

## **Fotobiomodulação pós congelabilidade seminal epididimária em garanhões**

### *Photobiomodulation after epididymal seminal freezing in stallions*

**Eduarda Stankiwich Vaz<sup>1\*</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>1</sup>, Mayara Silvestri<sup>1</sup>, Natália Santana Siqueira de Lara<sup>1</sup>, Ane Karoline Maia<sup>1</sup>, Luana Melo da Silva<sup>1</sup>, Inara Regina Arnt Ramos<sup>1</sup>, Ally Carolina Barragán Pérez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil

\*E-mail: eduardastankiwich@gmail.com

A cauda do epidídimo é responsável pelo armazenamento de espermatozoides até o momento da ejaculação e pela maturação dos mesmos, tornando-os capazes de fertilização. A técnica de recuperação desses espermatozoides proporciona uma última chance de se obter o material genético de reprodutores de grande potencial. O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da exposição à luz laser de baixa intensidade na motilidade e integridade de membrana em espermatozoides epididimários criopreservados. Cinco amostras de testículos de equinos foram coletadas, pós orquiectomia, para recuperação de células espermáticas epididimárias da cauda do epidídimo, através do método de flutuação. Após coleta, as amostras foram envasadas em palhetas e criopreservadas. Após descongelamento, foram divididas em dois grupos “COM LASER” e “SEM LASER”. As amostras do grupo “COM LASER” foram expostas ao Laser diodo de Arseniato de Gálio (AsGa) por 2 minutos e 51 segundos, a 12J, em 904 nm, pela técnica de varredura. As amostras dos dois grupos foram analisadas quanto a motilidade inicial (%), de forma subjetiva sob microscopia óptica, e realizado esfregaço com Eosina e Nigrosina (EN) para avaliação da integridade de membrana plasmática. O restante do sêmen foi incubado a 37°C com solução hiposmótica por 50 minutos para realização do teste hiposmótico (HOST). Foi observada melhora na integridade de membrana plasmática pelo teste de (EN) ( $p < 0,05$ ) nas amostras “COM LASER”. Não foi observado aumento significativo na motilidade inicial (%) e integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico. Fatores como comprimento de onda, tempo de aplicação e momento de aplicação do laser (pré ou pós congelamento) influenciam diretamente nos efeitos do laser. Concluiu-se que o laser com comprimento de onda de 904nm e energia de 12J melhorou a integridade de membrana plasmática do espermatozoide epididimário criopreservado, sendo uma ferramenta promissora na reprodução animal.

**Palavras-chave:** baixa intensidade; cavalo; laserterapia; motilidade; integridade de membrana; sêmen.

**Keywords:** low intensity; horse; laser therapy; motility; membrane integrity; semen.

## **Influência da adição de creatina ao diluidor de congelamento de sêmen equino sobre a motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática espermática**

Influence of creatine addition to freezing semen extender on equine sperm motility, plasma membrane integrity and functionality

**Giovanna Sinigalia Leme Nogueira<sup>1\*</sup>, Larissa Marra Bouzan<sup>1</sup>, Nayane Kelly Ciriaco Silva<sup>1</sup>, Cesar Lopes Horta<sup>1</sup>, Sophia Dreger Oliveira<sup>1</sup>, Ighor Henrique Oliveira Santos<sup>1</sup>, Érika Ramos de Alvarenga<sup>1</sup>, Monique Albuquerque Lagares<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

\* E-mail: giovannalemenogueira@gmail.com

A criopreservação do sêmen torna o espermatozoide mais vulnerável ao estresse oxidativo. Portanto, a adição de substâncias antioxidantes e estimuladoras do metabolismo espermático pode ser benéfica para aumentar a qualidade do sêmen congelado equino. A creatina, é um composto de aminoácidos que atua no metabolismo e reduz o estresse oxidativo celular. Ela age por meio da ação enzimática da creatina quinase, que transfere um grupo fosfato para as moléculas de ADP, aumentando a produção de ATP. No presente estudo foi usado o sêmen de sete garanhões com no mínimo 50% de motilidade progressiva e 60% de morfologia normal. Os ejaculados foram coletados, diluídos com diluidor de resfriamento e após centrifugação ressuspensos com o diluidor de congelamento INRA 96 para  $100 \times 10^6$  esp./ml. Foram realizados quatro tratamentos de acordo com a concentração de creatina 0 (controle), - 0,5, - 1 e - 2 mM de creatina. As amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5ml e resfriadas até a 5°C, dispostas acima do nitrogênio líquido e após 20 min foram imersas neste. Após o descongelamento, as palhetas de sêmen foram avaliadas quanto a motilidade espermática com o Sistema de Análise Espermática Computadorizado (CASA) em quatro tempos: imediatamente após o descongelamento, 10, 20 e 40 minutos. A funcionalidade da membrana plasmática (MP) espermática foi avaliada com o teste hiposmótico com água destilada em três tempos (após o descongelamento do sêmen, 20 e 40 minutos) e observada com microscopia de campo claro (x 400). Foram considerados com MP funcional os espermatozoides que apresentaram cauda enrolada. O percentual de espermatozoides com MP íntegra foi avaliado com o corante vital eosina 3%. Foram considerados com membrana íntegra os espermatozoides que não tiveram a cabeça corada. Os dados foram avaliados quanto à normalidade com o teste de Shapiro Wilk e as médias e o desvio padrão comparados com o Teste de Friedman. A probabilidade de  $P < 0,05$  foi considerada significativa. Não foi observada diferença da média e desvio padrão do percentual de espermatozoides com motilidade total e progressiva nos tempos avaliados entre os tratamentos (1) controle  $18,5 \pm 7,2$  e  $2,9 \pm 2,1$ , (2) 0,5 mM  $19,5 \pm 5,6$  e  $4,6 \pm 1,6$ , (3) 1 mM:  $21,2 \pm 3,4$  e  $4,7 \pm 1,6$ , e (4) 2 mM:  $16,1 \pm 5,3$  % e  $3,8 \pm 2,2$  %. As diferentes concentrações de creatina não influenciaram o percentual de espermatozoides com MP íntegra (1) controle  $51,4 \pm 17,5$ , (2) 0,5 mM  $51,1 \pm 11,6$ , (3) 1 mM  $55,9 \pm 15,3$  e (4) 2 mM  $57,4 \pm 4,6$ %, e funcional (1) controle  $11,1 \pm 9,3$ , (2) 0,5 mM  $15,9 \pm 14,5$ , (3) 1 mM  $10,7 \pm 6,2$  e (4) 2 mM  $13,2 \pm 11,7$  %. Em conclusão, a motilidade, integridade e funcionalidade da MP do espermatozoide criopreservado equino não foram influenciadas pela adição das concentrações de creatina estudadas. É possível que estas não tenham sido suficientes para aumentar a produção de ATP e melhorar as características espermáticas analisadas.

## **Prediction values for the influence of fetal sex on *plasma* progesterone concentration in crioulo breed mares: a preliminary investigation**

*Valores de predição da influência do sexo fetal na concentração plasmática de progesterona em éguas da raça crioulo: uma investigação preliminar*

This study aimed to assess the influence of fetal sex on plasma progesterone concentrations in the mare between the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> months of gestation and to determine whether these measurements could identify fetal sex. Blood samples were collected at 30-day intervals, from 17 Crioula mares, between 114 days and 240 days of gestation. Maternal plasma progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay and the sex of the foals was confirmed at birth. Analysis of Variance (ANOVA) was made to verify the variation in maternal progesterone concentrations according to fetal sex and month of gestation. In mares carrying male fetuses (n=7), there was a significant difference in progesterone concentrations between months 4 and 8, as well as between months 7 and 8. In mares carrying male fetuses (n=7) progesterone concentrations were higher ( $P = 0.028$ ) during the 4<sup>th</sup> month of gestation and lower at the 8<sup>th</sup> month ( $P = 0.020$ ), compared to the values in mares with female fetuses (n=10). In the 8<sup>th</sup> month of pregnancy, the sensitivity and specificity of progesterone concentrations for the predicted sex were 80 and 100% respectively. A limit value of progesterone (12.45 ng/ml) was established through the ROC (receiver operating characteristic) Curve. Prediction values were 78.8 and 100% for males and females, respectively. Detection rates were 100 and 80% for males and females, respectively. The diagnostic accuracy for both sexes was 88.2%. It is concluded that fetal sex influences plasma concentrations of progesterone in pregnant mares.

**Keywords:** diagnostic; hormone dosage; sexing.

## **Influência da suplementação oral de creatina em garanhão sobre o espermatozoide e as concentrações de oxidantes e creatina no sêmen fresco**

*Influence of oral supplementation of stallion with creatine on spermatozoa and the concentrations of oxidants and creatine in fresh semen*

**Sophia Dreger Oliveira<sup>1\*</sup>, Giovanna Sinigalia Leme Nogueira<sup>1</sup>, Ighor Henrique Oliveira Santos<sup>1</sup>, Cesar Lopes Horta<sup>1</sup>, Rayza Pereira Baldoov<sup>1</sup>, Raphael Rocha Wenceslau<sup>1</sup>, Benito Soto Blanco<sup>1</sup>, Monique Albuquerque Lagares<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

\* E-mail: sophiadreger@gmail.com

O uso de antioxidantes pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade do sêmen equino. Uma substância com ação antioxidante é a creatina (Cr). Esta é composta de um conjunto de aminoácidos, atua na redução do estresse oxidativo e na refosforilação da adenosina difosfato (ADP). O objetivo deste estudo foi avaliar a motilidade e morfologia espermática, concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), malonaldeído (MDA) e Cr no ejaculado de um garanhão suplementado, via oral, com Cr por 75 dias. A dose administrada de Cr nos primeiros três dias foi de 100g, seguida 35g por dois dias e de 18g por 70 dias. Foram coletados e avaliados três ejaculados semanalmente em dias alternados ( $n=45$ ). O sêmen foi avaliado quanto a motilidade com o sistema de análise espermática computadorizado (CASA) e morfologia espermática com microscopia de contraste de fase (1000x). A concentração de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA foram mensuradas com ELISA e a de Cr com cromatografia líquida (HPLC). Para a análise do percentual de espermatozoides com integridade e funcionalidade de membrana plasmática (MP) e compactação da cromatina foi avaliado um ejaculado semanalmente ( $n=10$ ). A integridade da MP foi avaliada com microscopia de campo claro (400x) com o corante vital eosina 3%, sendo considerados com MP íntegra os espermatozoides não corados. A funcionalidade da MP foi avaliada com o teste hiposmótico com água destilada (sêmen: água destilada na proporção de 1:2), sendo considerados com MP funcional os espermatozoides que apresentaram cauda enrolada após o teste. A compactação da cromatina espermática foi analisada com o corante Azul de Toluidina, sendo que os compactados (íntegro) apresentaram coloração azul clara e os não compactados, azul escuro a roxo. Foi realizada a análise descritiva dos dados quantitativos por meio da média e desvio-padrão e obtida a correlação de Pearson entre todas as variáveis com o software R. Foram observados a média e o desvio padrão da motilidade total ( $74,3 \pm 10,7\%$ ), e progressiva ( $28,8 \pm 11,4\%$ ), morfologia normal ( $66,4 \pm 12,8\%$ ), MP funcional ( $46,6 \pm 12,2\%$ ) e íntegra ( $44,3 \pm 11,1\%$ ) e cromatina compactada (DNA íntegro,  $87 \pm 0,1\%$ ) do espermatozoide. As concentrações de  $\text{NO}_2^-$  ( $13,3 \pm 3,7 \mu\text{M}/\mu\text{g}$  de proteína),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $40,6 \pm 6,7 \mu\text{M}/\mu\text{g}$  de proteína), MDA ( $775,4 \pm 189,3 \mu\text{mol}$  de TBARS/ml) e Cr no sêmen ( $1,1 \pm 0,6 \text{ mg}$ ) foram mensuradas (média e desvio padrão). Foi observada uma correlação positiva entre os oxidantes avaliados ( $r = 0,75$ ) e entre a concentração de Cr no sêmen e espermatozoides com MP funcional ( $r = 0,64$ ). Em conclusão, a suplementação oral de Cr não influenciou as características espermáticas avaliadas. No entanto, visto que o percentual de espermatozoide com MP íntegra acompanha a concentração de Cr no sêmen, é possível que esta exerça um efeito protetivo sobre a MP espermática.

**Palavras chaves:** ejaculado, equino, antioxidante, metabolismo, motilidade.

**Keywords:** ejaculate, equine, antioxidant, metabolism, motility.

## Comparação entre sistemas computadorizados de análise de sêmen nas espécies bovina, equina e ovina

*Comparison between computerized semen analysis systems in bovine, equine and sheep species*

**Luísa Fontes Giachini<sup>1\*</sup>, Mariana Zanini Tortato<sup>1</sup>, Máira Daleffe Innocenti<sup>1</sup>, Cláudio Willian de Oliveira Delfes de Camargo<sup>2</sup>, Aime de Medeiros Friso<sup>1</sup>, Daniel Schmitt<sup>3</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>2</sup>, Verônica Flores da Cunha Scheeren<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal - REPROCAV, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Produção Animal e Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil

\*E-mail: lufgiachini@hotmail.com

Apesar de existirem sistemas computadorizados de análise de sêmen desde 1978, a avaliação seminal é uma etapa do exame andrológico ainda realizada de forma subjetiva na rotina de veterinários de campo. O *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) é um programa que digitaliza e analisa imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas sobre a trajetória e morfometria da célula. Entretanto, modelos consolidados internacionalmente, como o Hamilton-Thorne IVOS® (Beverly, MA, EUA) e o AndroVision® (Minitube, Alemanha), requerem alto investimento e estruturas laboratoriais para sua utilização. Na última década foram lançados no mercado sistemas portáteis, entre eles o AndroScope (Minitube do Brasil, Porto Alegre, Brasil), que possui um custo e tamanho acessível para sua implementação como ferramenta a campo. O objetivo do presente estudo foi comparar dois sistemas computadorizados de análise de sêmen (CASA), fixo e portátil, nos parâmetros de cinética espermática em sêmen bovino, ovino e equino. Para isso, foram utilizadas 19, 20 e 10 palhetas de sêmen criopreservado de bovino, equino e caprino, respectivamente, de 0,5 e 0,25ml, provenientes de centrais credenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As palhetas foram descongeladas em banho-maria à 37°C por 30 segundos e o sêmen foi depositado em microtubos, previamente aquecidos, permanecendo mais 5 minutos na mesma temperatura. As amostras foram avaliadas de forma objetiva pelos sistemas CASA modelo AndroScope e Hamilton-Thorn IVOS 12TM (HTM) para os parâmetros de motilidade total (MT %), motilidade progressiva (MP %), velocidade curvilínea (VCL  $\mu$ /s), velocidade média da trajetória (VAP  $\mu$ /s), velocidade linear progressiva (VSL  $\mu$ /s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH  $\mu$ /m), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF Hz), retilinearidade (STR %), linearidade (LIN %), e % de espermatozoides rápidos (RAP %). Após verificação do atendimento das prerrogativas da análise de variância, os dados foram submetidos a ANOVA pelo PROC MIXED do SAS, considerando o efeito aleatório de animal. As médias foram estimadas pelo LSMEANS e comparadas pelo teste t de Student. A significância adotada para todas as análises foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados de MT % fornecidos pelo AndroScope e HTM foram, respectivamente, de 78 e 74 ( $\pm 3,42$ ,  $P = 0,1367$ ) para a espécie equina, 64 e 69 ( $\pm 4,98$ ,  $P = 0,2666$ ) para a ovina e 72 e 79 ( $\pm 2,71$ ,  $P = 0,0581$ ) para a bovina, nos quais não foi evidenciada diferença estatística entre os modelos para as três espécies. Para MP % também não foi observada diferença na espécie ovina, 56 e 50 ( $\pm 5,67$ ,  $P = 0,3612$ ), e equina, 47 e 41 ( $\pm 2,93$ ,  $P = 0,0582$ ), assim como para STR % em bovinos e ovinos. A diferença dos demais parâmetros pode ser explicada pela utilização de softwares de análises distintos entre os sistemas portátil e fixo. Dessa forma, a assimetria entre os RAP % é justificável, uma vez que, o HTM classifica a velocidade do movimento com base em todos os espermatozoides móveis da amostra, enquanto o AndroScope baseia seus resultados apenas em espermatozoides que apresentem motilidade progressiva, mensurando populações espermáticas diferentes. Portanto, o AndroScope é um equipamento que permite análises confiáveis e pode ser utilizado como ferramenta de determinação dos parâmetros de cinética espermática tanto laboratorialmente, quanto a campo, visto que, os valores de motilidade total foram semelhantes para as três espécies, como também da MP % para as espécies ovina e equina e STR % para a bovina e ovina, parâmetros que, associados aos RAP %, são de grande importância para a avaliação da fertilidade dos animais em questão.

**Palavras-chave:** CASA; espermograma; motilidade; sistema portátil.

**Keywords:** CASA; semen analysis; motility; mobile system.

## Metabolites and fertility in stallions: Effect of taurine

*Metabólitos e fertilidade em garanhões: Efeito da taurina*

Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2\*</sup>, Henrique Boll Araujo Bastos<sup>2</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>2</sup>, Sandra.Fiala-Rechsteiner<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Historep - Institute of Biology, UFPEL, Pelotas, RS, 96160-000, Brazil, <sup>2</sup>Reprolab - Faculty of Veterinary, UFRGS, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil

Seminal plasma (SP), secreted by the testes, epididymis, and accessory sex glands, is the fluid expelled during ejaculation and constitutes up to 98% of the total ejaculate volume in stallions. Comprehensive metabolome analysis enables the evaluation of the end products resulting from the metabolism of biological systems. Taurine, a sulfur-containing amino acid, plays essential roles in various biological functions, especially in the male reproductive system. It is known for its antioxidant properties and for stabilizing cell membranes, making it a critical agent in sperm capacitation and motility. This study aimed to investigate the metabolomics of SP in stallions. Twenty-four Criollo stallions with a known reproductive history and a minimum of 30 inseminated mares were used. One ejaculate was collected from each stallion during the breeding season. Pregnancy rates at day 16 after artificial insemination ranged from 20.2% to 95.6%. The stallions were divided into two groups: High Pregnancy (HP), with a pregnancy rate per cycle  $\geq 51\%$ , and Low Pregnancy (LP), with a pregnancy rate  $\leq 50\%$ . Microscopic analysis was conducted using a computer-assisted sperm analysis system. Membrane integrity was assessed using fluorescent probes (propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate), and membrane functionality was evaluated through the hypoosmotic swelling test (HOST). Samples were centrifuged at 400 x g for 10 minutes. The SP was transferred to a 2mL microcentrifuge tube and centrifuged again (10.000 x g, 60 minutes, 4°C). The supernatant was mixed 1:1 with deionized water, filtered through 0.45µm filters to remove cell sediments, and then passed through a 0.22µm syringe filter before profile acquisition. The metabolic profile was obtained using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's t-test. Taurine levels were higher in the HP group ( $P < 0.05$ ). Taurine plays a crucial role as a capacitating agent and sperm motility factor with antioxidative and membrane-stabilizing effects. It also improves the motility of frozen-thawed sperm. Recent data suggest taurine has a protective effect on male reproductive function, promoting the endocrine function of the hypothalamus-pituitary-testis axis, testicular tissue development, spermatogenesis, and maturation. Additionally, taurine helps delay testicular aging, maintains homeostasis of the testicular environment, and enhances sexual ability. In pathology, taurine supplementation may reduce oxidative damage during sperm preservation in vitro, testicular reperfusion injury, and reproductive complications induced by diabetes. Taurine also acts as a protective agent against toxic damage to the male reproductive system caused by exogenous substances. Metabolites, as products of cell signaling pathways, can be used as biological markers. In conclusion, taurine may be considered a reliable marker of fertility on stallion.

**Keywords:** seminal plasma, taurine, metabolomics, stallion, fertility.

**Palavras-chave:** plasma seminal, taurina, metabolomica, garanhão, fertilidade.

**Avaliação do efeito do extrato etanólico da folha de amora (*Morus nigra* L.) na atividade mitocondrial de sêmen equino refrigerado***Evaluation of the effect of ethanolic extract of mulberry leaf (*Morus nigra* L.) on the mitochondrial activity of cooled equine semen***Arianne Raquel de Menezes Morais<sup>1</sup>, Matheus Soares da Silva Melo<sup>1,2</sup>, Alex Souza Rique<sup>1,2</sup>, Camilla Flávia Avelino de Farias<sup>1</sup>, Jerônimo Correia de Oliveira<sup>1,2</sup>, Kassia Cristina de Barros<sup>1</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias da UFPB, Brasil., Areia, PB, Brasil

\*E-mail: mxthevs@gmail.com

A criopreservação de sêmen equino é uma biotécnica essencial para a reprodução animal, garantindo maior eficiência reprodutiva por meio da conservação das células em baixas temperaturas e possibilitando a disseminação de material genético de elevado valor de forma dinâmica e eficaz. No entanto, o processo pode ocasionar dano celular, como a perda de motilidade e redução da atividade mitocondrial, que possui papel determinante para a célula espermática, como a produção de energia, equilíbrio redox e regulação do cálcio, bem como vias apoptóticas. Para mitigar esses efeitos, são utilizados diluidores seminais, compostos principalmente por crioprotetores, açúcares e tampões. Compostos bioativos presentes em extratos vegetais, como os da folha de amora (*Morus nigra* L.), têm demonstrado potencial antioxidante e antibiótico, tornando-os promissores aditivos para diluidores seminais. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *Morus nigra* L. como aditivo em diluidor seminal para a criopreservação de sêmen equino, com foco na preservação da atividade mitocondrial. As folhas foram colhidas em amoreiras na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e levadas para estufa à 55 °C por 48 h para secagem. Quando secas, foram maceradas e imersas em álcool etílico a 95% durante 72 h, ao abrigo de luz. Após, realizou-se uma filtração e a solução obtida foi submetida à secagem em evaporador rotativo a vácuo para a retirada do solvente e obtenção do extrato etanólico bruto. O extrato foi analisado quanto à presença de metabolitos secundários, avaliado por espectroscopia no infravermelho, quantificação de açúcares redutores, determinação do potencial antioxidante e solubilidade. Foi feita uma solução com a concentração de 4 mg/mL e adicionada ao diluidor TRIS-Gema nas concentrações de 0% (Grupo controle – GC), 1% (GT1), 5% (GT2) e 10% (GT3). As amostras de sêmen equino foram colhidas e diluídas em meio de refrigeração Botusêmen® (Botupharma) e transportadas a 5 °C até o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/UFPB). Para análise de refrigeração, o sêmen foi fracionado em tubos eppendorf, centrifugado e ressuspenso nos grupos supracitados, na concentração de 100 x 10<sup>6</sup>/mL e submetido a uma curva de refrigeração até 5 °C, e avaliado a cada 24 horas, por até 72 horas. As amostras foram então reaquecidas a 37 °C, em banho-maria, por 60 segundos, para serem avaliadas quanto à atividade mitocondrial, utilizando o teste citoquímico, baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo C presente nas mitocôndrias espermáticas. Essa técnica permite a classificação dos espermatozoides em quatro classes (I, II, III e IV) quanto a atividade das mitocôndrias presentes na peça intermediária. Após as avaliações, observou-se diferença (p<0,05) entre os grupos testados. O GT3 apresentou redução (p<0,05) no número de células com atividade mitocondrial classe I, que são as de maior atividade, e os demais grupos (GT1 e GT2) não diferiram do controle (GC). O GT3 foi o grupo com maior concentração de extrato (10%), mostrando assim que maiores concentrações do extrato de amora podem ser potencialmente tóxicas para a função celular, fato esse que pode ter sido causado devido à presença de compostos bioativos como os flavonoides rutina e isoquercetina, que estão relacionados com a ativação de enzimas apoptóticas como a caspase. Assim, o extrato etanólico da folha de amora, quando diluído no meio de criopreservação de sêmen, interfere na atividade mitocondrial de espermatozoides equinos.

**Palavras-chave:** citoquímico, concentração, espermatozoide.**Keywords:** cytochemical, concentration, spermatozoon.

## Efeito do diluidor de refrigeração na integridade espermática de cavalos da raça Crioulo Nordestino

*Cooling extender effect on sperm integrity of horses by Crioulo Nordestino breed*

**Jerônimo Correia de Oliveira<sup>1,2</sup>, Matheus Soares da Silva Melo<sup>1,2</sup>, Lucas dos Santos Andrade<sup>1,2</sup>, Camilla Flávia Avelino de Farias<sup>1</sup>, Neila Lidiany Ribeiro<sup>3</sup>, Leopoldo Mayer de Freitas Neto<sup>3</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias da UFPB, Brasil., Areia, PB, Brasil;

<sup>3</sup>Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Campina Grande, PB, Brasil.

\*E-mail: jeronimovet@gmail.com

Equinos da raça naturalizada Crioulo Nordestino são animais rústicos de origem ibérica, que desenvolveram padrões de adaptação às condições adversas do bioma Caatinga. São de porte médio, de menor exigência nutricional em comparação as outras raças de equinos, de dócil comportamento e de boa marcha, o que tem incentivado o interesse na reprodução deste animal para fins de conservação de patrimônio genético. Entretanto, o uso de biotécnicas nesta raça ainda é limitado e exige estudos para aumentar o quantitativo de animais. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da refrigeração e de diferentes diluidores sobre a integridade do espermatozoide de equinos da raça Crioulo Nordestino. Ejaculados (n=12) de três exemplares equinos da raça Crioulo Nordestino foram colhidos por vagina artificial, submetidos à filtração, centrifugação e divisão em três alíquotas, para ressuspensão nos diluidores Botusêmen® Special (BSS), Botusêmen® Turbo (BST) e Botusêmen® convencional (BSC), na diluição de  $30 \times 10^6$ /mL. Após, foram submetidos à refrigeração a 5 °C, na Botuflex®. Cada grupo experimental foi avaliado nos momentos fresco (previamente ao preparo para refrigeração), 0 h (imediatamente ao alcançar 5 °C), 12 h, 24 h, 36 h e 48 h sob refrigeração a 5 °C. O teste de integridade de membrana plasmática foi realizado pelo método de dupla coloração com eosina/nigrosina e os resultados foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade (Kolmogorov-Sminorv), teste ANOVA two-way, seguido pelo teste Tukey (p<0,05). Todos os testes foram realizados pelo software GraphPad Prism, versão 9.5.1. Nas primeiras 24 horas, não foi observada diferença entre os diluidores utilizados na integridade da membrana espermática, entretanto, após 36 horas, foi observada diminuição (p<0,05) da integridade de membrana dos espermatozoides refrigerados com o BST (33,13%) em relação aos demais grupos (BSS: 60,06%; BSC: 59,25%) e esta redução foi mais acentuada (p<0,05) após 48 horas de refrigeração no diluidor BST (22,25%) em comparação ao BSS (47,06%) e BSC (50,38%). A membrana plasmática do espermatozoide tem a função de preservar a estrutura celular durante o seu trânsito no trato reprodutor da fêmea e sofre alterações de permeabilidade neste trajeto. É sabido que o BST tem, em sua composição, pentoxifilina, uma metilxantina que interfere na atividade mitocondrial, aumentando o influxo de cálcio, com consequente aumento do batimento flagelar, induzindo à capacitação espermática. Desta forma, é perceptível que o diluidor BST estimulou a atividade flagelar nas primeiras 24 horas (dados não mostrados) e depois as células ativadas sofreram o processo de capacitação, mesmo em baixa temperatura. Estes achados permitem a seleção do diluidor mais adequado para a biotécnica a ser utilizada, permitindo o planejamento da inseminação artificial com o foco em aumentar a população destes animais. Desta forma, os diluidores Botusêmen® Special e Botusêmen® podem ser utilizados para o armazenamento do sêmen do cavalo Crioulo Nordestino para programas de inseminação artificial, considerando a integridade da membrana plasmática espermática por 48 horas em condições de refrigeração a 5 °C e o Botusêmen® Turbo pode ser utilizado nas primeiras 24 horas, com possível melhora da motilidade.

## Retomada da atividade ovariana cíclica por meio de sulpirida – relato de caso

*Resumption of cyclic ovarian activity – a case report*

Luana Melo da Silva<sup>1</sup>, Alessandra Knapik da Fontoura<sup>1</sup>, André Luiz dos Santos<sup>1</sup>, Ane Karoline Maia<sup>1</sup>, Gabriel Oliva Doniak<sup>1</sup>, Inara Regina Arnt Ramos<sup>1</sup>, Mariana Kajeviski<sup>1</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, Brasil

\*e-mail: luanamelo@ufpr.br

A sulpirida, um antagonista dopaminérgico seletivo dos receptores D2, tem sido empregada na medicina veterinária para a indução da atividade ovariana em éguas anéstricas, promovendo um aumento na secreção de prolactina pela hipófise anterior e, consequentemente, estimulando a dinâmica folicular e a produção de estrogênios essenciais para a retomada da ciclicidade reprodutiva. O presente estudo avaliou a eficácia da sulpirida na indução da atividade ovariana em uma égua, 22 anos, sem raça definida, com bom escore corporal, diagnosticada com anestro prolongado, com último cio detectado em novembro de 2023, atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR) no segundo semestre de 2024. O protocolo terapêutico consistiu na administração de Lutalyse® no dia 13 de setembro, com o objetivo de facilitar a retomada da atividade ovariana, seguido do início da sulpirida na dose de 1 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante uma semana, com início em 19 de setembro, a partir da identificação ultrassonográfica de um folículo dominante com 20 mm de diâmetro. Posteriormente, um novo protocolo foi realizado com início em três de outubro, com a mesma dosagem, por 12 dias. O monitoramento ultrassonográfico foi conduzido semanalmente ao longo dos meses de setembro e outubro, empregando um aparelho de alta resolução (Mindray, 2200, 10MHz), com as imagens obtidas sendo armazenadas digitalmente no banco de dados do Setor de Reprodução do HV-UFPR. A resposta ovariana ao tratamento foi avaliada por meio da observação da dinâmica folicular e da possível emergência de novos folículos antrais. No entanto, ao longo do período de acompanhamento, não foram observadas alterações significativas no crescimento folicular, sugerindo uma resposta insatisfatória ao protocolo terapêutico empregado. Esses achados corroboram a necessidade de investigações adicionais sobre a variabilidade da resposta ovariana à sulpirida em equinos, levando em consideração fatores como condição metabólica, status hormonal basal e possíveis interações com outros mecanismos neuroendócrinos envolvidos na retomada da ciclicidade reprodutiva.

**Palavras-chave:** adeno-hipófise, anestro, equino, folículo.

**Keywords:** adenohipophysis, anestrus, equine, follicle.

## The impact of extracellular vesicles from equine umbilical cord perivascular tissue-derived mesenchymal stromal cells on parameters of stallion semen after cryopreservation

*Impacto de vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais estromais do tecido perivascular do cordão umbilical equino na qualidade do sêmen criopreservado de garanhões*

Victoria Kanadani Campos Poltronieri<sup>1\*</sup>, Thaís de Araújo<sup>1</sup>, Julissa Andrea Ramírez Orozco<sup>1</sup>, Isaac Andres Mora Obando<sup>1</sup>, Guilherme Chagas Pignatari<sup>1</sup>, Natan Dias de Oliveira<sup>1</sup>, Emily Correna Carlo Reis<sup>1</sup>, José Domingos Guimarães<sup>1</sup>

\*

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG  
E-mail: victoria.poltronieri@ufv.br

Despite considerable advancements in equine semen cryopreservation techniques, a significant proportion of genetically superior stallions continue to produce frozen semen exhibiting suboptimal post-thaw quality. Therefore, the development and evaluation of novel cryoprotectant supplements, has become a critical area of research. In this sense, regenerative medicine seems promise. Extracellular vesicles (EVs), a heterogeneous population of membrane-bound nanoparticles, play a crucial role in intercellular communication. These EVs act as carriers of diverse signaling molecules, including lipids, proteins, mRNAs, and microRNAs, enabling them to influence processes such as cellular proliferation, apoptosis prevention, and membrane maintenance in target cells. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of EVs derived from mesenchymal stromal cell isolated from perivascular tissue of equine umbilical cord (ePMSCs) on post-thaw parameters of cryopreserved stallion semen. EVs were isolated from the culture medium of expanded ePMSCs using ultracentrifugation and characterized by nanoparticle tracking analysis and Transmission electron microscopy. Eight ejaculates were collected from four Mangalarga Marchador stallions. Only ejaculates exhibiting  $\geq 50\%$  motility and  $\geq 3$  vigor were included in the study. Immediately after collection, each ejaculate was centrifuged at  $600 \times g$  for 10 minutes. The pellets obtained were resuspended in BotuCrio® extender to a final concentration of  $100 \times 10^6$  motile spermatozoa per straw, and added ( $3 \mu\text{L/mL}$ ) or not with EVs. The straws were frozen in an automated system and stored in liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ). After thawing at  $37^\circ\text{C}$  for 30 seconds, the aliquots were immediately evaluated for motility and vigor, plasma membrane integrity, and mitochondrial potential. The latter were performed using epifluorescence microscopy following staining with carboxyfluorescein diacetate (CFDA), propidium iodide (PI), and Mitotracker Red CMXRos. The results were submitted to analysis of variance, and the means were compared by the "F" test, which is conclusive for two factors. In the samples added with EVs, higher values of motility and sperm viability by the epifluorescence test (CFDA +) were observed ( $f < 0.05$ ) However, no significant differences were observed between treated and control samples for vigor or mitochondrial potential ( $f > 0.05$ ). The transfer of the content present in the EVs to the sperm cell, such as lipids, may have a protective role to the sperm cell against cryopreservation, modulating the properties of its plasma membrane, such as permeability and fluidity. Since increased cholesterol in the membrane has been described as having a stabilizing effect, an increase in cholesterol delivery to spermatozoa by EVs could stabilize the sperm membrane, preventing damage during thawing. Future studies should investigate the specific EV contents responsible for the improved sperm quality and explore the dynamics of sperm-EV interaction during cryopreservation. Furthermore, evaluating the impact of EV supplementation on *in vivo* fertility is crucial for translating these findings into practical applications in equine breeding.

**Keywords:** cryoprotectants, nanoparticles, sperm motility, membrane integrity.

**Palavras-chave:** crioprotetores, nanopartículas, motilidade espermática, integridade de membrana.

**Agradecimentos:** CAPES – Finance code 001, CNPq e Fapemig

## Avaliação de sete protocolos para obtenção de PRP e sua aplicação como terapia intrauterina em jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado

*Evaluation of seven protocols for PRP obtaining and its application as intrauterine therapy in jennies inseminated with cryopreserved donkey semen*

Marcela Souza e Freitas<sup>1\*</sup>, Henry David Mogollón García<sup>2,3</sup>, Carolina Silveira Fontes<sup>1</sup>, Cristian Silva Teixeira<sup>1</sup>, Gabriel Victor Pereira Lima<sup>1</sup>, Yame Fabres Robaina Sancler-Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, <sup>2</sup>Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil, <sup>3</sup>Instituto Pasteur, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil

\*E-mail: marcela.s.souza@ufv.br

O sêmen asinino congelado apresenta fertilidade satisfatória em éguas, mas baixos índices em jumentas, devido à maior resposta inflamatória uterina nessa espécie. O plasma rico em plaquetas (PRP) destaca-se na veterinária por suas propriedades imunomoduladoras e regenerativas, sendo usado para tratar endometrite. No entanto, a falta de padronização na obtenção do PRP gera variabilidade nos resultados, especialmente em asininos, devido à escassez de estudos sobre a eficácia dos protocolos. Os objetivos deste estudo foram: I) comparar sete protocolos manuais para a obtenção de PRP em asininos; II) avaliar a taxa de prenhez em jumentas tratadas com PRP e inseminadas com sêmen asinino criopreservado. Na primeira fase, foram avaliados sete protocolos com dupla (DC: P1, P3, P5, P6 e P7) ou tripla centrifugação (TC: P2 e P4). Para cada protocolo, 15 mL de sangue de quatro fêmeas asininas (*Equus asinus*) foram coletados em tubos com citrato de sódio 3,2%. Após a primeira centrifugação (P1, P2, P3, P4 e P5: 120×g por 10 minutos; P6: 250×g por 10 minutos; P7: 400×g por 10 minutos), o sobrenadante foi centrifugado pela segunda vez (P1 e P2: 240×g por 10 minutos; P3 e P4: 600×g por 10 minutos; P5: 600×g por 20 minutos; P6: 2000×g por 10 minutos; P7: 1000×g por 10 minutos). Nos protocolos TC, 50% do sobrenadante da superfície foi desprezado e o restante submetido à terceira centrifugação (P2 e P4: 2000×g por 10 minutos). O 1/3 final de cada amostra após o processamento de DC ou TC foi considerado como PRP. As concentrações (por  $\mu$ L) de plaquetas (média  $\pm$  EPM), leucócitos e agregados plaquetários foram determinadas por contagem manual. Todos os protocolos testados foram eficientes na concentração plaquetária, porém o P2 ( $1.405.625 \pm 107.956$ ) apresentou maior concentração do que os demais (P1:  $673.750 \pm 62.696$ ; P3:  $850.000 \pm 21.090$ ; P4:  $940.625 \pm 59.559$ ; P5:  $841.875 \pm 85.916$ ; P6:  $761.875 \pm 87.437$ ; P7:  $631.250 \pm 35.831$ ) ( $p < 0,05$ ). O P3 apresentou maior contagem de leucócitos do que P6 e P7 e menor contagem de agregados plaquetários do que P4 ( $p < 0,05$ ). Além disso, os grupos TC (1,5 a 1,8 mL) produziram metade do volume de PRP dos grupos DC (3,0 a 3,6 mL). Assim, o P2 mostrou ser o mais eficiente em concentrar plaquetas, porém, protocolos TC geram menor volume final de PRP e maior tempo de processamento, impactando a aplicabilidade clínica. Na segunda fase, entre os protocolos DC, o P6 foi selecionado para obtenção do PRP. Assim, 32 ciclos estrais de 11 jumentas foram avaliados quanto à taxa de prenhez aos 14 dias após IA com sêmen asinino criopreservado. Os ciclos foram divididos em três grupos: (G1) controle, sem tratamento ( $n=11$ ); (G2) infusão única de PRP 30h após a indução da ovulação, antes da IA ( $n=11$ ); (G3) duas infusões de PRP: 30h após a indução da ovulação, antes da IA, e 4h após IA ( $n=10$ ). As taxas de prenhez não diferiram significativamente entre os grupos (G1: 0%, G2: 0%; G3: 10%). Os resultados indicam que o uso do PRP, obtido a partir do P6, não foi eficaz em aumentar a fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen criopreservado.

**Palavras-chave:** reprodução, plasma rico em plaquetas, endometrite, hemoderivado.

**Keywords:** reproduction, platelet-rich plasma, endometritis, hemoderivative.

## Ocorrência de laminite em decorrência de metrite em égua lusitana após episódio de retenção de placenta

*Post-metritis laminitis in a Lusitano mare with retained placenta*

Heithor Pereira Freitas Queiroz<sup>1</sup>, Carolina Tieko Shiozuka Branco<sup>1</sup>, Ana Clara Oliveira Dias<sup>2</sup>, Glória Beatriz Zieri<sup>3</sup>, Nádia Hooper Reis<sup>1</sup>, Karine Sati Nakasone<sup>2</sup>, Beatrice Ingrid Macente<sup>1</sup>, Fernanda Jordão Affonso<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil, <sup>2</sup>Programa de Residência em Área Profissional da Saúde -PRAPS -MVS, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp/FCAV – Jaboticabal, <sup>3</sup>Programa de Aprimoramento Profissional em Clínica Médica de Grandes Animais na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp/FCAV, Jaboticabal

\*E-mail: fernanda.jordao@unesp.br

A retenção de placenta em éguas é a patologia de maior prevalência durante o puerpério, diagnosticada após 3 horas pós parto, quando não ocorre a expulsão total das membranas fetais. A etiologia desse distúrbio pode estar relacionada a múltiplos fatores, como inércia uterina, distocia e alterações hormonais. O prolongamento em sua resolução pode gerar uma cascata de complicações, como metrite, endotoxemia e laminite. O tratamento preventivo é o mais indicado, sendo este a administração de ocitocina na primeira hora pós parto. A égua puro sangue lusitano, de 16 anos, plurípara, do presente caso relatado, foi encaminhada ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, da UNESP de Jaboticabal, com um dia de parida, por conta do potro que apresentava síndrome do mau ajustamento neonatal, não demonstrando reflexo de sucção tão pouco se mantendo em estação quadrupedal. A égua, porém, no dia da admissão no hospital, começou a apresentar sinais de desconforto, e ao realizar o exame físico identificou-se taquicardia (56 batimentos por minuto), leve desidratação e hipomotilidade nos quatro quadrantes e mucosas levemente hiperêmicas, também procedeu-se palpação transretal, que não apresentava alterações. Durante anamnese junto ao proprietário concluiu-se que a égua havia apresentado retenção de placenta de no mínimo 6 horas, não sucedendo a avaliação da placenta. Foi feita então a lavagem uterina com 6 litros de soro fisiológico, recuperando-se material inicialmente de aspecto mucopurulento, amarronzado e fétido, e ao final com aparência sanguinolenta. Realizou-se a administração de dose antitoxêmica de flunixin utilizando 0,25mg/kg, por via intravenosa, a cada 12 horas, e iniciou-se crioterapia preventiva à laminite. No dia posterior, prosseguiu-se a lavagem uterina com 24 litros de soro fisiológico e estabeleceu-se antibioticoterapia sistêmica com 6,6mg/kg de gentamicina, por via intravenosa. Contudo, ainda sim, foi constatado presença de pulso, aumento de temperatura e dor nos cascos, mantendo-se a crioterapia por 48 horas, atado a aplicação de 2,2mg/kg de fenilbutazona, por via intravenosa, uma vez ao dia durante 3 dias. Em conjuntura, ampliou-se o espectro da antibioticoterapia associando a administração da gentamicina com potássica, por via intravenosa. No terceiro dia considerou-se o aspecto do lavado uterino normal, manifestando melhora e controle no quadro de metrite, realizando em subsequência a coleta de sangue por punção da veia jugular em 20 tubos de 3,5 ml com citrato de sódio, para obtenção de plasma rico em plaquetas, os quais após serem centrifugados, realizou-se a retirada do sobrenadante, que foi depositado no corpo do útero, com auxílio de pipeta de inseminação. Ainda no terceiro dia de tratamento, devido ao agravamento do estado clínico do potro, identificando-se presença de bactérias no líquido peritoneal, o mesmo foi eutanasiado, e em consequência a isto o tutor dos animais optou por levar a égua para ser tratada em sua propriedade, mesmo sendo recomendada a radiografia dos cascos para avaliação da instalação da laminite, e esclarecido a necessidade da continuidade do tratamento intensivo da laminite. Diante dessa perspectiva, ressalta-se a importância do parto assistido e da avaliação da placenta a fim de prevenir-se das possíveis intercorrências emergenciais, como a retenção de placenta, que se não tratada rapidamente, pode evoluir para metrite, toxemia e consequentemente, a laminite.

**Palavras-chave:** retenção de placenta, puerpério, metrite, laminite.

**Keywords:** retained placenta, puerperium, metritis, laminitis.

## **Perfil microbiológico do leite de éguas saudáveis em diferentes momentos da lactação**

*Microbiological profile of milk from healthy mares at different moments of lactation*

**Gabriela Geraldo de Lima<sup>1\*</sup>, Jéssica Priscila da Paz<sup>1</sup>, Lorrayne de Souza Araújo Martins Motta<sup>1</sup>,  
Antonio Campanha Martinez<sup>1</sup>, Rodrigo Garcia Motta<sup>1</sup>**

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR, Brasil

\*E-mail: gabriela.geraldo123@gmail.com

O Brasil possui cerca de 6 milhões de equinos e é classificado como o maior rebanho na América Latina e o terceiro mundial. A lactação é dividida em três processos, conhecidos como, mamogênese, que é o desenvolvimento e crescimento das glândulas mamárias e ocorre no final da gestação e se estende até o parto, a lactogênese, que é a iniciação da lactação, na qual as células alveolares mamárias passam a ter a capacidade de secretar leite e a galactopoeia, que consiste na manutenção da lactação e é influenciado pela preservação das células alveolares e pelo reflexo de ejeção do leite ser eficaz. Apesar da mastite em éguas ser considerada de baixa ocorrência quando comparada a outras espécies, como ruminantes, a realização do cultivo bacteriano é fundamental quando há intenção de se firmar o diagnóstico. Algumas bactérias já foram identificadas no leite de éguas saudáveis e portadores da infecção mamária como *Streptococcus beta-hemolíticos*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* e enterobactérias. O objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de microrganismos e o perfil de sensibilidade de amostras de leite de éguas da raça Quarto de Milha coletados entre 1 e 90 dias pós-parto. Foram utilizadas 53 amostras de leite de 12 éguas em lactação em duas propriedades no estado do Paraná. Após desprezar os primeiros jatos de leite, colheu-se a amostra, em frascos estéreis que foram posteriormente acondicionados no freezer -20°C. As amostras foram submetidas a cultivo microbiológico e perfil de sensibilidade. Das 53 amostras de leite examinadas, 12 (22,64%) não apresentaram desenvolvimento microbiano, sendo que das 41 amostras restantes, obteve-se 19 isolamentos identificados. Os microrganismos mais encontrados foram *Streptococcus spp.* (20,75%), *Escherichia coli* (9,43%), *Staphylococcus coagulase negativa* (5,66%) e *Bacillus spp.* (5,66%). O perfil de sensibilidade mostrou que ceftiofur (80%), cefalexina (75,56%), amoxicilina (62,22%) e enrofloxacin (51,11%) foram os antimicrobianos mais efetivos e os maiores índices de resistência foram observados para sulfa (68,89%), tetraciclina (51,11%), penicilina (46,67%) e norfloxacin (44,44%). Em um estudo realizado com 55 amostras de leite de éguas, obtiveram isolamento microbiano de 47 (85,4%) amostras e 8 (14,6%) não houve crescimento de microrganismo. Houve uma maior prevalência de *Streptococcus spp.* (23,40%) e *Staphylococcus aureus* (14,88%) e *Streptococcus equi* (10,65%), e o perfil de sensibilidade obtido foi igual apenas para o ceftiofur, onde a sensibilidade foi observada em mais de 74% das amostras, resultado semelhante ao encontrado neste estudo, que foi de 80%, assim como a penicilina, que em ambos trabalhos apresentaram grande número de amostras resistente ao antimicrobiano. Em um estudo realizado na Polônia com 27 éguas, divididas em dois grupos, um com sintomas clínicos de mastite e outro grupo sem sintomas clínicos de mastite, durante a lactação e após o desmame, observou que os microrganismos mais frequentes isolados foram *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia*, coincidindo apenas três bactérias deste estudo. Conclui-se que as amostras de leite possuem diferentes tipos de microrganismos durante a lactação e que os isolados apresentam perfis de sensibilidade variado dependendo do antibiótico testado.

**Palavras-chaves:** sensibilidade, antibiótico, glândula mamária, equinos.

**Keywords:** sensitivity, antibiotic, mammary gland, horses.

## **Manejo bem-sucedido de gestação equina com restrição de crescimento intrauterino e anormalidade do cordão umbilical: relato de caso**

*Successful management of equine pregnancy with intrauterine growth restriction and umbilical cord abnormality: case report*

**Carolina Tieko Shiozuka Branco<sup>1,2</sup>, Alexandre Monteiro Barbosa<sup>2</sup>, Heithor Pereira Freitas Queiroz<sup>1</sup>, Raphael Assis Leandro de Moraes<sup>1</sup>, Nádia Hooper Reis<sup>1</sup>, Karine Sati Nakasone<sup>1</sup>, Beatrice Ingrid Macente<sup>1</sup>, Fernanda Jordão Affonso<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal; <sup>2</sup>Epona Stud - Boituva, SP - Brasil

\*email: fernanda.jordao@unesp.br

Anormalidades do cordão umbilical podem comprometer o desenvolvimento fetal, sendo a maior causa de abortamento não infeccioso em equinos. O uso de ácido acetilsalicílico (AAS) em casos de restrição de crescimento intrauterino (RCIU) tem sido associado a melhora no fluxo sanguíneo uteroplacentário e crescimento fetal e a suplementação com ômega 3 e 6 pode contribuir para o desenvolvimento fetal e reduzir processos inflamatórios. Este relato descreve o aparecimento de uma alteração ultrassonográfica do cordão umbilical em uma receptora de embrião, SRD, plurípara, de 10 anos, associado com RCIU. Aos 120 dias de gestação, o exame ultrassonográfico transretal revelou uma formação cística arredondada, com 68 mm de diâmetro, conteúdo anecoico, no interior do cordão umbilical, além de biometria fetal abaixo do esperado para a idade gestacional: aorta, avaliada na porção mais proximal ao coração, em sístole, 4,8 mm (valor de referência para a idade: 5,4 mm) e diâmetro de órbita ocular, 13 mm (referência: 16 mm). Instituiu-se tratamento com AAS tamponado manipulado (5g, BID, via oral) e suplementação com óleo de linhaça (100mL/dia, na ração) mantidos até o final da gestação. Aos 150 dias de gestação, a formação cística se encontrava igual à avaliação anterior e as medidas de aorta (6,9 mm, referência: 7,8 mm), e JUP (4,2 mm, referência: 4-7 a 5 mm) abaixo do normal, porém a órbita ocular estava no limite mínimo para a idade (17 mm). Aos 180 dias, as medidas se aproximaram da normalidade (aorta 12 mm, referência 11,1; órbita 25 mm, igual a referência; JUP 5,7 mm, referência 4,7 a 5 mm) e não foi possível observar a estrutura anormal. A gestação progrediu sem intercorrências. Durante o parto, o potro estava eutócico, porém, na segunda fase, após 20 minutos de contração sem progressão com o potro insinuado, optou-se por realização de tração manual, com sucesso. O líquido amniótico apresentava mecônio e houve delivramento de lóquios segundos após o nascimento. Nos primeiros minutos de vida, o potro não tentou se colocar em esternal, mesmo com bom tônus muscular, porém após auxílio manteve-se na posição. Aos 25 minutos, não mostrou reflexo de sucção, mesmo quando estimulado e não tentou se levantar, mas ao ser colocado em estação (aos 50 minutos), conseguiu se manter e se mover, mesmo apresentando contratura do tendão extensor digital comum no membro pélvico esquerdo. O potro mostrou boa atitude e respondeu bem aos estímulos. Necessitou de auxílio para mamar, recebendo colostro por mamadeira, porém, após 105 minutos de nascido, já mamava e apresentava atitudes normais. Na avaliação macroscópica dos anexos fetais observou-se espessamento e aumento da translucidez do âmnio, com vasos sanguíneos severamente aparentes e ingurgitados. O cordão umbilical apresentava múltiplos focos de coloração variando do vermelho ao roxo, e seus vasos sanguíneos encontravam-se ingurgitados. A estrutura anecoica evidenciada durante a gestação não foi encontrada, sugerindo que pudesse se tratar de um cisto umbilical e/ou distensão da região do útero, por torção parcial do cordão umbilical. O potro se desenvolveu normalmente. Este relato de caso destaca a importância do monitoramento ultrassonográfico gestacional e da avaliação cuidadosa do neonato e dos anexos fetais.

**Palavras-chave:** restrição de crescimento intrauterino, cordão umbilical, ácido acetilsalicílico.

**Keywords:** intrauterine growth restriction, umbilical cord, acetylsalicylic acid.

## **Peritonite associada a laceração vaginal em égua com distocia fetal submetida a fetotomia** *Peritonitis related to vaginal lesion in a mare with fetal dystocia undergoing fetotomy*

**Catherine Peixoto Cavalcante<sup>1\*</sup>, Hugo Fernandes de Almeida<sup>2</sup>, Estela de Aquino Oliveira<sup>3</sup>, Luiz Eduardo Vieira Leite<sup>2</sup>, Eider Edoardo Saldanha Leandro<sup>3</sup>, Alexandre Augusto Cerqueira Tinoco<sup>3</sup>, Márcia Costa Rocha<sup>3</sup>,  
Conrado Silva Delcin<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Discente Medicina Veterinária - Universidade Federal da Bahia; <sup>2</sup>Tríplice Performance, Pojuca, BA, Brasil; <sup>3</sup>Clínica do Rancho, Camaçari, BA, Brasil

\*E-mail: catherinecavalcante16@gmail.com

Partos distócicos são ocorrências raras na espécie equina, devido às particularidades anatômicas, e, comumente ocorrem devido à fatores maternos ou fetais, ocasionando complicações como as lacerações do trato reprodutivo. Casos de lacerações com consequentes peritonites possuem o prognóstico reservado devido ao alto risco de sepse. Este relato objetiva-se descrever o caso de uma égua da raça mangalarga marchador, com 5 anos de idade que foi atendida primeiramente pela equipe médica na propriedade com parto distócico, no qual o feto encontrava-se sem sinais vitais, com apresentação longitudinal anterior, postura de flexão do carpo bilateral, e desvio lateral da cabeça. Dessa forma, a melhor abordagem do caso deu-se com a realização da fetotomia, procedimento mais indicado em casos de feto sem sinais vitais, desde que seu posicionamento permita o acesso adequado. Com a paciente em sedação com detomidina (20µg/kg), e anestesia epidural com lidocaína à 2% (0,2mg/kg), foi realizado o procedimento. A eliminação por completa da placenta, foi observada após 1 hora do procedimento. O tratamento foi baseado em terapia com flunixin meglumina (1,1mg/kg/IV), Dimetilsufóxido (1g/kg/IV) em solução a 10%, Ceftiofur (2,2mg/kg/IM), Gentamicina (6,6mg/kg/IV), no qual a paciente se manteve estável por 7 dias, e sem outras alterações clínicas. No entanto, ao final do tratamento, apresentou apatia e perda de apetite. O exame físico revelou FC 56bpm, FR 42mpm, respiração costo-abdominal, temperatura 39°C, levemente desidratada em torno do 8%, secreção vaginal, e movimentava-se com dificuldade nos membros posteriores. Na palpação e na ultrassonografia transretal, o útero apresentava-se sem conteúdo e levemente edemaciado. Na inspeção e palpação transvaginal, identificou-se laceração significativa nas paredes dorsal e lateral direita da vagina. O líquido peritoneal apresentava coloração amarelo ouro e densidade aumentada, indicando suspeita de peritonite secundária a laceração vaginal. Após a reposição da hidratação inicial na propriedade, a paciente foi encaminhada ao centro médico veterinário. Ao dar entrada, demonstrava abdômen pouco rígido, FC 80bpm, FR 72mpm, mucosas congestionadas, TPC 2", e hipomotilidade intestinal. Ao exame do líquido peritoneal, observou-se proteínas totais de 5,6g/dl, leucocitose intensa, e no hemograma constatou hematócrito de 40%, proteínas totais 7,4g/dl, fibrinogênio 800mg/dl, leucócitos 40100mm<sup>3</sup>. A ultrassonografia transabdominal confirmou a presença de líquido livre com intensa celularidade e fibrina na cavidade abdominal. O plano terapêutico foi instituído a partir da diálise peritoneal, utilizando uma sonda de foley, com 10 litros de soro ozonizado durante 3 dias, e instituiu-se nova terapia com gentamicina (6,6mg/kg/IV), e metronidazol (15mg/kg/IV). Para a laceração vaginal, foram efetuados curativos duas vezes ao dia para estimular a cicatrização por segunda intenção. A paciente obteve alta após oito dias de internação, com os resultados dos exames laboratoriais dentro dos valores de referência e quadro clínico estabilizado. Conclui-se que, casos de distocia gestacional equina podem ocasionar em graves complicações, mas que com o acompanhamento gestacional, e a intervenção correta em tempo ágil, podem ser revertidas sem causar danos a vida reprodutiva.

**Palavras-chave:** Parto distócico, trauma reprodutivo, infecção abdominal.

**Keywords:** Dystocic birth, reproductive trauma, abdominal infection.

## Stallion sperm motility after incubation with umbilical cord mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles

*Efeito de vesículas extracelulares derivadas de células estromais mesenquimais do cordão umbilical equino na motilidade espermática de garanhões*

**Thais De Araujo<sup>\*1</sup>, Julissa Andrea Ramírez Orozco<sup>1</sup>, Victoria Kanadani Campos Poltronieri<sup>1</sup>, Yonara Poltronieri Neves<sup>2</sup>, Natan Dias De Oliveira<sup>1</sup>, Emily Correna Carlo Reis<sup>1</sup>, José Domingos Guimarães<sup>1</sup>, Simone Eliza Facioni Guimarães<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, <sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Viçosa, MG

\*E-mail: thais.a.araujo@ufv.br

A sperm's ability to fertilize an oocyte depends on key characteristics, such as active energy-producing metabolism and progressive motility. For this reason, assessing sperm motility is crucial for selecting ejaculates, with the determination of the percentage of motile sperm being the most commonly used test to predict semen quality. Recent studies suggest that adding extracellular vesicles (EVs) derived from different cell sources to semen can modify the composition and biological function of the sperm cell. Therefore, this study aimed to evaluate the impact of adding EVs derived from equine umbilical cord perivascular mesenchymal stromal cells (ePMSCs) on sperm motility over time, seeking to elucidate their potential as an alternative for improving semen quality. EVs were collected from the expanded ePMSCs by ultracentrifugation, and their characteristics were confirmed by nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy. Fresh semen from four Mangalarga Marchador stallions was obtained. Immediately post-collection, semen from each stallion was filtered, diluted 1:1 with BotuSêmen® (Botupharma), and centrifuged at 600×g for 10 minutes. The sperm pellet was resuspended in BotuSêmen® to a concentration of  $100 \times 10^6$  sperm/mL. Treatment groups were then established as follows: G1 received  $400 \times 10^6$  EVs/mL, G2 received  $800 \times 10^6$  EVs/mL, and G3 served as the control (no EVs added). The effects of these EVs concentrations were evaluated after incubation periods of 1, 2, 3, and 4 hours. Sperm motility and vigor for each sample were assessed by at least two independent evaluators using optical microscopy at 200x magnification. All treatments were performed in duplicate. The experiment followed a split-plot design over time, with treatments (1, 2, and 3) assigned to the main plots and evaluation intervals (0, 1, 2, 3, and 4 hours) assigned to the subplots. The design was completely randomized with eight replicates. No significant differences in sperm motility or vigor were found between treatment groups at 1, 2, and 3 hours of incubation ( $p > 0.05$ ). After 4 hours, a statistically significant increase in total sperm motility was observed in the group treated with  $800 \times 10^6$  EVs/mL. The improvement in sperm motility associated with EV treatment suggests that these vesicles may act beneficially in preserving the structural and functional integrity of sperm, possibly through mechanisms of membrane stabilization or transfer of bioactive factors, such as lipids, microRNAs and proteins. The highest concentration of EVs (G2) resulted in a more pronounced effect, indicating a possible dose-response relationship. The findings of this study highlight the potential of ePMSCs-derived EVs as a promising tool for equine reproductive biotechnology, with potential applications in semen preservation protocols or improving sperm quality for artificial insemination. However, further research is needed to elucidate the mechanisms by which EVs influence sperm motility and to evaluate their impact on in vivo fertility.

**Keywords:** fertility, reproductive biotechnologies, semen.

**Palavras-chave:** fertilidade, biotecnologias reprodutivas, sêmen.

**Agradecimentos:** CAPES – Finance code 001, CNPq e FAPEMIG

## Protamina 1, 2: Indicadores de fertilidade em garanhões

*Protamine 1, 2: Indicators of fertility in stallions*

**Marília Marcolla de Figueiredo<sup>1,\*</sup>, Verônica La Cruz Bueno<sup>1,2</sup>, Isabelle Colla Lazzari Royes<sup>1</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>, Henrique Boll de Araujo Bastos<sup>1</sup>, Sandra Fiala Rechsteiner<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. <sup>2</sup>Histologia e Reprodução Equina (HISTOREP), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

\*E-mail: mariliafigueiredo.vet@gmail.com

A investigação dos genes ligados à reprodução e a análise de suas funções ampliam o entendimento sobre os mecanismos moleculares que regulam a espermatogênese, o processo de fertilização, as primeiras divisões embrionárias, a qualidade dos espermatozoides e as causas da infertilidade em garanhões. O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão dos genes *PRM1* e *PRM2* nos espermatozoides de garanhões Crioulos e sua relação com a fertilidade. Dezoito garanhões foram divididos em dois grupos: férteis (taxa de prenhez por ciclo  $\geq 70\%$ ) e subférteis (taxa de prenhez por ciclo  $\leq 40\%$ ). A coleta de sêmen foi realizada utilizando vagina artificial, e as amostras foram enviadas para o laboratório para a análise do sistema CASA AndroVision® e para o estudo molecular. O mRNA foi extraído dos espermatozoides e analisado por qPCR, com os níveis de expressão gênica normalizados pelo gene  $\beta$ -actina. Os resultados revelaram maior expressão de *PRM1* nos garanhões férteis em comparação aos subférteis. O gene *PRM2* não apresentou diferenças significativas entre os grupos avaliados. A razão *PRM1/PRM2* mostrou uma correlação negativa com a fertilidade. Este estudo destaca a importância dos genes *PRM1* e *PRM2* como potenciais biomarcadores para avaliação da fertilidade em garanhões. A aplicação desses biomarcadores pode auxiliar na identificação de indivíduos subférteis, contribuindo para programas de seleção reprodutiva e seleção genética. Essas alterações na expressão da protamina possuem origem na espermatogênese, uma vez que o mRNA da protamina é produzido durante esse processo. Desequilíbrios na razão *PRM1/PRM2* podem ser usados como indicativo de defeitos na compactação do DNA espermático, com impactos diretos na capacidade de fecundação dos espermatozoides. Concluímos que a expressão de Protamina 1 está relacionada com índices de fertilidade do garanhão e que a razão *PRM1/PRM2* apresenta correlação negativa com a fertilidade. Sugerimos que o *PRM1* e a razão *PRM1/PRM2* são potenciais biomarcadores para espécie equina e podem ser utilizados como ferramenta auxiliar no manejo reprodutivo de garanhões, reduzindo perdas econômicas e promovendo avanços na eficiência reprodutiva.

**Palavras-chave:** *PRM1*, *PRM2*, fertilidade.

**Keywords:** *PRM1*, *PRM2*, fertility.

## Therapeutic abortion in a mini horse mare after fetal death: case report

*Aborto terapêutico em égua Mini Horse após morte fetal: relato de caso*

Thaini Barbosa Costa<sup>1</sup>, Mirian Rodrigues<sup>2</sup>, Bruna Monique de Souza Ascencio<sup>1</sup>, Gabriel Remeli Santana<sup>3</sup>,  
Felipe Rydygier de Ruediger<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Veterinary Medicine Improvement, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil;

<sup>2</sup> Veterinary Medicine Professor, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil;

<sup>3</sup> Veterinary Medicine Student, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

\*E-mail: f\_rydygier@hotmail.com

A 3-year-old Mini Horse mare, approximately 180 days pregnant, was found trapped in a fence at dawn. After being freed, she began exhibiting physical discomfort, such as rolling and repeatedly lying down. Clinical examination revealed tachycardia (64 BPM), tachypnea (40 breaths per minute), hypothermia (34.8°C), and dehydration (5%), in addition to fluid loss through the vulva. Blood samples were collected for hematology, biochemistry (hepatic, renal, and muscular), and an electrolyte panel (Na, K, and Ca). The results showed elevated levels of CPK (1625.8 U/L), AST (332.1 U/L), urea (64.9 mg/dL), and lactate (24.17 mg/dL), while only calcium (1.38 mmol/L) was below the reference value. The mare was placed in a closed stall with a heater, and fluid therapy was initiated using lactated Ringer's solution warmed to 37°C. Additionally, the non-steroidal anti-inflammatory drug Flunixin Meglumine was administered at a dose of 1.1 mg/kg for analgesia. After stabilizing the mare, an abdominal ultrasound was performed to assess fetal viability. The examination revealed an absence of fetal movements and cardiac activity. A vaginal speculum was then used to evaluate fluid loss and cervical integrity, revealing an open cervix, exposed placenta, and loss of allantoic fluid, making the continuation of the pregnancy unviable. Based on these findings, the decision was made to induce labor. The induction protocol used included Estradiol Benzoate (5 mg/animal, IM) and Lutalyse® (Dinoprost, 10 mg/animal, IM) at 5:40 PM. The mare was monitored throughout the night with physical exams every two hours. Due to the administered medications, she exhibited discomfort and abdominal contractions, with continuous fluid loss from the vulva. At 5:40 AM the next day, 12 hours later, the protocol was repeated, and at 8:04 AM, labor began, lasting 19 minutes, with placental expulsion occurring within 20 minutes. Examination of the fetus and placenta revealed an umbilical cord torsion with edema along its perimeter. A few hours after delivery, a blood sample was collected, showing elevated CPK and AST levels. Prophylactic antibiotic therapy with Ceftiofur (4 mg/kg, IM) was initiated for five days. On the final day of treatment, new tests were performed, and the mare was clinically stable.

**Palavras-chave:** parto; obstetria; equinos; acompanhamento gestacional.

**Keywords:** labor; obstetrics; equines; gestational monitoring.