



Análise da morfometria das cabeças de espermatozoides *in natura* e após a I Análise proteômica do lavado uterino oriundo de ovelhas submetidas à protocolo hormonal paradilatação cervical

Proteomic analysis of uterine lavage from ewes submitted to hormonal protocol for cervical dilation

J.D.R. Santos¹, Y.M. da Silva², F.C.S. Nogueira², L.F.C. Ramos², J.M.G. Souza-Fabjan¹, R.I.T.P. Batista¹, A.R. Taira¹, N.O. Barbosa¹, J.F. da Fonseca³, F.Z. Brandão¹,

^{*1}Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFF, Niterói, RJ, Brasil; ²Laboratório Unidade Proteômica – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ³EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil

*E-mail: julianadantas_rodrigues@hotmail.com

A dificuldade de transposição da cérvix ovina é um empecilho para o acesso ao útero e consequentemente para a coleta de embriões por via transcervical. Por este motivo, tem sido ampla a utilização bem-sucedida de protocolos hormonais para dilatação cervical, especialmente a associação de estradiol, ocitocina e prostaglandina. Contudo, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos desses hormônios sobre o ambiente uterino. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do protocolo hormonal para dilatação cervical (benzoato de estradiol, cloprostenol e ocitocina) sobre o perfil proteico do lavado uterino de ovelhas. Após a sincronização de estro e superovulação (Pinto PHN et al. 2018. *Theriogenology*, 113:146-152), 40 ovelhas da raça Santa Inês foram divididas em grupo tratado com benzoato de estradiol (100 µg, iv) e cloprostenol (0,12 mg, im), 12 h antes da coleta de embrião, acrescido de ocitocina (100 IU, iv), 15 minutos antes do procedimento de coleta, e um grupo controle, que consistiu na administração de solução salina nos mesmos volumes e horários de aplicação. A recuperação do lavado uterino foi realizada por laparotomia, e posteriormente os embriões foram separados das amostras. O lavado uterino foi precipitado com 15% ácido tricloroacético (TCA). As concentrações de proteínas foram determinadas por ensaio fluorimétrico Qubit (Thermo Scientific). As proteínas foram reduzidas com ditioneitol, alquiladas com iodoacetamida e posteriormente hidrolisadas com tripsina (1:50) por 18 h a 35 °C. Na sequência, os hidrolisados proteicos foram analisados em um sistema EASY II- nanoLC acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos. Os dados foram processados com o *software* Proteome Discoverer 2.1 e com o programa Perseus versão 1.6.15.0, enquanto para a análise funcional das proteínas foi utilizada a plataforma Panther versão 16.0. Foram identificadas 1447 proteínas; dentre elas, 436 proteínas foram encontradas exclusivamente no grupo tratado e 126 proteínas apenas no grupo controle. Um total de 15 proteínas foram mais abundantes no grupo tratado (P<0,05), dentre elas a glutatona transferase (relacionada com a biossíntese de prostaglandinas) e osteopontina (envolvida na regulação de estradiol e da transcrição). Já no grupo controle, cinco proteínas foram mais abundantes (P<0,05), das quais destaca-se a cofilina (ligada a regulação positiva do desenvolvimento embrionário). De modo geral, as principais funções biológicas de proteínas oriundas do lavado uterino de ovelhas tratadas foram relacionadas à processos celulares e metabólicos. No lavado de ovelhas controles, destacaram-se as funções relacionadas a processos celulares, metabólicos, de locomoção e localização. Em relação às funções moleculares, as proteínas de ovelhas tratadas foram associadas à atividade catalítica, de ligação e estruturação molecular. De forma similar, em ovelhas controles, as proteínas foram associadas à atividade catalítica e de ligação. A quantidade de proteínas exclusivamente encontradas no lavado uterino de ovelhas tratadas indica que essa combinação hormonal pode promover alterações celulares e/ou moleculares, possivelmente como mecanismo de compensação para equilíbrio hormonal no ambiente uterino, visto que é o período de implantação do embrião. Dessa forma, essas modificações proteicas no útero podem ser necessárias, para que haja o crescimento embrionário adequado. Em conclusão, o protocolo hormonal para dilatação cervical baseado na administração de benzoato de estradiol, cloprostenol e ocitocina modifica o perfil proteico do lavado uterino recuperado de ovelhas superovuladas após a coleta de embrião.

Palavras-chave: Coleta de embrião, cérvix, proteínas.



Concentração de proteínas no plasma seminal de garanhões

Protein concentration in seminal plasma of stallions

Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Henrique Boll de Araujo Bastos², Isabela Roesse², Rodrigo Costa Mattos², Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}

*¹HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil; ²REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil

*E-mail: veronicalacruzbuono@hotmail.com

O plasma seminal é o fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação, fornecendo o meio de sobrevivência e favorecendo o transporte espermático. Variações na composição do plasma seminal de diferentes machos têm sido relacionadas a diferentes índices de fertilidade. Alterações nos níveis proteicos do plasma seminal podem contribuir para as desordens reprodutivas no garanhão. Nosso objetivo foi correlacionar a concentração de proteína do plasma seminal com a taxa de prenhez (TP) e cinética espermática de garanhões da Raça Crioula. Foram utilizados 24 garanhões em atividade sexual (um ejaculado de cada garanhão foi coletado com vagina artificial Hannover), com idade entre 4 e 20 anos, alojados nas proximidades de Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. A concentração espermática (CE) foi avaliada em câmara de Neubauer. As avaliações da Motilidade Total (MT); Motilidade Progressiva (MP); Imóveis (IM); Motilidade Circular (MC); Velocidade Curvilínea (VCL); Velocidade da Trajetória média (VAP); Velocidade em linha reta (VSL); Frequência de batimento do flagelo (BCF) foram realizadas através do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, AndroVision®, Minitube). A fertilidade foi avaliada através da prenhez no 16º dia, sendo que cada garanhão foi utilizado para inseminação de no mínimo 30 éguas. Para a quantificação das proteínas do plasma seminal, 5mL de sêmen fresco foram submetidos a centrifugação a 600xg por 10 min, em temperatura ambiente e o sobrenadante foi armazenado em -80°C. Todas as amostras do plasma seminal foram armazenadas em triplicata no freezer - 80°C. Uma das replicadas de cada amostra foi descongelada e centrifugada a 10.000 x g por 60 min a 4°C para remover detritos e coletar o sobrenadante. O conteúdo proteico foi determinado de acordo com o método de Bradford. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (TP ≥ a 51%) e Grupo 2 (TP ≤ a 50%). Para análise estatística foi utilizada correlação de Pearson, sendo o nível de significância P < 0,05. Os valores médios e desvios padrão das variáveis observadas nos Grupos 1 e 2 foram respectivamente: CE (132,75x10⁶ /mL ± 65,43 e 197,25x10⁶ /mL ± 154,79); TP (76 % ± 9 e 31% ± 7); MT (67% ± 18 e 38% ± 22); MP (34% ± 21% e 18% ± 10); IM (30% ± 20 e 61% ± 22); MC (4% ± 4 e 2 % ± 1); VCL (100µm/s ± 41 e 70µm/s ± 37); VAP (47µm/s ± 19 e 32µm/s ± 15), VSL (38µm/s ± 15 e 25 µm/s ± 11), BCF (12µm/s ± 5 e 8 µm/s ± 4), Proteínas mg/ml (24,76mg/mL ± 6,18 e 29,27mg/mL ± 18,61), Volume total do ejaculado (46mL ± 24 e 33mL ± 20) e Total de Proteínas por ejaculado (1183mg ± 713 e 868 mg ± 446). Foi encontrada correlação positiva entre Proteínas mg/ml com CE (r=0,602/P<0,001) e Volume total do ejaculado com BCF (r=0,517/P<0,001). O Total de Proteínas por ejaculado tendeu a ser maior no Grupo 1, em relação ao Grupo 2 (P=0,08). Apenas uma correlação foi encontrada entre a concentração de proteínas e a cinética espermática, indicando que a concentração proteica se mantém em animais com características seminais e índices de fertilidade diferentes. A tendência de maior quantidade de proteínas totais no plasma seminal encontradas no Grupo 1 está relacionado com o volume seminal. O entendimento da composição de proteínas do sêmen pode ser diretamente aplicável às condições de laboratório e resultar em maior eficiência na produção de potros. Os resultados verificados neste estudo sugerem que a influência das proteínas do plasma seminal sobre os parâmetros de qualidade do sêmen e fertilidade está associada ao tipo de proteína presente e não à concentração de proteínas.

Palavras chaves: plasma seminal, proteína, equino.



Descrição da configuração base do sistema CASA para diferentes espécies de elasmobrânquios

Description of the CASA system configuration base setup for different species of elasmobranchs

P.N. Jorge-Neto^{1,2*}, S.D. Ramos², H. Colbachini³, F.L.A Padilha³, R.C. Gutierrez³, M.F.Góes⁴, D.S. Lutfi⁴, R.F. Valle⁴, A.C.C. Fernandes¹ & C.S. Pizzutto^{1,2}

¹Instituto Reprocon; ²FMVZ/USP; ³Aquário de São Paulo; ⁴Aquário Marinho do Rio de Janeiro
*E-mail: pepovet@usp.br

Os elasmobrânquios constituem a classe de animais com esqueleto cartilaginoso composta por tubarões e arraiais. O declínio populacional acentuado desses animais no mundo todo gera preocupação de especialistas quanto a preservação destas espécies. O objetivo do estudo foi desenvolver e descrever um *setup* base para avaliação do sêmen de diferentes espécies de elasmobrânquios com espermatozoides com cabeça em formato de espiral usando o sistema CASA. Esta padronização permite uma análise inicial do sêmen de diferentes espécies em situação de campo, permitindo rápido ajuste dos *setups* por espécies. Para o *setup* inicial, diferentes amostras de sêmen de *Potamotrygon* ssp. foram diluídas com EasiBuffer B (IMV Technologies) e, em seguida, 3µL foram carregados em lâminas Leja 4 câmaras de 20µm. Os testes foram conduzidos no sistema IVOS II Computer Assisted Semen Analysis (CASA) com o software Animal Breeders II (v. 1.11.9; Hamilton Thorne, EUA) e o *setup* desenvolvido na subsidiária da IMV Technologies em Campinas, São Paulo, Brasil. A detecção de células (reconhecimento de cabeça e cauda) foi feita através da ferramenta *Live Overlay*. Os parâmetros de cinemática e morfologia foram definidos ajustando os itens na tela de *playback* de cada análise de vídeo. Os números mais próximos dos ideais para o reconhecimento de células encontrados foram: alongamento máximo (cabeça) = 60%, alongamento mínimo (cabeça) = 1%, brilho da cabeça mínimo = 111, tamanho máximo da cabeça = 80 µm², tamanho mínimo da cabeça = 5 µm², brilho mínimo da cauda = 77; para parâmetros cinemáticos: Cell Travel Max = 10 µm, STR progressivo = 75%, VAP progressivo = 50 µm/s, VAP lento = 50 µm/s, VSL lento = 30 µm/s, VAP estático = 10 µm/s, VSL estático = 0 µm/s, multiplicador de largura estática = 0,5; e para os parâmetros de morfologia: confiança DMR = 20%, DMR gota até a extremidade final máx. = 7 µm, DMR comprimento máximo da cauda = 15 µm, confiança de gota = 80%, distância distal da gota mín. = 4 µm, comprimento da cabeça proximal da gota = 0 µm, comprimento mínimo da cauda = 4 µm, comprimento médio do ângulo de curvatura da cauda = 5 µm, taxa do ângulo de curvatura mínimo 20°/µm, confiança da curvatura da cauda = 75%, confiança da cauda = 75%. Este *setup* base permitiu avaliação preliminar eficiente de espermatozoides das espécies marinhas: raia-pintada (*Aetobatus narinari*), raia-borboleta (*Gymnura altavela*) e tubarão-leopardo (*Stegostoma fasciatum*), e de água-doce: arraia-pintada (*Potamotrygon falkneri*) e arraia-motoro (*Potamotrygon motoro*). Com exceção da *G. altavela*, que possui espermatozoides com forma de flagelo, as demais espécies apresentam espermatozoides em forma de espiral. A uniformização dos dados para motilidade e morfometria espermática de elasmobrânquios através de um *setup* base possibilita a adequação dos mesmos por espécie com maior facilidade, visando análises de maior precisão por sistemas CASA.

Palavras-chave: aquário, raia, arraia, tubarão, sêmen

Agradecimentos: Aquário de São Paulo e Aquário Marinho do Rio de Janeiro (AquaRio). O presente trabalho foi financiado em parte pelo Instituto Reprocon e IMV Technologies.



Dosagem dos níveis de testosterona em extrato fecal de macacos-de-cheiro (*Saimiri collinsi*) pré-púberes submetidos a infecção experimental por vírus Zika

*Dosage levels of testosterone in fecal extract of prepubertal squirrel monkeys (*Saimiri collinsi*) subjected to experimental Zika virus infection*

J. B. Santos¹²; D. L. Leão²³; G. C. Benchimol⁵; D. B. A. Medeiros⁵; L. M. N. Casseb⁵; A. C. C. Martins⁴; L. A. Carneiro⁴; S. R. R. A. Scalercio⁴; S. F. S. Domingues¹²

^{*1}Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia (REPROAMAZON/UFPA); ²Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (BIOMEDAM/UFPA); ³Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; ⁴Centro Nacional de Primatas; ⁵Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB/IEC)
*E-mail: josybesantos@gmail.com

A testosterona é o principal andrógeno produzido pelos testículos, sendo responsável pelo desenvolvimento estrutural e funcional do trato reprodutor masculino. Alterações hormonais decorrentes de processos inflamatórios/infecciosos durante o desenvolvimento e a maturação sexual podem resultar em anormalidades reprodutivas. Estudos em diferentes modelos experimentais apontam alterações patológicas testiculares decorrentes da infecção por vírus Zika. No entanto, são escassos os estudos abordando os possíveis efeitos da infecção em animais pré-púberes. O objetivo deste trabalho foi analisar os níveis de testosterona no extrato fecal de macacos-de-cheiro (*Saimiri collinsi*) pré-púberes submetidos a infecção experimental por vírus Zika. Foram selecionados cinco animais (n=5) pré-púberes (< 2.5 anos) da espécie *Saimiri collinsi* oriundos do Centro Nacional de Primatas (Ananindeua, PA). Os animais experimentais foram divididos em dois grupos: infectado (G1; n=3) e não infectado (G2; n=2). No dia 0, o G1 foi infectado pela cepa VZIK BE H815744 em inóculo com 0,5 mL de suspensão de células VERO infectadas, contendo $1,0 \times 10^5$ PFU/mL. No mesmo dia, o G2 recebeu inóculo de 0,5 mL de suspensão de células VERO livres de cepa. Coletas de fezes para a análise de metabólitos fecais de testosterona foram iniciadas cinco dias antes da inoculação (dia -5) e realizadas diariamente até 21 dias após a inoculação (dia 21). A extração dos metabólitos fecais foi executada a partir de uma alíquota de 0,48 – 0,52g (0,50 g) de fezes *in natura*, adicionado a 5 ml de metanol a 80%. Em seguida, as amostras diluídas foram homogeneizadas *over night*, e submetidas à centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em microtubos, identificados por animal e data, acondicionados a -70°C, até o processamento das dosagens hormonais. Os níveis fecais de testosterona (ng/mL) foram medidos por ensaio de quimioluminescência usando o sistema de imunoensaio VITROS® ECiQ. Os períodos para a análise estatística foram classificados em: pré-inoculação (dia -5 a -1), fase aguda (0-9) e fase de convalescência (10-21). Os dados foram expressos em Média \pm DP, checados quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e analisados pelo programa Minitab® 19 Statistical Software. A diferença das médias foi realizada pelo teste t de Student para a comparação entre grupos e análise de variância (ANOVA) para a comparação entre períodos, seguida da diferença significativa pelo teste de Fisher. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os níveis médios fecais de testosterona (ng/mL) do G1 e G2 durante todo o experimento foram $2,606 \pm 0,256$ e $2,666 \pm 0,232$; respectivamente. G1 e G2 apresentaram as médias $2,711 \pm 0,221$ e $2,645 \pm 0,261$ na fase de pré-inoculação, $2,486 \pm 0,323$ e $2,595 \pm 0,212$ na fase aguda e $2,662 \pm 0,158$ e $2,729 \pm 0,230$ na fase de convalescência. Dentro de cada período não houve diferença estatística entre os grupos. Na avaliação dentro de um mesmo grupo, os animais infectados apresentaram redução dos níveis de testosterona na fase aguda quando comparado às fases de pré-inoculação ($p = 0,006$) e convalescência ($p = 0,006$). Não houve diferença estatística entre as fases no grupo não infectado. A redução dos níveis de testosterona na fase aguda da doença pode ser justificada pela infecção ativa das células de Leydig, responsáveis pela produção deste andrógeno. Logo, este trabalho aponta que a infecção por vírus Zika no seu estágio inicial pode resultar na redução dos níveis fecais de testosterona em *Saimiri collinsi* pré-púbere.

Agradecimentos: Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA) e Universidade Federal do Pará (UFPA).



Efeito da suplementação antenatal com diferentes doses de glutathiona reduzida sobre o estado oxidativo e vitalidade de neonatos caninos nascidos por cesariana eletiva

The effect of different doses of antenatal reduced glutathione on the oxidative status and vitality of neonatal puppies born by elective C-section

L. L. Almeida¹; M. C. Araújo¹; B. M. Justo¹; J. V. M. Lopes¹; M. M. Brito¹; R. R. R. Filho¹; C. I. Vannucchi¹

¹Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo.

*E-mail: l.almeida@usp.br

Ao nascimento por parto cirúrgico, os neonatos são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo, por aumento exponencial da produção de radicais livres durante a brusca transição do ambiente intrauterino hipoxêmico para o ambiente extra-uterino hiperóxico, somado à imaturidade do sistema antioxidante neonatal. Portanto, a suplementação antenatal de substâncias antioxidantes, tal como a glutathiona reduzida (GSH), pode auxiliar na redução dos efeitos deletérios do estresse oxidativo na transição feto-neonatal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação antenatal de GSH no estado oxidativo e antioxidante, bem como na vitalidade neonatal de cães nascidos por cesariana eletiva. Para tal, 26 neonatos foram alocados em 4 grupos experimentais, de acordo com a dose de GSH (por peso materno) na suplementação das fêmeas: Grupo Controle (não tratado, n=5); Grupo 5 mg/kg (n=6); Grupo 10 mg/kg (n=6) e Grupo 20 mg/kg (n=5). Em momento pré-operatório (entre a pré-medicação e a indução anestésica à cesariana), a GSH foi administrada por via intra-venosa. Após estimulação neonatal rotineira, os neonatos foram avaliados quanto a frequência cardíaca, frequência respiratória, tônus muscular, irritabilidade reflexa e coloração de mucosa ao nascimento, 1h, 6h, 12h e 24 horas pós-nascimento. Amostras de sangue venoso foram coletadas por punção da veia jugular nos mesmos momentos de avaliação para a lactatemia e determinação sérica do estado oxidativo e perfil antioxidante por método espectrofotométrico: determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx); capacidade antioxidante total (TAC); concentração de GSH e o grau de peroxidação lipídica (TBARS). Os resultados foram analisados quanto à interação entre os tempos e os grupos experimentais e as diferenças entre grupos avaliadas estaticamente pelo Teste LSD considerando $P < 0,05$. Os neonatos do Grupo 20 apresentaram menor grau de peroxidação lipídica ($81,33 \text{ ng/mL} \pm 9,32$) em comparação ao Grupo Controle ($114,94 \text{ ng/mL} \pm 11,62$), porém maior frequência respiratória ($35,68 \text{ mpm} \pm 3,42$) em comparação aos demais grupos (Controle: $24,64 \text{ mpm} \pm 2,87$; Grupo 5: $22,9 \text{ mpm} \pm 2,2$; Grupo 10: $24,67 \text{ mpm} \pm 2,5$). Ainda, o Grupo 20 apresentou maior tônus muscular ao longo dos períodos de avaliação (nascimento: $1,4 \pm 0,4$; 1h, 6h, 12h e 24h: 2 ± 0) em comparação ao Grupo 5 (nascimento: $0,33 \pm 0,21$; 1h, 6h, 12h e 24h: 2 ± 0) e Controle (nascimento: 0 ± 0 ; 1h: $1,6 \pm 0,24$; 6h, 12h e 24h: 2 ± 0). A lactatemia foi menor no Grupo 5 ($4,45 \text{ mMol/L} \pm 0,42$) em comparação ao Grupo Controle ($5,43 \text{ mMol/L} \pm 0,39$). A atividade da SOD foi superior no Grupo 10 ($105,29 \text{ U/mL} \pm 8,92$) em relação ao Grupo Controle ($79,6 \text{ U/mL} \pm 8,79$) e ao Grupo 5 ($78,99 \text{ U/mL} \pm 7,61$). Para as demais variáveis do perfil antioxidante, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. Em conclusão, a suplementação antenatal dose dependente de GSH promoveu menor estresse oxidativo neonatal, bem como diminuição da lactatemia e melhor vitalidade neonatal. Entretanto, ainda não é possível estabelecer de forma acurada a dose de GSH a ser preconizada para a suplementação materna antenatal.

Palavras chaves: Antioxidantes. Neonatologia. Cães. Espécies reativas ao oxigênio.



Efeito do diluidor quimicamente definido contendo LDL na cinemática e integridade de espermatozoides refrigerados de garanhões Mangalarga Marchador
Effect of chemically defined extender containing LDL on the kinematics and integrity of chilled sperm from Mangalarga Marchador stallions

T.M.Brito¹, W.M.Machado¹, L.R.Santana¹, M.G. Kersul¹, D.P.Guimarães¹, I.B. Allaman¹, P.P.N. Snoeck¹

*¹Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia, Brasil.
2 Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas da UESC

*E-mail: thalitamarkesvet@gmail.com

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são componentes comumente extraídos da gema de ovo que conferem proteção espermática contra o choque frio tendo em vista seu mecanismo de ligação com proteínas do plasma seminal, evitando o efluxo de colesterol e fosfolípidios da membrana, garantindo a estabilização da mesma durante a redução de temperatura que ocorre na refrigeração do sêmen. Além disso, as LDL são componentes com potencial antioxidante superior a gema de ovo quando presentes em diluidores seminais. O meio desenvolvido por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW), com modificações em sua formulação original, já conseguiu preservar o sêmen equino por até sete dias em temperatura ambiente. Apesar do meio não ter sido desenvolvido para preservar os espermatozoides em baixas temperaturas, sua formulação mantém o metabolismo espermático de forma a garantir a sobrevivência espermática por tempo prolongado. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi utilizar o meio quimicamente definido BWW para refrigerar a 15 °C o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador com a adição de LDL extraídas da gema de ovo. Sete ejaculados de sete garanhões foram coletados por meio de vagina artificial, diluídos 1:2 em BotuSêmen[®] para centrifugação a 600g por 10 min. Depois da centrifugação, o pellet foi rediluído para obtenção de 50 x 10⁶ espermatozoides / mL nos diferentes diluidores, formando os seguintes grupos experimentais: 1) BotuSêmen[®]; 2) BWW; 3) BWW + 2% LDL; 4) BWW + 4% LDL; 5) BWW + 6% LDL; 6) BWW + 8% e 7) BWW + 10% LDL. As amostras diluídas foram submetidas à refrigeração em caixa BotuFlex[®] até atingir a temperatura de 15 °C, quando foram transferidas e mantidas na mesma temperatura por 24 horas em refrigeradora MiniTube[®]. Para avaliar o efeito dos diluidores sobre os espermatozoides foram estudados os parâmetros de cinemática espermática pelo SCA Evolution[®]; a integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST); a integridade estrutural das membranas por meio das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP); a integridade da cromatina espermática utilizando a técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina e a atividade mitocondrial por meio da coloração de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso. Os dados foram submetidos Análise de Variância para testar as diferenças entre os tratamentos. Todas as análises foram feitas utilizando o software R Core Team, com um nível de significância de 5%. O BWW só conseguiu preservar de forma semelhante ao BotuSêmen[®] os parâmetros de atividade mitocondrial e ALH (P > 0,05), por isso, não deve ser utilizado para refrigeração de sêmen equino. O diluidor BotuSêmen[®] foi superior aos demais testados para preservar os parâmetros de motilidade, VCL, VSL e BCF (P < 0,05). O diluidor BWW com 10% de LDL preservou a VAP semelhante ao BotuSêmen[®] (P > 0,05) e os dois foram superiores aos demais diluidores (P < 0,05). Os diluidores BWW contendo concentrações de LDL igual ou acima de 4% preservaram a STR semelhante ao BotuSêmen[®] (P > 0,05) e foram superiores aos demais diluidores (P < 0,05). Os diluidores BotuSêmen[®] e BWW contendo 8 e 10% de LDL foram semelhantes e superiores aos demais para preservar a linearidade e o índice de oscilação espermática (P < 0,05). A integridade funcional dos espermatozoides foi mais bem preservada nos diluidores contendo LDL do que no BotuSêmen[®] e meio BWW (P < 0,05). O percentual de estruturalmente íntegros foi maior nas amostras refrigeradas em BWW contendo LDL e BotuSêmen[®] do que no meio BWW sem LDL (P < 0,05). A descompactação da cromatina do DNA foi reduzida em todos os grupos experimentais (P > 0,05). Baseado nos resultados foi possível concluir que o meio BWW sem adição de LDL não pode ser utilizado para refrigerar o sêmen equino e o diluidor BotuSêmen[®] foi superior para preservar parâmetros cinemáticos importantes depois de 24 horas de conservação a 15 °C.



Efeito do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) como aditivo ao diluente à base de água de coco em pó (ACP®) sobre a morfologia de folículos ovarianos pré antrais suínos, sob refrigeração

*Effect of pequi oil (*Caryocar coriaceum* Wittm) as an additive to powdered coconut water-based extender (ACP®) on the morphology of porcine preantral ovarian follicles during cooling*

G.L. Lima^{1*}, S.O. Lima¹, M.R.F. Silva¹, A.L.A. Ribeiro¹, D.M.L.P. Cavalcanti²

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal – IFCE, Crato, CE, Brasil

²Departamento de Ciências da Saúde – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

*E-mail: gabriela.lima@ifce.edu.br

A conservação de ovários para posterior utilização em biotécnicas reprodutivas, assume grande importância, uma vez que este fornece uma grande quantidade de oócitos inclusos em folículos pré antrais (FOPA) aptos a serem utilizados. Nesse sentido, tem sido sugerido o uso de substâncias com ação antioxidante na composição de meios para conservação de oócitos suínos. Estudos sugerem que o óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) possui compostos fenólicos, como flavonoides, que possuem propriedades antioxidantes, assim, este poderia ser um potencial aditivo ao meio de conservação de oócitos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a morfologia de FOPA de suínos, preservados em meio à base de água de coco em pó (ACP®) contendo óleo de pequi (1,0%), sob refrigeração por até 24h. Para tanto, foram utilizados 10 pares de ovários suínos, os quais foram divididos em 3 fragmentos, dos quais um foi fixado em paraformaldeído para processamento histológico constituindo o grupo controle (0h). Os demais foram acondicionados em tubos de vidro (15ml) contendo 5ml de ACP® e gentamicina (20 mg/ml), com ou sem a presença de 1,0% de óleo de pequi. Os tubos foram mantidos em caixas isotérmicas de 5L (15x21x17cm³, Isoplast®) contendo 3L de gelo biológico (Gelo Eutético®). A temperatura interna das caixas foi monitorada por meio de termômetro digital e estas foram abertas após 24 h. No momento da abertura, os fragmentos foram submetidos à análise morfológica. Para a avaliação, os FOPAs foram contados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordiais, primários e secundários) e com a morfologia (morfologicamente normais ou degenerados). As variáveis foram analisadas quanto a distribuição normal e homogeneidade de variâncias pelo método Kolmogorov-Smirnov, utilizando a ANOVA, seguido do teste de Tukey, empregando-se o programa Statview®. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (P<0,05). A temperatura interna da caixa isotérmica variou entre 4,0 e 8,5°C. O total de 90 FOPA foi avaliado, considerando o grupo controle e o tratamento. No grupo controle, não refrigerado, a maioria dos folículos pré antrais foi classificada como morfolologicamente normal (95,8 ± 1,42%) e apenas alguns folículos apresentavam-se atrésicos (4,2%). Após o processo de refrigeração foi verificada uma redução significativa da integridade morfológica dos FOPAs quando comparado ao grupo controle, independente do uso ou não do óleo de pequi. Entretanto, quando os tratamentos foram comparados entre si, foi observado o maior percentual de FOPA morfolologicamente normais ao se utilizar a solução de refrigeração contendo 1,0 % de óleo de pequi (57,23 ± 3,34%), em relação ao diluente sem a adição do óleo (48,31 ± 3,51%, P>0,05). Moléculas bioativas, tais como tocoferóis e carotenoides entre outras, presentes no pequi, têm por função impedir o ataque de ROS ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais, o que pode estar relacionado aos melhores resultados obtidos. Entretanto, estudos são sugeridos para identificar quais substâncias exercem este papel específico sobre os FOPAs. Diante do exposto pode-se concluir que o óleo de pequi na concentração de 1,0% adicionado ao diluente à base de ACP, possui efeito positivo sobre a morfologia dos FOPA de suínos, sob refrigeração por até 24 h.



Emprego de espermatozoides epididimários vitrificados na produção *in vitro* de embriões de gatos domésticos (*Felis catus*)

Use of vitrified epididymal sperm in the in vitro production of embryos of domestic cats (Felis catus)

S.L.G Lima^{1,2}; M. E. O. Alves¹; D. L. Leão³; I. T. A. Evangelista¹; I. S. R. Rodrigues^{1,2}; A. R. B. Soares¹; T.G. Cozzi⁴; M. S. Miranda^{1,2}; R.R. dos Santos⁵; S. F. S. Domingues^{1,2}.

¹Laboratório BIOMEDAM-UFPA, Castanhal, PA, Brasil. ²REPROAMAZON-UFPA, Castanhal, PA, Brasil

³IDSM, Tefé, AM. ⁴PPGSPAA-UFRA, Belém, PA, Brasil. ⁵SFR, Lelystad, Holanda

*E-mail: Silmara.lima@castanhal.ufpa.br

A vitrificação cinética de espermatozoide tem como princípio o não uso de crioprotetores intracelulares, e o emprego de crioprotetor extracelular em baixas concentrações ou até mesmo na ausência desses, associado ao resfriamento ultrarrápido em nitrogênio líquido. Geralmente, na vitrificação cinética de espermatozoides epididimários, os mesmos são recuperados do epidídimo e processados para a remoção do fluido seminal e debris celulares previamente ao processo de vitrificação. Contudo, essa remoção dos espermatozoides do ambiente epididimário por si, altera a osmolaridade, composição iônica e protéica do fluido epididimal, por utilizarem extensores para a recuperação. Recentemente foi descrita a vitrificação de equilíbrio da cauda do epidídimo de gatos, ou seja, sem a recuperação dos espermatozoides previamente ao processo de criopreservação, mas com o emprego de crioprotetores. Essa técnica mantém os espermatozoides no lúmen epididimal durante todo o processo de vitrificação, sem manipular os espermatozoides, diluir ou remover os constituintes do fluido epididimal, importantes para manutenção da qualidade espermática. No entanto, é necessário avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides epididimários vitrificados em cauda do epidídimo. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi realizar a fecundação *in vitro* (FIV) com espermatozoides de gatos domésticos recuperados de caudas do epidídimo após vitrificação de equilíbrio e aquecimento. Para a maturação *in vitro* (MIV), foram utilizados 6 ovários de gatas com a técnica slicing foram recuperados 66 complexos cumulus oophorus (CCOs) categorizados em grau I e II, de acordo com a compactação das células da granulosa. O rastreamento dos COCs foi feito em meio PBS 1X com 0,01% de gentamicina. Em seguida foram lavados com meio TCM – HEPES, e incubados no meio de maturação, constituído por TCM-199 suplementado com 4 mg de Albumina Sérica Bovina (BSA), Hormônio Luteinizante, Hormônio Folículo Estimulante, Piruvato de sódio e Gentamicina. Na placa de MIV, foram adicionados de 10 a 20 CCOs em gotas de 80 µl de meio de MIV cobertas com óleo mineral, e incubados por 24 h em estufa a 38°C e 5% CO₂. Em relação aos espermatozoides, a vitrificação da cauda do epidídimo foi realizada em meio base RPMI adicionando etilenoglicol a 40% e sacarose a 0,1M, utilizando a técnica de vitrificação superfície sólida (SSV). Após a vitrificação foi feito o aquecimento da cauda do epidídimo em banho maria a 37°C em três soluções com RPMI e concentrações decrescente de sacarose 0,1M, 0,05 M e 0,0M por 3, 5 e 7 minutos respectivamente. Em seguida, a cauda do epidídimo foi fatiada, e o fluido epididimário foi diluído em meio TALP. Para a FIV, foi realizada a seleção dos espermatozoides com a técnica de swim up, com centrifugação de 300g/3 min, o pellet foi ressuscitado em 100 µl incubado por 1 hora em estufa a 38,5°C com 5 % de CO₂. A concentração espermática foi de 2x10⁶, a taxa de motilidade foi 40% e vigor 4. Para a FIV os oócitos maturados foram incubados (37,5°C e 5% de CO₂) em meio Talp em gotas de 80µl na presença de 3µl do sobrenadante de espermatozoides. Após 18h de FIV, os possíveis zigotos foram cultivados em meio SOF e avaliados sobre taxa de clivagem por sete dias. O que resultou no Dia 3, uma taxa de clivagem de 10% (estágio de 8 células), e no Dia 7 com 20% de mórulas compactas. O presente estudo, mostrou pela primeira vez, a formação de mórulas após a fertilização *in vitro* utilizando espermatozoides recuperados de caudas do epidídimo vitrificadas de gatos domésticos. Diante disso, conclui-se que os espermatozoides recuperados possuem capacidade fecundante.



Immunolocalization of melatonin receptor type 1 in the sheep ovary and involvement of the PI3K/Akt/FOXO3a signaling pathway in the effects of melatonin on survival and *in vitro* activation of primordial follicles

R.S. Barberino¹, T.J.S. Macedo¹, T.L.B.G. Lins¹, V.G. Menezes¹, R.L.S. Silva¹, A.P.O. Monte¹, R.C. Palheta Jr², J.E.J. Smitz³, M.H.T. Matos^{1*}

¹Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, UNIVASF, Petrolina, Brazil; ²Laboratory of Veterinary Pharmacology, UNIVASF, Petrolina, Brazil; ³Follicle Biology Laboratory, VUB, Brussels, Belgium
*E-mail: helena.matos@univasf.edu.br

Melatonin plays an important role in the early folliculogenesis, and its actions can be mediated through interaction with type 1 receptor (MT1) and subsequent activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/forkhead box O3a (PI3K/Akt/FOXO3a) pathway. However, there are no data on the immunolocalization of the MT1 receptor protein in preantral and antral follicles and on the melatonin effects in the survival and activation of primordial follicles in sheep. The expression of the MT1 receptor in ovine ovaries was investigated by immunohistochemistry. Furthermore, ovine ovarian fragments were fixed for histology (fresh control) or cultured in α -MEM⁺ (control medium) or α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of melatonin (100; 500 or 1,000 pg/mL) for 7 days. After *in vitro* culture, ovarian fragments were destined to histological (follicular survival, activation, and growth) and immunohistochemical (cleaved caspase-3: apoptosis marker) analyses. To evaluate the possible involvement of the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in the melatonin actions, PI3K inhibition was performed in fragments cultured with LY294002 and immunostaining for phosphorylated Akt and FOXO3a was analyzed after culture in the absence or presence of PI3K inhibitor. Data regarding normal (survival), cleaved caspase-3-positive (atretic), primordial and growing (activation) follicles were compared by Chi-squared test. Data of follicular and oocyte diameters were evaluated by ANOVA and Tukey's tests ($p < 0.05$). The immunohistochemical localization of the MT1 receptor protein was observed in oocytes and granulosa cells of all stages of follicle development, and in theca cells of antral follicles. After culture, follicular survival was greater ($p < 0.05$) in 100 pg/mL melatonin (60%) than in the α -MEM⁺ (46%) and other melatonin concentrations (41.33% and 37.33% for 500 and 1,000 pg/mL melatonin, respectively). In addition, culture with 100 pg/mL melatonin maintained the percentage of atretic follicles (26.08%) similar ($p > 0.05$) to that observed in the fresh control (20.8%) and lower ($p < 0.05$) than other treatments (50%, 55% and 72.7% for α -MEM⁺, 500 and 1,000 pg/mL, respectively). Although all treatments induced a reduction ($p < 0.05$) in the percentage of primordial follicles and an increase ($p < 0.05$) in the percentage of growing follicles compared to the fresh control, 100 pg/mL melatonin showed greater ($p < 0.05$) follicular activation than α -MEM⁺ and other melatonin concentrations. *In vitro* culture of ovarian cortex with PI3K inhibitor plus 100 pg/mL melatonin increased ($p < 0.05$) the follicular atresia (60% of cleaved caspase-3-positive follicles) and inhibited ($p < 0.05$) the primordial follicle activation compared to the medium without PI3K inhibitor (containing only 100 pg/mL melatonin). Furthermore, follicles cultured with 100 pg/mL melatonin in the absence of LY294002 showed a moderate staining for p-Akt, while those cultured with the PI3K inhibitor showed a markedly reduced staining. The percentage of p-FOXO3a-positive oocytes was lower ($p < 0.05$) in the presence of PI3K inhibitor (30%) compared to the culture without the inhibitor (90%). These results suggest that melatonin effects on ovarian follicular cells can be via its antioxidant properties and/or mediated by its interaction with MT1 receptor. In conclusion, MT1 receptor protein is present in all follicle categories in the sheep ovary. After *in vitro* culture of sheep ovarian cortex, 100 pg/mL melatonin reduces atresia and promotes primordial follicle activation through the modulation of the PI3K/Akt/FOXO3a pathway. Studies on the activation of primordial follicles are important for the development of an *in vitro* culture system that maximize the pool of growing follicles, providing a large supply of mature female germ cells.



Leptospirose genital bovina: análise molecular do fluido folicular de vacas naturalmente infectadas

Bovine genital leptospirosis: molecular analysis of follicular fluid from naturally infected cows

P.V.S. Pereira¹, M.L.N. Di Azevedo², A.P. Loureiro², N.O. Barbosa¹, A.L.S.B. Borges², G. Martins², F.A. Carvalho-Costa³, W. Lilenbaum², J.M.G. Souza-Fabjan¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Niterói, RJ, Brasil;

²Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Instituto Biomédico, Niterói, Universidade Federal Fluminense, Rua Professor Hernani Melo, 101, Niterói, RJ, Brasil; ³Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

*E-mail: victor_paulo@id.uff.br

A leptospirose é uma zoonose amplamente disseminada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Em ruminantes, ela é responsável por falhas reprodutivas, como abortamentos, natimortos, infertilidade e aumento do intervalo de partos, gerando prejuízos econômicos. Além destes distúrbios, a morte embrionária precoce é uma das consequências mais observadas na infecção por *Leptospira* spp. Os mecanismos de infecção em oócitos e embriões bovinos, assim como a relação da infecção genital com a morte embrionária precoce e os consequentes danos a reprodução necessitam de maior elucidação. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a presença de DNA e caracterizou geneticamente leptospirosas no fluido folicular de vacas naturalmente infectadas participantes de programas de produção *in vitro* de embriões. Foram analisadas 251 vacas mestiças adultas e pluríparas pertencentes a diferentes rebanhos leiteiros comerciais do sudeste Brasileiro e sem sinais clínicos aparentes de leptospirose aguda. A coleta do fluido folicular foi realizada pela técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom ou *ovum pick-up* (OPU). O DNA foi extraído e a PCR realizada inicialmente baseada no gene *lipL32*, presente em leptospirosas patogênicas. Posteriormente, as amostras positivas foram submetidas à *nested-PCR* tendo como alvo o gene *secY*. Análises filogenéticas, foram conduzidas e uma árvore de máxima verossimilhança foi construída usando o modelo Tamura-Nei (TN92). De 251 amostras analisadas, 67 (26,7%) foram positivas para *lipL32-PCR*, confirmando a presença de leptospirosas no fluido folicular. Destas, foi possível amplificar e sequenciar nove cepas após *secY nested-PCR*. As comparações com o GenBank as identificaram as sequências como *L. interrogans*, apresentando 100% de identidade com estirpes do sorogrupo Sejroe, o que foi confirmado pela reconstrução filogenética. Nossos resultados mostram infecção ovariana em vacas usadas em programas de produção *in vitro* de embriões. Esse cenário é desafiador, uma vez que os animais não apresentavam sintomas aparentes de infecção, dificultando o diagnóstico e o controle da enfermidade. Devido ao fato das vacas utilizadas como doadoras de oócitos raramente serem submetidas a prenhez, e a doença ser crônica e silenciosa, dificilmente se observam sinais como morte embrionária precoce e repetição irregular do estro. O presente estudo confirma a infecção ovariana causada por estirpes de *Leptospira* tipicamente associadas a problemas reprodutivos. Esses achados aumentam a importância de se considerar essa síndrome crônica e silenciosa na triagem de animais para técnicas reprodutivas, especialmente a produção *in vitro* de embriões, devido ao alto custo envolvido. Por fim, é reforçada a necessidade de maior investimento no diagnóstico molecular individualizado utilizando amostras do trato genital das portadoras, somado ao coletivo baseado na sorologia.



Microbiota do semên suíno: Uma revisão

Porcine semen microbiota: A review

J. Dapont^{1*}, R. Zanella¹

¹Faculdade de Agromia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

*E-mail: 119416@upf

A produção de carne suína no Brasil é um dos setores mais importantes da economia nacional, sendo atualmente o quarto maior exportador mundial. Para suprir esta cadeia produtiva, é necessária uma eficiente produção, sendo a inseminação artificial (IA) uma das ferramentas para alcançar este objetivo. No entanto, vários fatores estão associados com o sucesso da aplicação desta biotécnica, desde a saúde da fêmea, período da inseminação e a qualidade da dose inseminante. A qualidade da dose pode ser um dos limitantes no sucesso reprodutivo da granja, sendo que a contaminação microbiana pode influenciar negativamente a viabilidade espermática. A presença de microorganismos no ejaculado pode ter origem de uma infecção sistêmica ou de contaminação na hora da coleta do sêmen por meio do contato do ejaculado com secreções do prepúcio, pêlos, mãos do coletador, contato indireto com aerossóis e fômites. A contaminação bacteriana afeta diretamente a integridade espermática e conseqüentemente a durabilidade e a viabilidade espermática nas doses. Neste trabalho realizamos uma revisão sistemática, para identificar os principais microrganismos presentes no ejaculado de suínos e o seu efeito na qualidade espermática. Para tanto pesquisamos na plataforma NCBI, sobre contaminantes de sêmen suíno. Foram encontradas 80 publicações de 1975 a 2021. Nestes estudos, as famílias de bactérias mais predominantes no ejaculado suíno foram as Enterobacteriaceae, Clostridiaceae e Lactobacillaceae. Entre os microrganismos mais frequentemente isolados estão os *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bordetella spp.* e *Mycoplasma spp.*, sendo que a grande maioria das amostras estavam contaminadas com *Escherichia coli*. A maior parte dos microrganismos identificados são bactérias gram-negativas, que possuem em sua membrana externa lipopolissacarídeos que atuam como uma endotoxina induzindo uma resposta imunológica aos espermatozoides, reduzindo assim a sua viabilidade. No entanto uma alternativa usada para minimizar o efeito dos microrganismos no sêmen está no uso antibióticos junto ao diluente. Dentre os antibióticos mais usados nos diluentes estão a penicilina, a estreptomicina e a gentamicina. Em conclusão a presença de bactérias no ejaculado, apresentam efeitos prejudiciais na viabilidade espermática de suínos, podendo causar aglutinação espermática, queda do Ph, redução na motilidade além de alterações estruturais no acrossoma. No entanto é necessário o melhor entendimento da origem da contaminação para o seu controle.



O efeito macho estimula o desenvolvimento folicular, o diâmetro ovulatório e a viabilidade embrionária em ovelhas superovuladas

The ram effect stimulates follicular development, ovulatory diameter and embryonic viability in superovulated ewes

A.R. Taira^{1*}, F.Z. Brandão¹, V.L. Brair¹, F.S.C. Leal¹, A.C.S. Ribeiro¹, J.B.S. Pinheiro¹, M.F.A. Balaro¹, J.M.G. Souza-Fabjan¹, J.F. Fonseca², R. Ungerfeld³

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFF, Niterói, RJ, Brasil; ²Embrapa Caprinos e Ovinos – Coronel Pacheco, MG, Brasil; ³Facultad de Veterinaria – UDELAR, Montevideo, Uruguai

*E-mail: augusto.vete@gmail.com

O efeito macho tem sido empregado para elevar a eficiência dos tratamentos de sincronização de estro, pois a introdução repentina de carneiros sexualmente maduros em fêmeas previamente isoladas induz um aumento na secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH). Sendo assim, objetivo deste estudo foi determinar se o uso do efeito macho durante o processo de superovulação estimula o desenvolvimento folicular, a quantidade de ovulações, a qualidade e quantidade de embriões em um programa de múltipla ovulação e transferência de embrião (MOTE). Um total de 28 ovelhas multíparas da raça Santa Inês tiveram o ciclo estral sincronizado com um protocolo de progesterona (Progespon; Syntex, Buenos Aires, Argentina) de curta duração (seis dias), sendo distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: 1) efeito macho (G_{EM}); ou 2) controle (G_{CON}). Para a superovulação (SOV), foram utilizados 133 mg de FSH, divididos em seis doses decrescentes a cada 12 h. Todas as ovelhas permaneceram isoladas dos machos, sem estímulo visual, olfatório e sonoro por 60 dias antes do início do estudo (distância mínima = 1000 m). Durante todas as etapas experimentais as ovelhas do G_{CON} permaneceram isoladas, enquanto as ovelhas do G_{EM} foram estimuladas com quatro carneiros adultos da raça Santa Inês. Cada carneiro permaneceu com sete ovelhas por 12 h, até totalizar 48 h de estímulo a partir da quinta dose de FSH. Os carneiros utilizados foram mantidos com um avental de proteção para evitar a cópula. Todas as ovelhas foram inseminadas três vezes (24, 36 e 48 h após a quinta dose de FSH) com sêmen fresco no óstio cervical, com 300×10^6 espermatozoides/dose. Os ovários foram escaneados por ultrassonografia transretal (SonoScape, Shenzhen, China, transdutor linear de 7,5 MHz) e os folículos foram classificados como pequenos (<3 mm), médios (3- 5 mm) ou grandes (>5 mm). Os embriões foram coletados por via transcervical e classificados de acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS). Os dados foram comparados por modelo misto (SAS University Edition); com os tratamentos como fatores principais. No início da SOV, a população de folículos pequenos, médios e grandes foi semelhante entre os grupos. Após introdução do efeito macho, no G_{EM} houve aumento do número de folículos grandes ($P=0,009$), associado a uma diminuição da quantidade de folículos médios e pequenos. O número de ovulações não diferiu (CL/animal; $G_{EM}=9,1 \pm 1,0$; $G_{CON}=8,0 \pm 1,0$; $P=0,4$), mas o maior e o segundo maior folículo ovulatório foram observados nas ovelhas do G_{EM} ($7,6 \pm 1,5$ e $6,4 \pm 0,8$ vs $5,9 \pm 1,3$ e $5,2 \pm 1,6$; $P < 0,0001$ e $P=0,002$, respectivamente). A taxa de recuperação embrionária, bem como o número de estruturas recuperadas, o número de estruturas degeneradas e não fertilizadas não diferiram entre os grupos. Todavia, a taxa de viabilidade embrionária foi maior no G_{EM} ($P=0,05$). Foi observado um efeito positivo da bioestimulação com efeito macho no crescimento folicular, uma vez que o número de folículos grandes no G_{EM} foi maior que no controle. Este fato pode estar relacionado com a maior aquisição de competência de desenvolvimento dos oócitos ovulados. Em conclusão, o efeito macho em ovelhas da raça Santa Inês durante a última fase do protocolo SOV, estimula o desenvolvimento folicular, aumenta o diâmetro ovulatório contribuindo para o incremento da taxa de viabilidade embrionária em um programa de MOTÉ.

Palavras-chave: bioestimulação, múltipla ovulação e transferência de embrião, ovinos.



Parâmetros dopplervelocimétricos da artéria testicular de cães pré-púberes

Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in prepubertal dogs

E.S. Oliveira¹, F.F. Magalhães¹, L.D.M. Silva¹

*¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária– PPGCV, Fortaleza, CE, Brasil

*E-mail: professoraelana@gmail.com

A aferição do fluxo sanguíneo da artéria testicular é utilizada em várias espécies para avaliar a função reprodutiva e verificar a existência de patologias. Em cães, possui uma aparência complexa compreendendo a artéria suprategicular (AST), que está cranialmente ao testículo, a artéria marginal (AM) que atravessa a túnica albugínea e encaminha-se longitudinalmente em direção ao polo caudal testicular, e a artéria intrategicular (AIT) que se direciona para o centro do testículo. A avaliação da artéria testicular por meio da ultrassonografia Doppler em cães, assim como em humanos, pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico e, portanto, valores de referência são necessários. Desta forma, objetivou-se avaliar por meio da ultrassonografia Doppler a artéria testicular em suas 3 localizações de cães pré-púberes. Para tanto, seis cães pré-púberes, sendo 4 sem raça definida, 1 Yorkshire e 1 Daschund foram utilizados. Como critério para inclusão no estudo, foram aceitos somente cães saudáveis, avaliados clinicamente e por exames complementares (hemograma, ALT e creatinina). A avaliação ultrassonográfica Doppler incluiu os seguintes parâmetros: velocidade do pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF), índice de resistência (IR) e índice de pulsatilidade (IP). Em seguida, os animais foram orquiectomizados e foi realizado o lavado epididimário para confirmação da pré- puberdade. Não foi possível mensurar os parâmetros dopplervelocimétricos da AIT. A ultrassonografia Doppler demonstrou que a artéria testicular possui forma de onda monofásica, com picos sistólicos, fluxo diastólico contínuo e baixa resistência vascular. A VPS da AST do testículo esquerdo (TE) foi $11,03 \pm 2,10$ cm/s e do testículo direito (TD) $13,06 \pm 4,17$ cm/s. A VDF da AST do TE foi $7,28 \pm 3,60$ cm/s e TD $7,11 \pm 4,88$. O IR da AST do TE foi $0,49 \pm 0,09$ e do TD $0,50 \pm 0,26$ e o IP da AST do TE foi $0,49 \pm 0,26$ e do TD $0,74 \pm 0,60$. A VPS da AM do TE foi $13,96 \pm 3,39$ cm/s e do TD $13,20 \pm 4,11$ cm/s, a VDF do TE foi $8,92 \pm 4,15$ cm/s e do TD $8,26 \pm 2,79$ cm/s, o IR do TE foi $0,37 \pm 0,15$ e do TD $0,37 \pm 0,04$ e o IP do TE foi $0,49 \pm 0,23$ e do TD $0,46 \pm 0,07$. O baixo IR corrobora com a idade e a imaturidade sexual dos animais do estudo. O IR é um parâmetro utilizado para avaliar a maturidade sexual uma vez que está relacionado à vasodilatação e ao aumento do fluxo sanguíneo. Valores de referência são necessários para a avaliação dos parâmetros dopplervelocimétricos, no entanto existem poucos estudos relacionados ao tema. Nossos achados corroboram com outros estudos e auxiliam na formação de uma linha para o estabelecimento dos valores de referência dopplervelocimétricos, fornecendo mais informações acerca do fluxo sanguíneo arterial testicular de cães pré-púberes.

Palavras-chave: pré puberdade, testículos, ultrassonografia.



Perfil de criação e práticas de manejo reprodutivo em canis do Brasil

Breeding profile and reproductive management practices in kennels in Brazil

M.T. Costa, P.M.C. Freitas, V.A. Bastos, M.R. Luz

Escola de Veterinária da UMFG, Belo Horizonte - MG, Brasil

Email: mirellavet2015@gmail.com; luzmr@uol.com.br

As práticas de manejo reprodutivo influenciam diretamente a eficiência reprodutiva da criação. Objetivou-se conhecer os perfis de criação e as principais práticas de manejo reprodutivo adotadas por criadores de cães no Brasil. Um questionário foi elaborado com 90 perguntas, e disponibilizado via mídias sociais (Whatsapp, Instagram, Facebook e e-mail) a criadores em 2020. Foram obtidas 202 respostas de criadores anônimos, de 63 raças, oriundos de 22 estados da federação, com 1 a 40 anos de criação. Os estados mais predominantes foram SP (19%), MG (18%), RJ (11%), PR e PE (6%), SC e GO (5%). As raças mais prevalentes entre os respondentes foram Border Collie (6,7%), Fila Brasileiro (6,5%), Bulldog Francês (6,2%), Dogue Alemão (5,6%), Spitz Alemão (5,1%), Golden Retriever (4,2%), Pastor Alemão (4,1%), Rottweiler (4,1%), Chihuahua (4,1%), Yorkshire Terrier (3%), Husky Siberiano (3%), Pug (2,6%), Australian Cattle Dog (2,5%), Boiadeiro Bernês (2,5%), Pastor de Shetland (2,5%), Shih Tzu (2,5%), Beagle (2,5%), Labrador Retriever (2,1%), Cocker Spaniel Inglês (2,1%), West Highland White Terrier (2%), Pastor Belga Malinois (2%), American Pit Bull Terrier (2%) e Bulldog Inglês (2%). Dos criadores, 18,8% relataram ser a criação de cães sua atividade profissional principal, e 81,2% não, sendo que 62,4% relataram exercer outra atividade profissional ligada a cães, como ser médico veterinário, *handler*, adestrador, possuir pet shop ou hospedagem. 75,3% dos criadores declararam possuir responsável técnico. 38,4% participa de exposições frequentemente, 29,8% esporadicamente e 31,8% não participa. Na maioria dos criatórios o alojamento dos cães é realizado em canis (16,9%), fora de canis (15,4%), e igualmente dentro e fora de canis (54,4%). Apenas 35% dos criadores afirmaram que os cães são testados para brucelose, mas 57,4% relataram ter a disposição um veterinário especialista em reprodução canina. Todavia, 41,5% nunca realizaram exame andrológico nos reprodutores e apenas 4,6% realiza o exame frequentemente. 55,6% dos criadores relatou que já importou/exportou cães para outros países, mas apenas 5,1% importou/exportou sêmen. As características consideradas para iniciar o macho na reprodução são idade (63,4%), qualidade do sêmen (22,7%) e libido (13,9%). Testes para doenças genéticas da raça são realizados frequentemente ou regularmente por 51,3%, dos criadores, ocasionalmente por 34% e 14,7% nunca realizou. A idade mínima para entrada das fêmeas na reprodução variou de 6 a 36 meses, sendo a maioria (90%) entre 12 a 24 meses. Na maioria dos canis o acasalamento é realizado a cada 2 cios (56,3%) ou esporadicamente (26,4%), sendo que 2,5% (5) relataram acasalar conforme a saúde da fêmea, e 1,5% (3) em todos os cios. Foi relatado que na maioria das vezes o acasalamento é por monta natural (MN) (51,8%), por inseminação artificial (IA) (16,8%) ou ambas (31,5%). Dentre os respondentes que já realizaram IA, 83,4% utilizaram sêmen fresco, 14,0% sêmen refrigerado e 2,5% com sêmen congelado. As principais razões para uso de IA são comportamento do macho (45,1%), morfologia (25,4%), genética (19,7%), razões sanitárias (18,7%), distância física do casal (12,4%), qualidade do sêmen (7,3%) e falta de bons reprodutores (5,2%). Já os dias utilizados para acasalar citados são “todos os dias que a fêmea aceita o macho” (10,1%), dias fixos do ciclo (28,4%), dia alternados no estro (36,0%), diariamente (12,7%), a cada 3 dias (3,4%) e livremente (9,3%). O número de ninhadas/matriz relatado varia de 1-12, mas 89,3% dos criadores tem entre 2 e 6 ninhadas/matriz. O número médio de ninhadas/ano nos últimos 5 anos do canil foi de até 3 (48,2%), 4-5 (24,1%), 6-10 (14,9%), 11-20 (7,7%), 21-40 (4,1%) e maior que 41 (1%). A idade em que a maioria dos criadores retira as matrizes da reprodução é entre 4-5 anos (23,4%), 5-6 anos (29,2%), 6-7 anos (18,8%) e 7-8 anos (7,3%). Já para os machos é entre 5-6 anos (11,6%), 6-7 anos (15,8%), 7-8 anos (33,2%), 8-9 anos (7,9%), 10 anos (20,5%), 11 anos (2,6%) e 12 anos (2,1%). Observa-se muita falta de padronização das práticas de manejo reprodutivo. Além disso, práticas importantes como exames de brucelose, exames andrológicos e uso de IA para melhoramento genético parecem pouco valorizadas pelos criadores. A não realização de exame andrológico, associada a idade avançada dos reprodutores utilizados pode impactar negativamente a eficiência reprodutiva.