup>Department of Surgery and Obstetrics, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq; <sup>4</sup>Institute for Genomics, Biocomputing and Bioinformatics, Mississippi State University, Starkville, MS, USA; <sup>5</sup>Department of Animal and Dairy Sciences, Mississippi State University, Starkville, MS, USA; <sup>6</sup>Professor of Veterinary Medicine, University Center of Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\*E-mail: Gabriel\_gad@msn.com

Proteomic studies of follicular fluid (FF) exist for several species, including the horse; however, the seasonal influence on FF proteome has not been explored in livestock. The application of high-throughput proteomics of FF in horse has the potential to identify seasonal variations of proteins involved in follicle and oocyte growth. This study (i) profiles the proteomes of equine FF collected from dominant growing follicles during the spring anovulatory season (SAN), and spring (SOV), summer (SU), and fall (FO) ovulatory seasons; and (ii) identifies season-dependent regulatory networks and associated key proteins. Seventeen Quarter horse mares from northern hemisphere (37° 42' 37.53" N, 89° 13' 9.50" W) were used. In all seasons, follicles  $\geq 6$  mm in diameter were ablated to induce a new follicular wave, allowing, therefore, proper tracking of growing/healthy follicles. During the SAN season, after follicle ablation, samples of FF (n = 6) were collected when the follicles reached 30-34 mm in diameter. During SOV, SU, and FO, mares were monitored daily with ultrasonography until ovulation; thereafter, follicle ablation was performed on day 10-12 after ovulation (day 0 = ovulation) and follicle tracking of the new induced wave was performed daily to collect FF when a dominant follicle reached 30-34 mm in diameter (SOV, n=6; SU, n=6; FO, n=12). In all seasons, the presence of uterine edema (estrus-like) and the absence of a corpus luteum detected through ultrasonography at the moment of FF collection did qualify the animal for the procedure. Regardless of season, a total of 90 proteins were identified in FF, corresponding to 63, 72, 69, and 78 proteins detected in the SAN, SOV, SU, and FO seasons, respectively. Fifty-two proteins were common to all seasons, a total of 13 were unique to either season, and 25 were shared between two seasons or more. Protein-to-protein interaction (PPI) analysis indicated the likely critical roles of plasminogen in the SAN season, the prothrombin/plasminogen combination in SU, and plasminogen/complement C3 in both SOV and FO seasons. The apolipoprotein A1 appeared crucial in all seasons. The present findings show that FF proteome of SU differs from other seasons, with FF having high fluidity (low viscosity). The balance between the FF contents in prothrombin, plasminogen, and coagulation factor XII proteins favoring FF fluidity may be crucial at the peak of the ovulatory season (SU) and may explain the reported lower incidence of hemorrhagic anovulatory follicles during the SU season.

**Keywords:** proteomics, seasonality, ovary, mares, horse.

**Palavras-chave:** proteômica, sazonalidade, ovário, éguas, cavalo.



## Características seminais pós-congelamento em garanhões da raça Crioula

*Post-thaw seminal characteristics of Criollo breed stallions*

**Leonardo Glaeser Paul<sup>1,\*</sup>, Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2</sup>, Henrique Boll de Araujo Bastos<sup>1</sup>,  
Gustavo Rupp Larentis<sup>1</sup>, Luiz Augusto Machado Centeno<sup>1</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1,2</sup>,  
Sandra Fiala Rechsteiner<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil; <sup>2</sup>HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil.

\*E-mail: leopaul16@hotmail.com

A raça Crioula, acompanhando o forte crescimento da equinocultura no Brasil, apresentou importante evolução nos últimos anos. Após quase 90 anos de história, conforme dados da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos, são mais de 400 mil exemplares registrados. A inseminação artificial (IA) é uma ferramenta para acelerar o ganho genético e competitividade na indústria equestre. O uso da IA com sêmen congelado, além de possibilitar a conservação e utilização do material genético de reprodutores por tempo indeterminado, favorece a sua difusão, oportunizando a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente superiores. Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do sêmen de garanhões da Raça Crioula após o processo de criopreservação. Foram utilizados ejaculados de 24 garanhões da raça Crioula, localizados próximo a Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. As análises microscópicas foram realizadas pré e pós-congelamento através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. A análise da integridade física da membrana foi realizada utilizando-se sondas fluorescentes (CFDA/PI). A funcionalidade da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST). Somente foram utilizadas amostras com motilidade total  $\geq 60\%$  e vigor  $\geq 3$ . As amostras foram centrifugadas a 600 xg por 10 minutos e osobrenadante foi removido. O *pellet* formado foi ressuspensionado em um diluente comercial próprio para congelamento a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida, previamente aquecido a 37°C até a concentração de 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. As amostras foram então envasadas em palhetas de 0,5 ml e refrigeradas a 5°C por 20 minutos em refrigerador comercial, expostas ao vapor de nitrogênio durante 20 minutos, sendo finalmente imersas no nitrogênio líquido. Valores médios e desvios padrão das variáveis do sêmen fresco: Concentração (250 x 10<sup>6</sup> milhões/ml  $\pm$  135,34); HOST (63,09  $\pm$  14,02); Fluorescência (63,04  $\pm$  10,45); Motilidade Total (MT)(75,93%  $\pm$  10,27); Motilidade Progressiva (MP) (53,71%  $\pm$  18,38); Motilidade Rápida (MR)(13,78%  $\pm$  10,38); Motilidade Lenta (ML)(32,43%  $\pm$  13,37); Motilidade Local (MC)(22,43%  $\pm$  10,17); Imóveis (IM)(23,24%  $\pm$  10,89); VCL (116,88  $\pm$  42,34); VSL(44,79  $\pm$  17,72); VAP (56,40  $\pm$  21,08). Valores médios e desvios padrão das variáveis pós-congelamento: HOST (42,73  $\pm$  7,06); Fluorescência (48,06  $\pm$  8,99); MT (52,85%  $\pm$  7,27); MP (31,15%  $\pm$  10,21); MR (4,78%  $\pm$  5,37); ML (24,89%  $\pm$  8,17); MC (22,44%  $\pm$  8,68); IM (45,04%  $\pm$  8,86); VCL (97,67  $\pm$  35,25); VSL (35,33  $\pm$  15,29); VAP (44,99  $\pm$  17,98). O sucesso da criopreservação depende de uma série complexa de interações, envolvendo fatores intrínsecos do garanhão, constituição da membrana do espermatozoide, natureza do diluente e temperatura final de armazenamento. O crescimento da criação de equinos da raça Crioula é evidente e se deve, em parte, ao desenvolvimento e utilização de biotecnologias de reprodução, como o uso de técnicas adequadas para a preservação e o armazenamento de sêmen. Podemos assim concluir que o protocolo utilizado para a criopreservação é viável para utilização no sêmen de cavalos da raça Crioula, seguindo a recomendação mínima dos parâmetros seminais pós-congelamento do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

**Palavras-chave:** criopreservação, sêmen, espermatozoides, fertilidade, equino.

**Keywords:** cryopreservation, semen, sperm cells, fertility, equine.



## **Intervalo da aplicação de prostaglandina a ovulação na taxa de recuperação embrionária em éguas Mangalarga Marchador**

*Interval of application of prostaglandin to ovulation on embryo recovery rate in Mangalarga Marchador mares*

**Paula Junqueira Ferraz<sup>1</sup>, Flavia Crespo Vieira de Leal Fonseca<sup>2</sup>, Yuri Barbosa Guerson<sup>2</sup>, Jhonnatha Paulo Oliveira<sup>1</sup>, Marcus André Ferreira Sá<sup>3</sup>, Vera Lucia Teixeira de Jesus<sup>2</sup>, Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Médico Veterinário autônomo; <sup>3</sup>Universidade Estácio de Sá (Campus Vargem Pequena), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*E-mail: juliorep@ufrj.br

O período inter-ovulatório (PIO) em éguas varia de 16 a 28 dias, mas com duração média de 21/22 dias. Esse período é composto por duas fases: o diestro (fase lútea) que tem uma duração relativamente constante (com uma média relatada de 14,9 dias e um intervalo de 12 a 16 dias), e o estro (fase folicular) compreendido entre a luteólise e a ovulação com duração média de sete dias. Esta grande variação parece ser devido à diferença no comprimento do estro, uma vez que o diestro é bastante constante. Isto está associado com uma menor concentração média diária de LH. A variação na duração do estro acompanhada pelo edema endometrial parece ser relevante para a fertilidade. Vários estudos mostraram uma correlação positiva entre o maior comprimento da fase folicular após luteólise induzida por PGF e a taxa de gestação em éguas, assim como uma maior taxa de recuperação embrionária. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do PIO sobre a taxa de recuperação embrionária em éguas da raça Mangalarga Marchador. Foi realizado um estudo retrospectivo de três estações de monta com análise dos dados de controle reprodutivo de éguas em um centro de reprodução equina no Estado do Rio de Janeiro. Os dados analisados estão compreendidos no período de 2014 a 2017 e os resultados foram avaliados através dos testes Qui-quadrado ( $X^2$ ). Foram utilizados 370 ciclos estrais, e divididos da seguinte forma em três grupos: G I (n=65) éguas que ovularam de 5 a 7 dias após a aplicação de PGF $\alpha$ ; GII (n=210) éguas que ovularam de 8 a 10 dias após a aplicação de PGF $2\alpha$ ; GIII (n=95) éguas que ovularam de 11 a 13 dias após a aplicação de PGF $2$ . Foi utilizado 2 ml intramuscular de Lutalyse® (Dinoprost trometamina, equivalente a 5mg/mL de dinoprost). As taxas de lavados positivos foram de 25/65 (38,46%), 112/210 (52,33%), 58/95 (61,05%) para GI, GII e GIII respectivamente. A taxa de recuperação embrionária para GI foi significativamente ( $p=0,01851$ ) menor que os grupos II e III. A hipótese de que uma duração mais longa do estro acompanhada de edema endometrial influenciaria positivamente na taxa de recuperação embrionária foi substantiada pelos resultados do presente estudo. Foi possível verificar que quando a fase folicular é mais curta, a taxa de recuperação embrionária decresce. Em conclusão, a duração do período de cio acompanhada de edema endometrial influenciou na probabilidade de recuperar embriões éguas após a luteólise induzida por PGF $2\alpha$ . Este achado tem relevância para os profissionais que trabalham em programas de TE, pois assim poderão melhorar a eficiência reprodutiva utilizando ciclos com fase folicular mais longas.

**Palavras-chave:** Corpo lúteo, prostaglandina, ovário, éguas, embrião.

**Keywords:** *Corpus luteum, prostaglandin, ovary, mares, embryo.*

## **Expressão do TNF- $\alpha$ no espermatozoide equino e sua relação com a qualidade seminal pós-congelamento**

*Expression of TNF- $\alpha$  in equine spermatozoa and their relationship to seminal post-thaw quality*

**Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2,\*</sup>, Henrique Boll de Araujo Bastos<sup>2</sup>, Luiz Augusto Machado Centeno<sup>2</sup>, Néelson Alexandre Kretzmann Filho<sup>2</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1,2</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil; <sup>2</sup>REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

\*E-mail: veronicalacruzbueno@hotmail.com

O fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) é uma das citocinas envolvidas na espermatogênese mais documentadas. Moléculas sinalizadoras como as citocinas regulam a espermatogênese durante a maturação de células germinativas e apoptose de espermatozoides. Entre as citocinas, o TNF $\alpha$  é a mais potente na apoptose de células germinativas, na secreção de células peritubulares e na regulação da espermatogênese. Seus receptores estão presentes nas células de Sertoli e Leydig, permitindo que o TNF $\alpha$  regule a secreção dessas células. O objetivo desse estudo foi avaliar se há relação entre a expressão gênica de TNF $\alpha$  no espermatozoide com os parâmetros da célula espermática pós-descongelamento de garanhões. Foram utilizados ejaculados de 40 garanhões da raça Crioula, localizados próximo a Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. Uma fração do ejaculado foi separada para análise da expressão gênica utilizando a técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). O restante do sêmen foi criopreservado em palhetas de 0,5 ml na concentração de 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL com diluente comercial próprio para congelamento. As análises microscópicas foram realizadas através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. A análise da integridade física da membrana foi realizada utilizando-se sondas fluorescentes. A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico, para avaliação das alterações morfológicas, foi realizado esfregaço e corado com kit panótico. A extração do RNAm foi realizada através do Kit Comercial TRIzol™. A conversão para cDNA foi realizada através de kit comercial SuperScript III Reverse Transcriptase®. A amplificação foi executada utilizando o termociclador real-time PCR *Applied Biosystems*®, sendo os dados processados pelo software integrado v2.3. Os resultados quantitativos da qPCR foram determinados usando uma curva padrão absoluta (fórmula=10<sup>^((ct alvo - CT padrão)/slope)</sup>). Para análise estatística foi utilizado correlação de Pearson através do programa Statistix 8.0. Foi encontrada correlação positiva do gene TNF- $\alpha$  com velocidade curvilínea (VCL) (r=0,5147/p<0,02), velocidade linear progressiva (VSL) (r=0,4714/p<0,03) e velocidade média da trajetória (VAP) (r=0,4907/p<0,02). A expressão gênica do TNF- $\alpha$  demonstrou correlação moderada com as velocidades (VCL, VSL e VAP). A criopreservação provoca danos irreversíveis na membrana espermática. O TNF- $\alpha$  exerce uma série de ações biológicas em diferentes células e regula o metabolismo energético, especialmente na homeostase lipídica. A membrana plasmática é constituída por bicamada lipídica, contendo fosfolípidos, glicolípidos e colesterol, e é a parte da estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação. Sua integridade é fundamental para que a célula espermática esteja viável no momento da fecundação evitando o choque térmico e mantendo a fluidez da membrana plasmática. Neste estudo observamos que a maior expressão do TNF- $\alpha$  ocorreu nos espermatozoides com maior velocidade após o descongelamento, sugerindo que o TNF- $\alpha$  pode estar envolvido no metabolismo dos fosfolípidos da membrana. Concluímos que a expressão do gene TNF- $\alpha$  no espermatozoide equino pode ser utilizada como um marcador para velocidade espermática pós criopreservação.

**Palavras-chave:** biomarcador, espermatozoide, equino, velocidade.

**Keywords:** biomarker, spermatozoon, equine, velocity.

## **Avaliação luteal por ultrassonografia Doppler e da concentração plasmática de progesterona em éguas previamente submetidas a diferentes tratamentos hormonais para sincronização do estro e da ovulação**

*Luteal evaluation by Doppler ultrasonography and progesterone plasma levels in mares submitted to different hormonal treatments for estrus and ovulation synchronization*

**Ana Paula Reway<sup>1</sup>, Luciano Andrade Silva<sup>2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Doutoranda, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – USP, São Paulo, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA – USP, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: luciano.vetmed@usp.br

O desenvolvimento de protocolos hormonais capazes de sincronizar o estro e a ovulação com precisão em éguas tem sido um desafio. Ademais, a funcionalidade do corpo lúteo formado após a ovulação em éguas previamente tratadas com estes protocolos hormonais é desconhecida. A funcionalidade luteal é determinada por sua capacidade de produção de P4, sendo que a dosagem deste hormônio não é uma prática rotineira no campo. O exame ultrassonográfico em modo Doppler possibilita a avaliação da vascularização luteal e indiretamente poderia estimar sua capacidade de produzir progesterona. Este estudo objetivou avaliar, por ultrassonografia e dosagem das concentrações plasmáticas de P4, o efeito de seis diferentes tratamentos hormonais sobre as características luteais no dia 8 após ovulação. Vinte éguas cíclicas foram aleatoriamente distribuídas em seis tratamentos hormonais (grupos: G1 ao G6). Todas as éguas passaram pelos seis tratamentos. D0 = dia do início do tratamento hormonal. Os protocolos hormonais utilizados foram: G1, no D0 foi inserido o dispositivo intravaginal contendo 0,9 g de P4 e administrado 0,25 mg de prostaglandina F2 $\alpha$  IM; no D8 foi retirado o dispositivo e nova dose de 0,25 mg ml de prostaglandina F2 $\alpha$  IM foi aplicada. G2, idem ao G1 com administração de 20 mg de 17 $\beta$  estradiol IM no D0. G3, no D0 foi realizada a administração de 1500 mg de progesterona IM, 0,25 mg de prostaglandina F2 $\alpha$ ; no D8 nova dose de 0,25 mg de prostaglandina F2 $\alpha$  IM foi aplicada. G4, idem G3 com administração de 20 mg de 17 $\beta$  estradiol IM no D0. G5, no D0 foi iniciada a administração oral diária de 0,045 mg/kg peso vivo de altrenogest e 0,25 mg de prostaglandina F2 $\alpha$  IM; no D8, a administração oral de altrenogest foi interrompida e nova dose de 0,25 mg de prostaglandina F2 $\alpha$  IM foi aplicada. G6, idem G5 com administração de 20 mg de 17 $\beta$  estradiol IM no D0. As colheitas de sangue para análise plasmática de P4 e os exames ultrassonográficos foram realizados oito dias após a ovulação. Para a análise das concentrações plasmáticas de progesterona, dez éguas foram aleatoriamente selecionadas entre as vinte éguas utilizadas. A área de vascularização luteal foi estimada pela visualização dos sinais coloridos em vídeos dos exames ultrassonográficos gravados em modo Doppler colorido. As médias do diâmetro, área e perímetro luteal, da área luteal com vascularização e das concentrações plasmáticas de progesterona foram comparadas entre os tratamentos por ANOVA e teste post-hoc de Tukey. Os diâmetros, áreas e perímetros luteais médios não diferiram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ; diâmetro: G1 27,7  $\pm$  1,38; G2 26,4  $\pm$  1,28; G3 26  $\pm$  1,26; G4 26,4  $\pm$  1,16; G5 27,6  $\pm$  0,86; G6 26,4  $\pm$  1,42; área: G1 6,19  $\pm$  0,62; G2 5,66  $\pm$  0,53; G3 5,47  $\pm$  0,46; G4 5,63  $\pm$  0,45; G5 6  $\pm$  0,38; G6 5,9  $\pm$  0,65; perímetro: G1 92,5  $\pm$  4,5; G2 90  $\pm$  4,29; G3 90,3  $\pm$  3,96; G4 90,8  $\pm$  3,69; G5 93,1  $\pm$  2,92; G6 90,37  $\pm$  5,08. As médias das áreas de vascularização luteal também não foram diferentes entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ; G1 53,5  $\pm$  4,1; G2 56,5  $\pm$  3,84; G3 61,2  $\pm$  3,67; G4 56  $\pm$  3,98; G5 54  $\pm$  3,69; G6 55  $\pm$  3,16). No entanto, as concentrações plasmáticas médias de P4 foram diferentes ( $P < 0,0376$ ; G1 14,99  $\pm$  1,82<sup>c</sup>; G2 16,77  $\pm$  1,68<sup>bc</sup>; G3 14,90  $\pm$  1,16<sup>c</sup>; G4 22,66  $\pm$  2,37<sup>c</sup>; G5 20,44  $\pm$  1,76<sup>ab</sup>; G6 19,37  $\pm$  2,62<sup>abc</sup>). Conclui-se que, apesar das características morfológicas e de vascularização dos corpos lúteos formados após diferentes tratamentos hormonais não diferirem, a produção média de P4 foi dependente do tratamento hormonal realizado.

**Palavras-chave:** ultrassonografia Doppler, corpo lúteo, progesterona, tratamento hormonal.

**Keywords:** *Doppler ultrasonography, corpus luteum, progesterone, hormonal treatment.*



## **Identificação Fúngica e Formação de Biofilme Provenientes de Amostras Endometriais de éguas**

*Fungal identification and biofilm formation from endometrial samples in mares*

**José Adelson Alves do Nascimento Júnior<sup>1</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1</sup>,  
Gustavo Ferrer Carneiro<sup>2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE Brasil; <sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, DMV, Recife, PE, Brasil.

\*E-mail: carneirogustavo1@gmail.com

A eficiência de um programa de biotecnologia da reprodução na fêmea equina está intimamente relacionada à capacidade do útero de manter um ambiente compatível com o desenvolvimento embrionário e o crescimento fetal, evitando assim que se torne suscetível ao desenvolvimento de processos inflamatórios posteriores à invasão uterina. 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. Este estudo teve como objetivo diagnosticar endometrite em éguas através de citologia e cultura microbiológica e fúngica e identificação da formação de biofilme em éguas com histórico de infertilidade recente, examinadas em nosso laboratório. Setenta éguas foram examinadas por palpação retal e ultrassonografia após pelo menos 3 inseminações artificiais sem prenhez diagnosticada ou 3 coletas negativas de transferência de embriões. Amostras foram coletadas para citologia uterina e exame microbiológico. Para a coleta do material, foi utilizado swab coletor estéril acoplado a escova ginecológica (PROVAR®). As amostras foram então fixadas em metanol por 10 minutos em lâminas com os swabs sendo acondicionados em tubos contendo meio de transporte (PBS), imediatamente lacrados, identificados e encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal (LABRAPE - UFRPE / UAG) para posterior processamento. As amostras para bactérias foram semeadas em bi-placa Ágar-sangue/Mcconkey. As amostras para fungos foram cultivadas em agar Sabouraud com cloranfenicol a 10% (Difco laboratories, Detroit, MI) e incubadas a 37° C sendo acompanhados visualmente a cada 24 horas durante 7 dias. A determinação da formação de biofilme foi feita através da técnica de cristal violeta descrita por Stepanovic et al, 2000. *J Microbiol Methods*, 40(2):175-179. Das 70 éguas diagnosticadas com endometrite 43 (61,4%) apresentaram infecção bacteriana e/ou fúngica. Dessas, 30,2% (13/43) apresentaram infecção fúngica, dentre os fungos mais evidenciados estão *Aspergillus* spp e *Candida albicans*, que são descritos como agentes altamente virulentos e formadores de biofilme, seguido de *Curvalaria* spp, *Cladosporium* spp e *Zygomices* spp. Dos fungos identificados, 9/13 (69,2%) formaram biofilme. Esses números de infecção fúngica de acordo com a literatura são considerados acima da média. Esse crescimento na incidência de endometrite fúngica nos últimos anos pode ser em decorrência do aumento substancial das biotecnologias reprodutivas, especialmente a transferência de embriões que exige uma manipulação mais exacerbada do trato reprodutivo das doadoras, expondo o endométrio a contínuos lavados muitas vezes sem os devidos cuidados higiênicos que podem contribuir para o aumento dessas infecções fúngicas. A identificação do agente são da maior importância, para uma abordagem mais eficaz no tratamento. A alta incidência de infecções fúngicas apresentadas neste trabalho, associadas com a capacidade na produção de biofilme, comprovam a dificuldade que demanda os tratamentos, assim como os baixos índices de sucesso na terapia. A correlação desses testes pode fornecer subsídios ainda mais importantes no diagnóstico que favoreçam a melhora da eficiência reprodutiva dos rebanhos equinos.

**Palavras-chave:** equino, biofilme, endometrite, fungo.

**Keywords:** equine, biofilm, endometritis, fungus.

## Avaliação do efeito do hCG em éguas após uso em várias estações de monta

*Evaluation of hCG efficacy in mares after use by several breeding season*

**Jhonnatha Paulo Oliveira<sup>1,\*</sup>, Paula Junqueira Ferraz<sup>1</sup>, Marcus André Ferreira de Sá<sup>3</sup>,  
Flavia Crespo Vieira de Leal Fonseca<sup>2</sup>, Vera Lucia Teixeira de Jesus<sup>2</sup>, Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Médico Veterinário autônomo; <sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estácio de Sá (UNESA, Campus Barra III) - Bolsista do Programa Pesquisa Produtividade da UNESA.

\*E-mail: jhonnatha@ig.com.br

Na indústria equina, em geral, existe interesse em promover o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor genético. O controle hormonal do momento da ovulação pode ser usado como uma ferramenta para otimizar parâmetros reprodutivos e reduzir custos do programa de transferência de embriões (TE). Para maximizar a eficiência da indução da ovulação através da hormonioterapia, é imprescindível conhecimento rigoroso da fisiologia e dinâmica folicular durante o ciclo estral de éguas. Sabe-se que a duração média do ciclo estral da égua é de 21 a 22 dias, podendo apresentar variação no intervalo entre o início do estro até a ovulação assim como no diâmetro dos folículos pré ovulatórios. A finalidade da indução da ovulação está diretamente relacionada ao melhor aproveitamento de biotécnicas como: inseminação artificial (IA), TE e aspiração folicular para transferência de oócito, que requerem precisão para obtenção de índices reprodutivos elevados. Éguas inseminadas com sêmen resfriado ou descongelado, sincronização da ovulação entre doadoras e receptoras de embrião são exemplos de uso frequente de agentes indutores de ovulação. Apesar de já ter sido demonstrado que o uso constante de hCG pode levar a formação de anticorpos e subsequente redução na eficiência do fármaco, vários autores afirmam não haver alteração nas taxas de respostas quando o hCG é administrado em mais de três ciclos estrais na mesma estação de monta. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do hCG em induzir ovulação por diversas vezes em uma mesma estação de monta e durante vários anos. O trabalho foi realizado em um haras de Mangalarga Marchador, no município de Seropédica –RJ durante quatro estações de monta consecutivas. Foram utilizados 138 ciclos estrais de nove éguas doadoras de embrião, sendo que cada égua foi submetida a administração endovenosa de 1000 UI de hCG pelo menos quatro vezes durante uma mesma estação de monta, quando o maior folículo atingia diâmetro  $\geq 35$  mm e edema uterino  $\geq 3$  (escala de 1 a 4). Os grupos deste trabalho foram distribuídos da seguinte forma: G1 (n=138 ciclos) - nove éguas pelo menos duas estações consecutivas; G2 (n=98 ciclos) - cinco éguas pelo menos três estações consecutivas; G3 (n=42 ciclos) - duas éguas pelo menos quatro estações consecutivas. Todas as éguas foram submetidas de quatro a oito aplicações endovenosas de 1000 UI de hCG por estação de monta. Em 100% dos ciclos estrais a ovulação ocorreu em até 72 horas, da seguinte forma: G1 - 79,7% (110/138) a ovulação ocorreu em até 48 horas após a administração do hCG e 20,3% (28/138) ovularam em até 72 horas; para o G2 - 80,6% (79/98) a ovulação ocorreu em até 48 horas após a administração do hCG e 19,4% (19/98) ovularam em até 72 horas; G3 - 83,3% (35/42) ovularam em até 48 horas e 16,7% (7/42) ovularam em até 72 horas. O número de ovulações em 48 horas foi ( $p < 0,05$ ) maior que em até 72 horas, demonstrando eficiência mesmo quando utilizada em 4 ciclos estrais consecutivos durante duas a quatro estações de monta.

**Palavras-chave:** indução da ovulação, resposta ovulatória, anticorpos Anti-hCG.

**Keywords:** induction of ovulation, ovulatory response, Anti hCG antibodies.

## Relação do escore de condição corporal e da idade sobre a ocorrência de endometrite em éguas receptoras de embrião

*Relationship of body condition score and of age in the occurrence of endometritis in embryo recipient mares*

**Carlos Mattos Teixeira Soares<sup>1,\*</sup>, Maria Gazzinelli Neves<sup>2</sup>, Flávia Vieira Freitas<sup>3</sup>, Mariana Abreu Redoan<sup>3</sup>, Kamilla Dias Paes Silva<sup>4</sup> Iara Magalhães Ribeiro<sup>1</sup>, Thiago Vieira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduando da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Docente do Departamento de Medicina Veterinária da FACISA/UNIVIÇOSA, Viçosa, MG, Brasil; <sup>3</sup>Pós-graduando da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; <sup>4</sup>Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: carlosmattos1991@gmail.com

Os programas de transferências de embrião (TE) em equinos têm buscado cada vez mais antecipar a entrada de receptoras e prolongar sua permanência no mesmo, afim de maximizar seu aproveitamento devido à sua dificuldade de aquisição no mercado. Contudo, tanto a imaturidade uterina de éguas muito jovens, quanto as alterações anatômicas, metabólicas e endócrinas de éguas idosas, podem interferir na fertilidade e no sucesso da técnica. Da mesma forma, observa-se que o escore de condição corporal (ECC) também afeta a saúde e a vida reprodutiva desses animais. Assim, sabendo que esses dois fatores podem predispor a ocorrência de endometrite, enfermidade responsável pela exclusão frequente de éguas dos programas de TE, o presente estudo objetivou avaliar a influência da idade e do ECC sobre a ocorrência dessa enfermidade em éguas receptoras de embrião. Para tanto, utilizou-se 40 éguas receptoras de embrião, mestiças, com idade entre cinco e 20 anos, retiradas do programa de TE por histórico de subfertilidade, submetidas a regime extensivo, em pastagens de boa qualidade, com água e sal mineral *ad libitum*. As éguas foram divididas conforme a idade registrada ou estimada por cronometria dentária em três grupos: (G1) menores que 10 anos, (G2) de 10 a 14 anos e (G3) de 15 a 20 anos. O ECC foi avaliado em escala de 1 a 9, conforme a visualização e palpação de áreas do corpo, sendo o escore 5 o ideal preconizado pelo NRC (2007). Já o diagnóstico para endometrite foi estabelecido pelo exame histopatológico endometrial. Os dados foram avaliados pela *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). A idade média foi 13,2 anos, sendo sete éguas pertencentes ao G1, 15 ao G2 e 18 ao G3. Apenas três éguas do G1 foram positivas para endometrite, representando a menor proporção entre as faixas etárias estudadas. Isso pode ser explicado devido ao grupo estar em sua melhor fase de desempenho reprodutivo em que a idade não é determinante para o surgimento de problemas reprodutivos. O que difere dos animais do G2 e G3, em que a idade obteve correlação positiva com o Índice de Caslick (IC), evidenciando maior risco de infecções ascendentes e inflamações persistentes do endométrio conforme o avanço da idade. O ECC médio foi de 5,82, variando de 4 a 7, sendo que 29 éguas estavam com ECC acima do ideal, 6 apresentavam ECC ideal e 5 éguas possuíam escore 4. Todas as éguas com ECC 4 foram positivas para endometrite e observou-se que elas possuíam menor deposição de gordura perineal, o que favorece a má conformação perineal, predispondo a ocorrência da endometrite. Além disso, a idade apresentou correlação negativa com o ECC. Verificou-se ainda que o G3 possuía maior grau de alterações histopatológicas concomitante com baixo ECC e IC elevado, confirmando diagnóstico positivo para endometrite. Esse resultado corrobora com outros estudos e destaca a importância de evitar o uso de éguas idosas como receptoras. Sendo assim, conclui-se que idade e ECC são fatores influentes sobre a ocorrência de endometrite em éguas e ambas variáveis estão correlacionadas negativamente, o que ressalta a importância de se evitar o uso de éguas idosas e/ou de baixo escore como medida de prevenção ao surgimento de éguas problemas nos programas de TE.

**Palavras-chave:** égua problema, ginecologia equina, nutrição, transferência de embrião.

**Keywords:** mare problem, equine gynecology, nutrition, embryo transfer.

## A comprehensive proteomic analysis of the equine blastocyst

### *Análise do proteoma do embrião equino*

Antônio Carlos Teles Filho<sup>1</sup>, Deisy J.D. Sanchez<sup>1</sup>, José C. Araújo Neto<sup>2</sup>, Maria Eduarda M. Souza<sup>2</sup>, Jander F.M. Costa<sup>1</sup>, Arabela G.A. Viana<sup>1</sup>, Aline M. Martins<sup>3</sup>, Marcelo V. Sousa<sup>3</sup>, Wagner Fontes<sup>3</sup>, Carlos A.O. Ricart<sup>3</sup>, Arlindo A. Moura<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil; <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Ceara State University, Fortaleza, Ceará, Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, University of Brasília, Brasília, Brazil.

\*E-mail: arlindo.moura@gmail.com

Studies about the protein profile of gametes and embryos allow the identification of markers of developmental competence and viability, also making significant contributions to artificial reproductive technologies (ARTs). The present investigation was carried out to decipher the major proteome of *in vivo*-produced equine embryos (expanded blastocysts). The estrous cycle of eight mares was monitored and ovulations were induced using an intramuscular injection of 0.075mg desloreline acetate after the detection of a single preovulatory follicle (35-38mm). Then, 24h after the induction of ovulation, mares were artificially inseminated with fresh semen diluted in extender ( $10^9$  motile spermatozoa/insemination). All mares were inseminated and submitted to uterine flushing, each one of them with a single ovulation (ovulation rate-100%). Four (GI-3; GII-1) expanded blastocysts were recovered (50%). For protein extraction, the embryos were pooled and sonicated in a water bath for 30 min., frozen in liquid N and macerated. The samples were precipitated with acetone and 0.1M NaCl (1:4) and lysed (15µl lysis buffer containing urea 8M, 0,02M TEAB and 0,5M DTT). Further, proteins were subjected to alkylation and reduction (IAA and DTT). All samples were digested with trypsin, and peptides were added to Zip-Tip C18 columns for desalting. A DDA label-free mass spectrometric analysis of peptides was performed using an Orbitrap Elite instrument (Thermo Fisher<sup>®</sup>, CA, USA). Protein identification was performed using Peaks software, which deduces sequences from the fragmentation of information and searches in UniProt database. A total of 1017 proteins were identified in the equine blastocysts. According to gene ontology (GO) analysis, embryo proteins were mainly defined as extracellular, (22%), and from other intracellular organelles (16%), cytoplasm (12.9%) and mitochondria (8.1%). As regard to biological processes, proteins identified in the equine embryo were characterized as cellular process (29.9%), regulation (24%), among others. In relation to molecular function category, major embryo proteins were assigned to cluster binding (48%), catalytic activity (30%) and structural molecule activity (9.7%). In the embryo, the cell-extracellular matrix interactions regulate important functions such as migration, adhesion, cell proliferation, differentiation, and morphogenesis. Also, proteins act regulating the activity of growth factors. Horse blastocysts have some unique morphological characteristics when compared to embryos of other mammals. In summary, a chromatographic system coupled to tandem mass spectrometry allowed the description, for the first time, of the major proteome expressed by the equine embryo. The present study will establish a relevant foundation for the comprehension of embryo development in the mare and define potential markers of embryo viability.

**Keywords:** embryo, equine, protein, mass spectrometry.

**Palavras-chave:** embrião, proteína, espectrometria de massa.

## **Implante intravaginal de progesterona (1,9g) no controle folicular de éguas**

*Intravaginal progesterone device (1.9 g) for follicular control in the mare*

**Ana Carolina Bahia Teixeira<sup>1</sup>, Adolfo Perez Fonseca<sup>1</sup>, Juliana Horta Wutke Diniz<sup>1</sup>, Debora Freitas Silva<sup>1</sup>, José Andrés Nivia Riveros<sup>2</sup>, Dara Miranda Castro<sup>3</sup>, Juliana Bastos Giudice<sup>4</sup>, Guilherme Ribeiro Valle<sup>5</sup>, Fabrício Alves Resende<sup>5</sup>, Gabriel Augusto Monteiro<sup>6</sup>, Alan Maia Borges<sup>6</sup>, Letícia Zoccolaro Oliveira<sup>6,\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduando (a) em Ciência Animal, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>2</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colômbia; <sup>3</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; <sup>5</sup>PUC Minas, Betim, MG, Brasil; <sup>6</sup>Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*E-mail: leticiazo@vet.ufmg.br

O uso de medicamentos para manipular a reprodução na equidocultura tem se tornado uma ferramenta importante no manejo de animais de produção, sendo relevante em lugares onde a intensidade de luz varia durante o ano e interage na fisiologia reprodutiva. Neste sentido, o uso da progesterona (P4) por várias vias de administração é útil para a sincronização do estro, porém, poucos são os relatos da literatura referentes a eficácia e efeitos da utilização intravaginal de P4 em equinos. Assim, o trabalho objetiva avaliar taxa de crescimento folicular e taxa ovulatória em éguas protocoladas com implante intravaginal de P4 e comparar os resultados da estação de transição com a estação reprodutiva. Foram avaliadas 8 éguas em duas fases reprodutivas diferentes (Transição: Setembro 2018 e Estação: Janeiro 2019). As éguas apresentavam entre 5 e 15 anos de idade e escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 3,5 (1 a 5). O experimento foi realizado na fazenda experimental da escola de Veterinária da PUC Minas, Esmeraldas, MG (Protocolos CEUA UFMG 57/2018 e CEUA PUC Minas 017/2018). O protocolo hormonal utilizado em ambos períodos consistiu na aplicação de de Benzoato de estradiol (4mg; 4 mL, IM; Gonadiol®, Zoetis), Dinoprost (5mg, 1mL, IM; Lutalyse®, Zoetis) e inserção do implante de P4 intravaginal (1,9 mg; CIDR®, Zoetis) no Dia 0 (D0). O implante de P4 permaneceu até o D10, quando foi administrado 5 mg de Dinoprost IM (Lutalyse®, Zoetis). Durante este período, foi realizado acompanhamento ultrassonográfico para mapeamento ovariano diário. Após a retirada do implante, as éguas foram acompanhadas de 12 em 12 horas, até que fosse visualizado no exame de ultrassonografia ovariana um folículo pré ovulatório de 35 mm quando foi aplicado Gonadotrofina coriônica humana (hCG; 1.750 UI, 0,7mL, IV; Vetecor®, Ceva). As variáveis (médias  $\pm$  desvio padrão) dos dois períodos reprodutivos foram comparadas pelo teste de exato de Fisher, usando o software Graphpad InStat 3.06, sendo considerados significativamente diferentes quando  $P < 0,05$ . Nos dois períodos reprodutivos avaliados não foi observada ovulação durante o período em que o implante de progesterona se encontrava inserido no animal. Após a remoção do implante, todos os animais (100%; n=8) ovularam na estação reprodutiva enquanto 62,5% dos animais (n=5) ovularam na estação de transição ( $P=0,0547$ ). A média geral de ovulação dos animais foi 81,25% (13/16). Embora tenha sido observada secreção vaginal purulenta em 2 éguas na estação de transição e 1 égua na estação reprodutiva, todas apresentaram resolução espontânea em até 48 horas. Houve diferença significativa ( $<0,001$ ) na taxa de crescimento folicular durante o período de ação da progesterona (D0 a D10;  $1,15 \pm 0,84$  mm), em comparação ao período em que os animais já não mais possuíam o implante (D11 até ovulação;  $3,44 \pm 1,25$  mm). Essa diferença foi observada tanto na estação de transição ( $1,00 \pm 0,81$  vs  $3,31 \pm 1,66$  mm;  $p=0,0054$ ) quanto na estação reprodutiva ( $1,33 \pm 0,89$  vs  $3,63 \pm 1,33$ ;  $P < 0,001$ ). Não houve diferença na taxa de crescimento folicular entre as estações (transição ou estação reprodutiva, respectivamente), tanto durante ( $1,00 \pm 0,81$  vs  $1,33 \pm 0,89$ ;  $p=0,6107$ ) quanto após a remoção do implante de P4 ( $3,31 \pm 1,66$  vs  $3,63 \pm 1,33$ ;  $p=0,5900$ ), porém, em ambas as estações, somente após a remoção do implante as ovulações foram detectadas. Concluiu-se que o implante de progesterona utilizado permitiu satisfatório controle de crescimento folicular, tanto durante estação reprodutiva quanto durante a estação de transição primaveril.

**Palavras-chave:** implante de progesterona, taxa de ovulação, sazonalidade, éguas.

**Keywords:** progesterone implant, ovulation rate, seasonality, mares.

## **Parâmetros reprodutivos durante transição primaveril e estação reprodutiva de éguas sincronizadas com implante intravaginal de Progesterona (1,9g)**

*Reproductive parameters during spring transition and reproductive season of mares synchronized with Progesterone intravaginal implant (1,9g)*

**Ana Carolina Bahia Teixeira<sup>1</sup>, Adolfo Perez Fonseca<sup>1</sup>, Juliana Horta Wutke Diniz<sup>1</sup>,  
Debora Freitas Silva<sup>1</sup>, José Andrés Nivia Riveros<sup>2</sup>, Bruno Miranda de Paula<sup>3</sup>,  
Juliana Bastos Giudice<sup>4</sup>, Guilherme Ribeiro Valle<sup>5</sup>, Gabriel Augusto Monteiro<sup>6</sup>, Alan Maia Borges<sup>6</sup>,  
Letícia Zoccolaro Oliveira<sup>6,\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduando (a) em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil;

<sup>2</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colômbia; <sup>3</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil; <sup>5</sup>PUC Minas, Betim, MG, Brasil; <sup>6</sup>Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*E-mail: leticiazo@vet.ufmg.br

A utilização de protocolos de sincronização da ovulação associando agentes indutores de ovulação é uma importante estratégia na aplicação das biotecnologias reprodutivas. O uso destes protocolos pode ser realizado para aumentar a eficiência reprodutiva de equinos. O objetivo deste trabalho foi comparar a dinâmica folicular de éguas sincronizadas com implante intravaginal de Progesterona (P4) durante a estação de transição e na estação reprodutiva. Foram avaliadas 8 éguas em duas fases reprodutivas diferentes, sendo a estação de Transição (ET) em setembro de 2018 e o período de estação reprodutiva (ER) em Janeiro 2019. As éguas apresentavam entre 5 e 15 anos de idade e escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 3,5 (1 a 5). O experimento foi realizado na fazenda experimental da escola de Veterinária da PUC Minas, Esmeraldas, MG (Protocolos CEUA UFMG 57/2018 e CEUA PUC Minas 017/2018). No Dia 0 (D0) foi realizado o protocolo em ambos períodos que consistiu na aplicação de Benzoato de estradiol (4 mg; 4 mL, IM; Gonadiol®, Zoetis), Dinoprost (5mg, 1mL, IM; Lutalyse®, Zoetis) e inserção do implante de P4 intravaginal (1,9 mg; CIDR®, Zoetis). O implante de P4 permaneceu por 10 dias e nesse período foi realizado o acompanhamento ultrassonográfico ovariano a cada 24 horas. No décimo dia o implante foi retirado quando foi aplicada 5 mg (1mL) de Dinoprost. Após a retirada do implante, as éguas foram acompanhadas de 12 em 12 horas, até que fosse visualizado no exame de ultrassonografia ovariana um folículo pré ovulatório de 35 mm quando foi aplicado Gonadotrofina coriônica humana (hCG; 1.750 UI, 0,7mL, IV; Vetecor®, Ceva). Os parâmetros (médias  $\pm$  desvio padrão) dos dois períodos reprodutivos foram comparados pelo teste de exato de Fisher, usando o software Graphpad InStat 3.06, sendo considerados significativamente diferentes quando  $P < 0,05$ . No primeiro dia do experimento da etapa do período de transição, nenhuma das éguas apresentaram corpo lúteo (CL). No primeiro dia da etapa da estação reprodutiva, todas as éguas estavam ciclando (presença de CL foi detectada por ultrassonografia). Na comparação das duas fases reprodutivas, não houve diferença entre o tamanho do folículo dominante no momento da retirada do implante (ET: 23,51 $\pm$ 5,90 mm, n=8 e ER: 26,71 $\pm$ 8,10 mm, n=8;  $P=0,4203$ ). Considerando apenas os animais que ovularam (ET=5 e ER=8), também não houve diferença no maior diâmetro atingido pelo folículo ovulatório (ET: 37,22 $\pm$ 0,55 mm, n=5 e ER: 38,37 $\pm$ 3,06 mm, n=8;  $P = 0,3674$ ), bem como no número de dias desde a remoção da P4 até a ovulação (ET: 4,90  $\pm$  2,10 dias, n=5 e ER: 3,81  $\pm$  2,30 dias, n=8;  $P=0,1704$ ) e no tempo da indução até a ovulação (ET: 37,2 $\pm$ 6,57 hs, n=5 e ER:31,71 $\pm$ 8,28 hs, n=7;  $P=0,2334$ ). Vale ressaltar que na ER uma égua ovulou sem a indução farmacológica. Concluiu-se que o implante intravaginal de P4 (1,9g) permitiu, nas condições do presente estudo, desempenho folicular semelhante para as éguas na estação de transição primaveril ao das éguas da estação reprodutiva (verão), considerando que os animais estavam em boas condições corporais, sem alterações metabólicas e de bem-estar durante ambos os períodos avaliados.

**Palavras-chave:** Implante de progesterona, momento da ovulação, sazonalidade, éguas.

**Keywords:** Progesterone Implant, ovulation time, seasonality, mares.

## Expressão gênica do uPAR e MMP9 em ovários de éguas

### *Gene expression of uPAR and MMP9 in mare ovaries*

**Henrique Boll de Araujo Bastos\***, Vanessa Jegan, Gabriel de Oliveira Santos,  
Verônica La Cruz Bueno, Luiz Augusto Machado Centeno, Nelson Alexandre Kretzmann Filho,  
Rodrigo Costa Mattos

REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*E-mail: henriquebastosvet@gmail.com

A foliculogênese desde a emergência folicular até a ovulação, é guiada por uma série de fatores que determinam o remodelamento tecidual necessário durante este processo. O receptor do ativador plasminogênio tipo-urokinase (uPAR) e a metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) foram descritos como importantes fatores inter-relacionados durante o desenvolvimento folicular e remodelação tecidual em outros mamíferos. O objetivo do presente estudo foi verificar a expressão gênica do uPAR e MMP9 em ovários de éguas durante a foliculogênese. Foram coletados ovários de 12 éguas sem raça definida em abatedouro localizado na cidade de São Gabriel- RS (30°S, 54°O), Brasil. Somente ovários de éguas cíclicas foram selecionados. Baseado no diâmetro folicular os animais foram divididos em dois grupos, constituídos por Grupo desenvolvimento (DEV) e Grupo dominância (DOM). Grupo DEV foi formado por 6 animais, com folículos <28mm de diâmetro (folículos em desenvolvimento) e o Grupo DOM foi formado por 6 animais, os quais possuíam folículos ≥28 mm de diâmetro (folículos dominantes). O Grupo DOM foi dividido em dois subgrupos: ovários com a presença do folículo dominante (DOM-D) e ovários contralaterais (DOM-C). Cada ovário foi seccionado longitudinalmente e dois fragmentos foram retirados de um hemi-ovário para realização da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Um dos fragmentos foi removido da região da fossa de ovulação e o outro foi removido da porção central do ovário (estroma). Nos hemi-ovários com folículos, o fragmento central foi removido junto com uma porção do maior folículo. Os fragmentos foram conservados em meio de estabilização e estocagem (RNAlater®, Life Technologies). Para o qPCR foram utilizados primers para equinos específicos para uPAR e MMP9, a amplificação utilizada foi 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58 e 56°C por 30 segundos, e alongamento a 60°C por 30 segundos respectivamente. A quantificação relativa foi realizada e os níveis de RNAm dos genes alvos foram normalizados contra os níveis de RNAm do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O método comparativo (cycle threshold, CT) ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi utilizado para calcular a expressão relativa de RNAm. A expressão do uPAR não foi influenciada pelo tamanho folicular (DEV ou DOM) ( $P = 0.531$ ) nem pelo local (estroma ou fossa) ( $P = 0.344$ ), mas foi observada uma interação entre o tamanho folicular e o local ( $P = 0.043$ ). Nos ovários do grupo DEV a expressão do uPAR foi maior ( $P = 0.047$ ) no estroma do que na fossa. A expressão de uPAR no estroma tendeu a ser maior ( $P = 0.069$ ) no grupo DEV do que no estroma do grupo DOM. A expressão de MMP9 não foi influenciada pelo tamanho folicular (DEV e DOM) ( $P = 0.879$ ), nem pelo local ( $P = 0.193$ ). Entretanto, ocorreu uma tendência de interação entre o tamanho folicular e local ( $P = 0.082$ ). No grupo DEV foi observado maior expressão de MMP9 ( $P = 0.043$ ) no estroma do que na fossa. Em conclusão, o uPAR e a MMP9 possuem expressão em diferentes porções do ovário da égua, indicando sua relação com a remodelação tecidual durante a foliculogênese. A diferença de expressão do uPAR e da MMP9 no grupo DEV pode indicar uma relação com o remodelamento tecidual durante a fase de desenvolvimento folicular, pois em ambos a fossa de ovulação teve menor expressão do que o estroma. Sugerimos que essa menor expressão seja devido a distribuição espacial do folículo no ovário.

**Palavras-chave:** remodelação tecidual, foliculogênese, equino.

**Keywords:** *tissue remodeling, folliculogenesis, equine.*



## Ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosanóico (EPA) na criopreservação de sêmen de garanhões da raça Crioula

*Docosahexaenoic acid (DHA) and eicosanoic acid (EPA) in Criollo breed stallion semen cryopreservation*

Lidia Dutra Farias<sup>1,2,\*</sup>, Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2</sup>, Carolina Litchina Brasil<sup>3</sup>, Karina Lemos Goularte<sup>3</sup>, Rafael Gianella Mondadori<sup>4</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>2</sup>HISTOREP – Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>3</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

<sup>4</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

\*E-mail: lidiadfarias@hotmail.com

A variabilidade na qualidade do sêmen criopreservado em equinos está relacionada principalmente a variações consideráveis na composição da membrana plasmática do espermatozoide. Pesquisadores tem buscado alternativas para aumentar a fertilidade ao se usar sêmen congelado na espécie, sendo sugerido a adição de substâncias com efeitos crioprotetores, como os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), ao diluente de congelamento. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes níveis dos PUFAs: DHA e EPA, em meio diluente específico para a espécie, sobre as características do espermatozoide pós-descongelamento. Foi utilizado sêmen de quatro garanhões (quatro ejaculados por garanhão, n=16) da raça Crioula. Após a centrifugação, o sêmen foi diluído em diluente de congelamento comercial a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida (Botu-Crio<sup>®</sup>) ajustando a concentração para 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis/mL (grupo controle) e, na sequência, aos demais tratamentos foi adicionado: 25µM e 50µM de DHA e 25µM e 50µM de EPA. Ao descongelamento foram realizadas análises de cinética espermática no sistema de Análise Computadorizada para Avaliação Espermática (CASA), das seguintes variáveis: motilidade total, motilidade progressiva, motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade local, velocidade de trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade e linearidade; além de avaliação da integridade estrutural através do uso de sondas fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio) e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico. Os resultados demonstraram que a adição de 25µM e 50µM de DHA ou EPA ao sêmen de garanhões da raça Crioula não modificou os parâmetros avaliados em relação ao controle. As diferenças na composição do sêmen de diferentes espécies devem ser consideradas como possível causa para diferentes comportamentos após a adição de PUFAs, além de diferenças quanto ao protocolo de criopreservação. Outra hipótese é de que esta suplementação pode melhorar significativamente as características seminais de ejaculados com pior resistência ao processo de congelamento do que os que congelam bem. Pode ser que sejam necessárias avaliação de diferentes períodos e temperaturas de incubação do sêmen equino com lipídeos exógenos, uso de diferentes concentrações e realização de quantificação dos lipídeos para constatar incorporação dos mesmos ou não à membrana plasmática do espermatozoide, além estudos *in vivo*. Conclui-se que o presente estudo *in vitro* demonstrou que a adição de DHA e EPA nas concentrações testadas não alterou as variáveis avaliadas no sêmen de garanhões da raça Crioula.

**Palavras-chave:** ácidos graxos poli-insaturados, criopreservação, sêmen, espermatozoides, fertilidade, garanhão.

**Keywords:** *polyunsaturated fatty acids, cryopreservation, semen, sperm, fertility, stallion.*