



## **A importância do manejo nutricional em novilhas Nelore submetidas a protocolos de indução de puberdade e IATF**

*The importance of nutritional management in Nelore heifers submitted to puberty induction protocols and IATF*

**Raphaella Gabrielle Brito Sousa<sup>1,\*</sup>, Valéria Aparecida Caobianco Sant'ana<sup>2</sup>, Thais Rose dos Santos Hamilton<sup>2</sup>, Diego Barbuzano de Andrade<sup>1</sup>, Avelino Velloso Ferreira Murta<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos do 5º ano de Medicina Veterinária, Centro Universitário Monte Serrat, Santos, SP, Brasil; <sup>2</sup>Professoras do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Monte Serrat, Santos, SP, Brasil; <sup>3</sup>Médico Veterinário, autônomo.

\*E-mail: raphaelamedvet@gmail.com

A produção de carne bovina é de extrema importância para a economia brasileira, sendo assim deve-se impulsionar este mercado através de biotecnologias, aumentando assim a produção, cria e recria, peso e intervalo entre partos. A eficiência econômica da pecuária de corte está vinculada diretamente à produção de bezerras, sendo que estes estão destinados à produção de carne ou reposição do rebanho. Dentro dos fatores que interferem diretamente na produção está o manejo nutricional, que vem de encontro aos índices satisfatórios e desejáveis dentro de uma propriedade além de técnicas para antecipar puberdade e melhorar as taxas de prenhez a fim de garantir mais bezerras na da propriedade, com as taxas de recria aumentadas. Para a obtenção de resultados reprodutivos satisfatórios faz-se necessária a associação de fatores envolvendo manejo, sanidade, nutrição e genética. Este trabalho teve como objetivo descrever a importância do manejo nutricional em novilhas submetidas a protocolo de indução de puberdade e IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo). Os dados analisados são provenientes de uma propriedade localizada em Minas Gerais, que tem como atividade principal a produção de animais para corte (cria e recria), os animais avaliados foram da raça nelore, com idades ente 14 e 24 meses, escore corporal entre 2,5 e 3,0 segundo a escala biológica. A partir de uma avaliação ultrassonográfica transretal, as novilhas foram avaliadas conforme suas características morfológicas de útero e ovário. Foram feitas as avaliações de 526 animais, sendo no grupo A com 252 novilhas em protocolo de indução e o grupo B com 274 novilhas já haviam sido avaliadas, induzidas. O grupo A permanecia ao manejo no piquete de Tifton, com disponibilidade de sal mineral e água distribuída pelo pasto. Destas novilhas que foram induzidas, 32% responderam positivamente ao protocolo. O grupo B permanecia no confinamento, composto com coxos de silagem, ração, suplementação mineral e água, feito o balanço nutricional adequado, além de serem refrigeradas com água no horário de maior incidência solar. Destas novilhas obtivemos a taxa de prenhez em 61,5%. Para relacionarmos o manejo nutricional dos animais com a resposta aos protocolos de indução de puberdade e IATF, devemos levar em consideração o protocolo utilizado, os agentes estressores e principalmente o manejo nutricional. Visto que animais de uma mesma categoria, submetidas aos mesmos agentes estressores térmicos, com diferentes manejos nutricionais tiveram respostas diferentes ao mesmo protocolo, grupo A com 32% e grupo B com 61,5%. Sendo assim, o manejo nutricional, interfere de forma direta no sucesso reprodutivo afetando assim, o rendimento destes animais e retorno lucrativo dentro da propriedade, diminuindo então, os intervalos entre partos e aumentando o número de novilhas aptas para a reprodução.

**Palavras-chave:** nutrição, indução de puberdade, IATF, novilha.

**Keywords:** *nutrition, puberty induction, IATF, heifer.*



## **A influência da ciclicidade ovariana, do escore de condição corporal e dos dias abertos pós-parto sobre a taxa final de prenhez em vacas de corte submetidas a inseminação em tempo fixo (IATF) sob diferentes protocolos**

*The influence of ovarian cyclicity, body condition score and post-partum period in the final pregnancy rate in beef cows submitted to fixed time artificial insemination (FTAI) under different protocols*

**Louise Helene Bacher<sup>2\*</sup>, Isabella Sellmer Ramos<sup>2</sup>, André Bastos de Souza<sup>1</sup>, Marcio Saptorski Segui<sup>2</sup>, Francisco Romano Gaievski<sup>2</sup>, Rafaela Talini<sup>2</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>2</sup>, Ana Paula Kaminski<sup>2</sup>, Emanuel da Silveira Faleiros<sup>2</sup>, Romildo Romualdo Weiss<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>VetMax Consultoria Agropecuária; <sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus de Curitiba, PR, Brasil;

<sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná, Campus Curitiba, PR, Brasil.

\*E-mail: louisebacher@gmail.com

O intervalo entre partos de um bezerro/ano é considerado o ideal. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da ciclicidade ovariana, da condição corporal (ECC) e de “dias abertos” pós-parto sobre a taxa de prenhez final. Quinhentas e trinta e quatro vacas foram distribuídas em três grupos L1 (225), L2 (139) e L3 (170) e submetidas a diferentes protocolos de IATF, Inseminação Artificial Convencional (IA) e Monta Natural. O protocolo utilizado em L1 foi: d0(dia 0): P4 (1,5g de progesterona longa-ação)+BE(2mg); d8: -P4+PG(500mcg) +ECP(1,0 mg) +desmame temporário (DT; 48h) e d10: IATF -DT; L2: d0: P4+BE; d9: -P4+PG + ECP+ DT e d10: +IATF -DT; e em L3: d0: P4+BE; D8: -P4+PG+eCG(400UI); D9: +BE e D10: +IATF. No que diz respeito à ciclicidade ovariana verificou-se diferença ( $P<0,01$ ) para as vacas com  $> 50$  “dias abertos” (maior ciclicidade), quando comparadas às  $\leq 50$  “dias abertos”. Diferença estatística ( $P=0,03$ ) foi verificada para taxa de prenhez (TP) entre fêmeas portando  $ECC \geq 3,5$  resultando em maior TP versus as com  $ECC < 3,5$ , assim como diferença ( $P=0,04$ ) na TP geral, entre as vacas em anestro e ciclando em prol das cíclicas. A TP final nos grupos L1, L2 e L3 resultou respectivamente em 95.1%, 90.65% e 92.35% ( $P>0,05$ ). Concluiu-se que a inserção de P4 por 8 ou 9 dias resultou em idêntica TP; que a prática do DT acarreta similares TP às do uso de eCG em programas de IATF.

**Palavras-chaves:** bovinos, ciclicidade, condição corporal, Inseminação Artificial.

**Keywords:** *bovines, cyclicity, body condition, Artificial Insemination.*



## **Abordagem cirúrgica em teto de vaca devido a ocorrência de lesão traumática com perda do esfíncter: relato de caso**

*Surgical Approach In Cow's Ceiling Due To The Occurrence Of Traumatic Injury With Loss Of The Sphincter: Case Report*

**Lucas Troncarelli Rodrigues<sup>1\*</sup>, Antonio Fernando Leis Filho<sup>1</sup>, Felipe Erison Medrado Rocha de Sousa<sup>1</sup>, Lucas Emanuel Ferreira Canuto<sup>1</sup>, Patrícia de Faria Lainetti<sup>1</sup>, Roberto Rodrigues da Rosa Filho<sup>1</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>2</sup>, Nereu Carlos Prestes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Residentes em Fisiopatologia da Reprodução e Obstetrícia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP/FMVZ Botucatu, SP, Brasil; <sup>2</sup>Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP/FMVZ, Botucatu, SP, Brasil.

\*E-mail: lucastroncarellirodrigues@gmail.com

O úbere dos bovinos constitui-se de quatro glândulas anatomicamente independentes preenchidos por parênquima glandular, ductos galactóforos e tecido conjuntivo, localizado na região inguinal. As lesões do úbere e tetos são mais frequentes em gado leiteiro, estando relacionadas majoritariamente por ações mecânicas. Condições impróprias de manejo, estábulos inadequados, superlotação de animais, falta de cuidado com os cascos, tetos pendulosos e pastagens mal cuidadas pela presença de arbustos, metais ou outros elementos predisponentes propiciam a ocorrência de lesões, interferindo diretamente na produção de leite e em alguns casos, comprometendo a funcionalidade total ou parcial da glândula mamária. Dependendo da extensão e grau das lesões do úbere e dos tetos podem manifestar-se de forma superficial, profundas, lacerantes ou perfuro cortantes, associado ou não a mastite do(s) quarto (s) afetados. O tratamento dos ferimentos do úbere e tetos, preconizados na literatura podem ser de forma conservativa ou cirúrgica. O objetivo é relatar um caso clínico de uma vaca, da raça Gir PO, de 3 anos, pesando 400 kg, atendida em Janeiro de 2017 no serviço de grandes animais da área de Reprodução Animal da FMVZ, Botucatu, apresentando histórico de pós-parto imediato e lesão de teto posterior esquerdo com menos de 10 horas de evolução, causado pelo pisoteio de outro animal do mesmo lote. Ao exame clínico específico da glândula mamária notou-se aumento de volume, inflamação local, aumento de temperatura e lesão lacerante e perfurante envolvendo o teto e perda da sua cisterna. Não havendo possibilidade de reconstituição cirúrgica optou-se pela amputação do teto com o intuito de torna-lo afuncional. O animal foi contido em tronco, procedeu-se a higienização do local e adjacências, rigorosa antisepsia com iododegermante e álcool. Aplicou-se um garrote utilizando uma fita de látex na base do teto e procedeu-se anestesia local infiltrativa com lidocaína® 2%. Segundo a técnica clássica a amputação foi realizada removendo-se 70% do teto. Procedeu-se três padrões de sutura: na mucosa da cisterna do teto aplicou-se padrão contínuo com vicryl 2; subcutâneo em padrão sultan (vicryl 2), e pele com pontos separados em U horizontal com supramid® 3. O pós-operatório consistiu na administração de penicilina benzatina 30.000 UI/kg/IM cada 48 horas totalizando 4 aplicações, flunixin meglumine 2,2 mg/kg/IV/SID, durante 3 dias, ordenha dos outros quartos uma vez ao dia e curativo local duas vezes ao dia utilizando-se de água, iododegermante e iodo tópico. Após três dias o animal recebeu alta por solicitação do proprietário e foi recomendada a continuidade do tratamento conforme descrito acima e a retirada dos pontos externos 10 dias após o procedimento.

**Palavras-chave:** Laceração total de teto, vaca, perda do esfíncter, ablação cirúrgica.

**Keywords:** *Laceration total ceiling, cow, loss of sphincter, surgical ablation.*



## **Ação da Prostaglandina F2 $\alpha$ como indutor de ovulação em vacas de corte submetidas a protocolos de IATF**

*Action of Prostaglandin F2 $\alpha$  as ovulation inducer in beef cows subjected the FTAI protocols*

**Walvonvitis Baes Rodrigues<sup>1\*</sup>, Jean do Prado Jara<sup>2</sup>, Juliana Correa Borges<sup>1</sup>, Luiz Orcirio Fialho de Oliveira<sup>1</sup>, Urbano Pinto Gomes de Abreu<sup>1</sup>, Karine Casanova da Silva<sup>3</sup>, Nathália Albaneze Anache<sup>3</sup>, Alexandre Bezerra de Oliveira<sup>3</sup>, Christopher Junior Tavares Cardoso<sup>3</sup>, Eriklis Nogueira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>2</sup>Uniderp Anhanguera, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

\*E-mail: witis@uol.com.br

A prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) é uma substância biologicamente potente com diversas aplicações no controle da reprodução. Em bovinos, é usada por sua propriedade luteolítica, indutora de por melhorar o ambiente uterino para o desenvolvimento da concepção inicial. Estudos recentes suportam a hipótese que a PGF, durante a fase de crescimento tardia do folículo dominante, pode resultar na ovulação, por um mecanismo independente de luteólise, ou seja, na ausência de um CL. O uso da PGF reduz os custos dos protocolos e traz uma nova alternativa especialmente em países onde o uso de estradiol é proibida. Além do efeito central descrito anteriormente, PGF parece desempenhar um papel local no ovário, agindo diretamente no folículo dominante. Assim, pode-se considerar o fato de a PGF atuar de duas formas distintas, agindo sobre os receptores de GnRH presentes na hipófise e também de forma direta nas células do folículo pré-ovulatório. Assim, o uso da PGF torna-se uma boa alternativa, não só pelas suas potenciais propriedades farmacológicas, como pelas limitações de outros fármacos usados na IATF. O experimento foi realizado na Fazenda Primavera, localizada no Município de Rochedo, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Os animais foram manejados em pastagens de brizantão (*Brachiaria brizantha*) dividida em vários piquetes de 25 a 30 hectares, em sistema rotacionado contínuo, mantendo-se uma média de 1 a 1,5 UA/ha/ano. Forneceu-se mistura mineral à vontade em cocho coberto. Foram inseminadas em tempo fixo, com protocolo combinado que incluía implante vaginal de progesterona mais aplicação de benzoato de estradiol, prostaglandina, cipionato de estradiol e eCG, 307 vacas, divididas em 3 tratamentos, grupo 1 com 103 vacas, grupo 2 com 100 vacas e o grupo 3 com 104 vacas, paridas com bezerros de 35 – 55 dias de idade. Os três grupos foram submetidos a implante de progesterona (Sincrogest®) + 2 ml de benzoato de estradiol (Estrogin®) no dia 0 (d0). No oitavo dia (d8), retirada de implante em todos os grupos, seguindo: T1 = Retirada implante + 2 ml Prostaglandina muscular (Prolise®) + 0,5 ml Cipionato de Estradiol (ECP®) + 1,5 ml eCG (Novormon®). T2 = retirada do implante + 2 ml Prostaglandina muscular (Prolise®) + 2 ml prostaglandina subcutânea atrás da escapula (Prolise®) + 0,5 ml Cipionato de Estradiol (ECP®) + 1,5 ml eCG (Novormon®). T3 = Retirada implante + 2 ml Prostaglandina muscular (Prolise®) + 0,5 ml Cipionato de Estradiol (ECP®) + 1,5 ml eCG (Novormon®), no dia 9 (d9) aplicação de 2 ml de prostaglandina intramuscular (Prolise®) no lote 3. Todas as matrizes foram inseminadas no décimo dia (d10), a partir das 8 horas da manhã. Ainda na inseminação, classificou-se a intensidade da manifestação de cios, de acordo com a pintura do osso sacro, em tinta 1, 2 e 3, sendo tinta 1 ausência total de cios, tinta 2 fraca intensidade de cio e tinta 3 alta intensidade de manifestação de cio. A taxa de prenhez média dos 3 tratamentos foi de 53,4%. Não houve efeito significativo entre os tratamentos, (T1 = 55,3%, T2 = 52,0% e T3 = 52,8%). Quanto a intensidade de manifestação de cios, houve efeito significativo da Tinta 1 (44%) quando comparadas as tintas 2 (56,5%) e 3 (59,6%). Conclui-se que prostaglandinas podem ser utilizadas como indutor de ovulação em vacas de corte submetidas a IATF, tanto em 3 como em 4 manejos.

**Palavras-chaves:** inseminação artificial em tempo fixo (IATF), prostaglandina F2 $\alpha$ , indução da ovulação.



## **Acurácia de diferentes formas de diagnóstico de gestação precoce em bovinos por ultrassonografia**

*Accuracy of different methods of early pregnancy diagnosis in bovine by ultrasonography*

**Jéssica Ruiz Pereira<sup>1\*</sup>, João Paulo de Andrade Guimarães<sup>2</sup>, Ana Cristina Silva de Figueiredo<sup>3</sup>, Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>4</sup>, Jairo Pereira Neves<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda do Curso de Med. Vet da Unifenas, Alfenas, MG, Brasil, bolsista PIBIC; <sup>2</sup>Mestrando Reprodução Sanidade e Bem estar Animal, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil; <sup>3</sup>Doutoranda Reprodução Sanidade e Bem estar Animal, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil; <sup>4</sup>Professores do Programa de Pós Graduação em Reprodução Sanidade e Bem estar Animal, Unifenas, Alfenas, MG.

\*E-mail: jessicaruiz2@hotmail.com

O emprego da ultrassonografia no diagnóstico de gestação tem sido uma ferramenta indispensável para o bom desempenho reprodutivo. O diagnóstico de gestação via ultrassonografia permite detectar precocemente qual fêmea não está gestante e tomar uma decisão que permita torná-la gestante mais rápido possível, reduzindo assim o tempo que estes animais permanecem não gestantes. Existem duas formas de diagnóstico de gestação por ultrassonografia: A primeira seria pela tradicional visualização do feto e batimento cardíaco e a segunda pela constatação da vesícula amniótica, caracterizada por presença de conteúdo totalmente anecóico e bordo uterino distendido, sinais considerados patognomônicos de gestação em bovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia e o tempo de execução destas duas formas de diagnóstico precoce de gestação por ultrassonografia em bovinos. Foram avaliadas 674 fêmeas bovinas mestiças utilizadas como receptoras de embrião em uma mesma propriedade rural, localizada no sul de Minas Gerais. Estas foram distribuídas de forma aleatória em dois tratamentos: T1 (N=351), diagnóstico pela detecção da vesícula amniótica e T2 (n=323), pela visualização do feto e batimento cardíaco. Todos os animais se encontravam entre 28 e 32 dias de gestação. Foi utilizado um mesmo equipamento para as duas formas de diagnóstico (Mindray™ M5) com uma transdutor transretal de 5 MHz. O tempo de execução de cada exame foi calculado utilizando-se um cronômetro digital. As fêmeas gestantes em ambos os exames foram novamente avaliadas por ultrassonografia considerando as características da vesícula e presença do feto, 30 dias mais tarde. Os dados foram avaliados por Anova. As diferenças no percentual de fêmeas gestantes entre 30 e 60 foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Considerou-se significância, diferenças superiores a 5% de probabilidade. A taxa de gestação total inicial foi de 49,40% (333/674), das quais 172 consideradas gestantes utilizando o T1 e 161, utilizando o T2. A diferença entre o total de vacas gestantes entre 30 e 60 dias foi de 5,70% e 5,88% para T1 e T2, respectivamente ( $P > 0,05$ ), mostrando que os dois métodos tem a mesma eficiência de acurácia para diagnóstico de gestação aos 30 dias. O tempo médio de execução do diagnóstico foi menor ( $P < 0,05$ ) em T1 que T2 ( $0,5 \pm 0,3$  vs  $1,8 \pm 1,6$  minutos). Conclui-se as duas técnicas, de diagnóstico precoce de gestação, tem a mesma acurácia aos 30 dias. Como o tempo de manipulação da fêmea é menor em T1, este é o método mais indicado.

**Palavras chaves:** bovino, Ultrassonografia, diagnóstico de gestação.

**Keywords:** bovine, ultrasonography, pregnancy diagnostic.

**Agradecimento:** Fapemig, Capes e CNPq.



## **Administração de eCG em protocolo de sincronização de ovulação não influencia o desenvolvimento do folículo ovulatório em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) induzidas à puberdade**

*Ovulatory follicle development is not influenced by eCG administration in Nelore heifers (*Bos taurus indicus*) submitted to protocols to induce puberty*

**Paulo Henrique Alves Marinho<sup>1,\*</sup>, Laís Reis Carvalho<sup>1</sup>, Lucas Oliveira e Silva<sup>2</sup>, Bruna Conrado Nunes Santos<sup>3</sup>, João Bosco Barreto Filho<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos do 5º período de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; <sup>3</sup>Graduanda do de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, <sup>4</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

\*E-mail: paulo\_h\_alves@hotmail.com; barreto@dmv.ufla.br

Protocolos hormonais com uso de implantes intravaginais de progesterona para indução de puberdade em novilhas têm apresentado resultados promissores, pois este hormônio é capaz de estimular a atividade ovariana cíclica. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da administração da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no desenvolvimento do folículo ovulatório em novilhas previamente submetidas a protocolo de indução de puberdade utilizando-se implantes intravaginais de progesterona. Foram utilizadas trinta e uma novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade média de  $24 \pm 0,6$  meses, peso médio de  $339 \pm 39$  kg e escore de condição corporal 2,75 (escala de 1-5). Todos os animais foram inicialmente induzidos à puberdade com o uso de dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) de quarto uso, por doze dias. No momento da retirada do dispositivo foi administrado cipionato de estradiol (SincroCP, Ouro Fino, Brasil; 0,5 mg - IM). Após doze dias (D0) iniciou-se um protocolo de sincronização de ovulação em todos os animais, com administração de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil; 2,0 mg - IM) juntamente com o uso do dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) de segundo uso, que permaneceu por oito dias nos animais. No D8, foi retirado o dispositivo intravaginal e administrados cloprostenol sódico (SincroCio, Ouro Fino, Brasil; 1,5 mg - IM) e cipionato de estradiol (1,0 mg - IM). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (n=16) sem administração de eCG, e grupo eCG (n=15), com administração de eCG (Folligon, Intervet, Brasil; 200 UI - IM). A inseminação artificial (IA) foi realizada 48 horas após a retirada do implante intravaginal de progesterona. No D10, anteriormente a IA foram mensurados os tamanhos dos folículos pré-ovulatórios de todos os animais, com auxílio de ultrassonografia (Pie Medical modelo Falco Esoate 100 e transdutor linear com frequência de 5 a 7 MHz). As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* SAS 9.3, utilizando-se o teste F para comparar as médias. O diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios foi de  $9,52 \pm 1,90$  mm e  $9,37 \pm 1,70$  mm de diâmetro no grupo controle e no grupo eCG, respectivamente (p=0,83). Portanto, o uso de eCG no protocolo de IATF realizado não influenciou significativamente o diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios em novilhas da raça Nelore induzidas à puberdade com dispositivos intravaginais de progesterona.

**Palavras-chave:** diâmetro folicular, puberdade, novilha.

**Keywords:** follicular diameter, puberty, heifer.



## **Análise lipídica do sêmen de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) com alta e baixa resistência à criopreservação**

Lipid analysis of semen from Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) with high and low resistance to cryopreservation

**Mariana Furtado Zorzetto<sup>1\*</sup>, Erika Aline Ribeiro Dias<sup>2</sup>, Fabio Morato Monteiro<sup>2</sup>, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua<sup>1</sup>, Claudia Cristina Paro de Paz<sup>2</sup>, Edson Guimarães Lo Turco<sup>3</sup>, Thaís Regiani Cataldi<sup>4</sup>, Gabriel Augusto Monteiro<sup>5</sup>, Fabiana Ferreira de Souza<sup>1</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>1</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, SP, Brasil; <sup>2</sup>Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, SP, Brasil; <sup>3</sup> Departamento de Cirurgia, Divisão de Urologia, Seção Reprodução Humana, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil;

<sup>4</sup>Especialista em espectrometria de massas do Laboratório Max Feffer Genética de plantas, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil;

<sup>5</sup>Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*E-mail: mary-zorze@hotmail.com

A composição lipídica dos espermatozoides é um dos fatores que pode interferir na criotolerância espermática em várias espécies. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar o perfil lipídico do ejaculado de touros Nelore sensíveis e resistentes aos danos decorrentes da criopreservação. Foram realizadas colheitas de sêmen utilizando eletroejaculador em 15 touros da raça Nelore, após a colheita foram realizadas a análise computadorizada de cinética espermática (CASA) e avaliação da integridade da membrana plasmática (microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo, apenas pós-congelamento) no sêmen fresco e pós-descongelamento. Os animais foram separados em dois grupos de acordo com as suas qualidades espermáticas e utilizando o intervalo de confiança feito pelo SAS: grupo A, touros com baixa resistência a criopreservação do sêmen (n=6), os quais apresentam motilidade total e integridade de membrana plasmática < 30% após a descongelamento e grupo B, touros com alta resistência a criopreservação do sêmen (n=9), apresentando motilidade total e integridade de membrana plasmática > 50% após a descongelamento. O perfil lipídico do ejaculado foi realizado pós-descongelamento pela análise de espectrometria de massa (MALDI-MS). Os dados de cinética espermática e integridade da membrana plasmática foram submetidos à análise estatística pelo PROC MIXED (SAS INST., INC, Cary, NC), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, já os dados do perfil lipídico dos espermatozoides foram analisados utilizando o Software MetaboAnalyst 2.0. Na análise MALDI-MS foi observado diferença no perfil lipídico do ejaculado entre os grupos, com maior abundância relativa de íons lipídicos m/z 704,59; m/z 804,59 e m/z 943,77; no grupo A em relação ao grupo B. Portanto, os touros com baixa resistência a criopreservação apresentaram maior abundância de lipídios específicos no espermatozoide que podem estar relacionados a sua maior sensibilidade à criopreservação. Concluímos que existe diferença nos padrões lipídicos entre touros com alta e baixa resistência espermática à criopreservação.

**Palavras-chave:** sêmen, crioresistência, MALDI-MS, citometria de fluxo, bovinos.

**Keywords:** semen, cryoresistance, MALDI-MS, flow cytometry, bovine.



**Análise microscópica da região-aorta-gonadal mesonéfrica em embriões bovinos**  
*Microscopic analysis of the aorta-gonad-mesonephros region in bovine embryos*

**Ana Lúcia Jacintho Delgado<sup>1,\*†</sup>, Phelipe Oliveira Favaron<sup>2</sup>, Vanessa Cristina de Oliveira<sup>3</sup>, Ricardo Alexandre Rosa<sup>1</sup>, Leonardo Furlanetto Mançaneres<sup>1</sup>, Celina Almeida Furlanetto Mançaneres**

<sup>1</sup>Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), São João da Boa vista, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>3</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (FZEA USP), Pirassununga, Brasil.

\*E-mail: analidia.jd@gmail.com

A região aorta-gonadal-mesonéfrica (AGM) é formada durante a organogênese, onde parte da membrana interna do mesoblasto se transforma em uma estrutura axial, morfológicamente distinta, que consiste da aorta dorsal. Considerando a ausência de dados sobre a formação e desenvolvimento desta região na espécie bovina, este estudo visou caracterizar macro e microscopicamente esta região em embriões bovinos provenientes de monta natural com idades gestacionais de 24 a 40 dias - fase crítica para perdas gestacionais nesta espécie. Os embriões foram coletados e transportados para o laboratório de histologia e pesquisa da UNIFEOB- São João da Boa Vista, onde foram mensurados e processados para análise histológica. Observou-se histologicamente que a região AGM está localizada ventral ao embrião, dorsalmente a notocorda e medula espinhal. Nas laterais, esquerda e direita, visualizou-se os túbulos mesonéfricos, onde a extremidade cada túbulo se dilata, formando um cálice que se invagina. Este desenvolvimento ocorre no sentido craniocaudal. Ao final do período embrionário, todo o mesonefro, exceto seu ducto e alguns túbulos, desaparecem. Acredita-se que as células-tronco hematopoiéticas (CTH) primitivas surgem no saco vitelino, enquanto as CTH definitivas surgem na região AGM. É aparentemente as células-tronco a partir desta região que contribuem para a hematopoiese em dois períodos seguintes: darão origem ao fígado fetal, que se torna o principal órgão hematopoiético fetal e posteriormente, as células-tronco do fígado irão migrar a medula óssea, onde ocorrerá a hematopoese definitiva. Conclui-se até o momento, que a região AGM foi identificada em embriões bovinos com idade gestacional aproximada de 20 a 25 dias, através da coloração hematoxilina-eosina, o que nos concede dados a cerca dessa importante região da espécie bovina.

**Palavras-chave:** aorta-gonadal-mesonéfrica, desenvolvimento embrionário, embrião.

**Keywords:** aorta-gonad-mesonephros, embryonic development, embryo.

<sup>†</sup>Bolsista da FAPESP.



## **Análises seminais pós-descongelamento de touros Nelores suplementados com caroço de algodão**

*Post-thawed semen analyses after cotton seed diet supplementation of Nelore bulls*

**Pedro Paulo Tsuneda<sup>1,\*</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2</sup>, Joanis Tilemahos Zervoudakis<sup>2</sup>, Adriano Jorge Possamai<sup>1</sup>, Luis Eduardo Senra e Silva<sup>1</sup>, Moacir Ferreira Duarte Júnior<sup>1</sup>, Rodrigo Delbem Almeida<sup>1</sup>, Fabiana Mariani Wingert<sup>1</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>2</sup>, Bruno Silva do Espírito Santo<sup>3</sup>, Taiane dos Santos Schmidt<sup>3</sup>, Milton Pereira Leite Junior<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brasil; <sup>2</sup>Docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal– Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brasil; <sup>3</sup>Graduandos do Curso de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brasil.

\*E-mail: pedrotsuneda@hotmail.com

O caroço de algodão é um alimento rico em Ácidos Graxos Insaturados (AGI), como os ácidos linoléico (C 18:2) e oleico (C 18:1), que podem alterar a composição da membrana plasmática do espermatozoide e auxiliar na viabilidade do gameta pós-descongelamento. Porém, este co-produto apresenta em sua composição o gossipol, que pode ser deletério ao espermatozoide durante o processo de criopreservação. O objetivo do trabalho foi avaliar a suplementação da dieta com caroço de algodão (gossipol) sobre os parâmetros seminais pós-descongelamento em touros Nelores. Foram utilizados 20 animais com peso corporal médio de 472 kg e idade média de 30 meses. Os animais foram criados em sistema semi-intensivo e divididos em dois lotes (10 animais/lote), sendo fornecido 4Kg de concentrado/animal/dia. O primeiro lote recebeu dieta a base de concentrado, sem adição do co-produto (grupo SP). Já o segundo lote recebeu dieta a base de concentrado com substituição de 25% da dieta total por caroço de algodão, contendo 1,4g de gossipol/animal/dia (grupo CA). A suplementação teve duração de 84 dias, sendo a coleta seminal realizada no 85º dia do experimento. O sêmen foi coletado através da técnica de eletroestimulação e diluído em meio TRIS-gema-citrato (fração única) com 4% de glicerol. As amostras foram armazenadas em palhetas de 0,5mL, com concentração espermática de  $30 \times 10^6$  espermatozoides. Ato contínuo, estas foram resfriadas a 5°C por 3 horas, e posteriormente mantidas por 15 minutos a 5 cm em vapor de nitrogênio. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico até análise. O descongelamento foi realizado a 36°C por 30 segundos e foram avaliadas: motilidade, vigor e viabilidade espermática por meio da coloração de eosina-nigrosina. O experimento foi realizado com delineamento inteiramente casualizado e analisado através da ANOVA com  $\alpha = 5\%$ . Com base nos resultados obtidos, não se encontrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os animais do grupo controle e do grupo suplementado com caroço de algodão. Sendo assim, conclui-se que o fornecimento de caroço de algodão, com consumo diário de 1,4g de gossipol durante 84 dias de suplementação, não prejudicou os parâmetros seminais pós-congelamento de touros Nelore.

**Palavras-chave:** bovinos, espermatogênese, fertilidade, gossipol, sustentabilidade.

**Keywords:** bovine, spermatogenesis, fertility, gossypol, sustainability.



## **Analyses of the blood flow of pampiniform plexus in cattle by the resistance index is independent of the flow direction and location of the analyses point**

*Análise do fluxo sanguíneo do plexo pampiniforme de bovinos por meio do índice de resistência é independente da direção do fluxo e localização do ponto de análise*

**Leonardo Batissaco, Vitor Hugo Guilger Gonzaga, Vinícius José Moreira Nogueira, Laura Nataly Garcia Oliveros, Flávia dos Santos Almeida, Maíra Bianchi Rodrigues Alves, Laís Maria Gomes, Eneiva Carla Carvalho Celeghini\***

Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

\*E-mail: celeghin@usp.br

Two-dimensional ultrasonography allows the study of echogenicity of organs such as the testes, however, the Doppler tool helps evaluate the blood perfusion and, therefore, can be used as a tool in the diagnosis of reproductive tract diseases. Different indexes can be used to describe hemodynamics however, the most used is the Resistance Index (RI), which distinguishes systolic and diastolic flow and indicates the resistance that the vessel imposes on the flow, being an important tool in the evaluation of testicular diseases. However, certain parameters must be established for a correct measurement of vessel resistance and therefore blood flow. The present study had as objective to observe if there is any difference between the analyzed vessels in relation to the orientation of blood flow towards the probe (ORI - vessels stained in blue or red), and the region of the analyzed vessel (REG - central or peripheral). Three Nellore bulls with a mean age of 33 months and with a mean scrotal circumference of 36 cm were assessed five times in consecutive days. The vascularization of both testicles and pampiniform plexus were evaluated using a M5Vet® model Doppler ultrasound (Mindray, China) using a linear transducer (Mindray Model 7L4s) for: vascularization of the pampiniform plexus (VPP), assigning a score of 1 to 5, with 1 being less vascularized and 5 being more vascularized; vascularization of the testicular parenchyma (VTP) by assigning a score from 0 to 4, being 0 with no visible vascularization in the image and 4 several large vessels in the image; and finally the blood flow in the pampiniform plexus through the resistance index (RI), analyzing the vessels for orientation (ORI) and region (REG): right (RIRCB) and left (RILCB) central blue; right (RIRPB) and left (RILPB) peripheral blue; right (RIRCR) and left (RILCR) central red; and right (RIRPR) and left (RILPR) peripheral red. Data were submitted to analysis of variance using the MIXED procedure of the statistical analysis system (SAS, 2004) software, being analyzed by Pearson's correlation. The interaction between the variables was also analyzed, being considered two factors (orientation and region) by the Mixed procedure using the SAS software. When there was no interaction, the isolated effect of each factor was presented. The significance level considered was  $\leq 5\%$ . The analysis in the periphery of the red colored vessels in the right testis (RIRPR) showed a positive correlation with the blue stained vessels in both the peripheral (RIRPB = 0.64,  $p = 0.04$ ) and central (RIRCB = 0.61,  $P = 0.05$ ) regions. The same was observed in the left testicle, where the blue-colored vessels of the peripheral region (RILPB) showed a positive correlation with the red vessels both in the periphery (RILPR = 0.89,  $p = 0.0005$ ) and in the central region (RILCR = 0.75,  $p = 0.01$ ). The correlation between these variables shows the independence of the RI result in relation to the orientation and region parameters. No interaction effect was observed between RIs of ORI and REG (right,  $p = 0.061$ ; left,  $p = 0.081$ ). When observed the effects separately, no significant difference was observed in RI within ORI (right,  $p = 0.058$ ; left,  $p = 0.083$ ), as well as REG (right,  $p = 0.026$ ; left,  $p = 0.070$ ). These data indicate that there is no difference in the analysis in relation to the region or orientation of the chosen vessel, besides showing that the flow direction is independent of the location of the measurement in the collection of RI data. Thus, we can conclude that the choice of RI to measure the blood perfusion of the vessels that irrigate the testes of bulls is indifferent to any intrinsic factor, ie, there is no mandatory choice of orientation or region of the vessel.

**Keywords:** testicular hemodynamic, cattle, color ultrasound standardization, resistance index.

**Palavras-chave:** hemodinâmica testicular, gado, padronização ultrassonografia colorida, índice de resistência.



## **Aplicação de dipeptídeo alanil-glutamina e glicil-glutamina em meio de cultivo *in vitro* para produção de embriões bovinos**

*Application of alanyl-glutamine and glycyl-glutamine dipeptide in in vitro culture medium for bovine embryo production*

**João Filipi Scheffer Pereira<sup>1,2,\*</sup>, Jonathan Jesus da Silva<sup>1</sup>, Cátia de Paula Sant'Anna<sup>1</sup>, Maria Theresa Scheffer Pereira da Silva<sup>1</sup>, Andreza de Fátima Trindade Cordeiro<sup>2</sup>, Hellen Braga<sup>2</sup>, Alessandra Lazarin<sup>2</sup>, Liédge Camila Simioni Felício<sup>1,2</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>1</sup>, Maurício Barros Fernandes<sup>3</sup>, Cristina Santos Sotomaio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Brasil; <sup>3</sup>PrófiV Genética Animal, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

\*E-mail: joao.filipi@gmail.com

Os dipeptídeos alanil-glutamina (Ala-gln) e Glicil-glutamina (Gli-gln) têm sido estudados na produção *in vitro* de embriões de humanos, suínos, cobaias e ruminantes em substituição à glutamina. Os principais benefícios dos dipeptídeos são o aumento da produção embrionária e da contagem total de células e/ou da massa celular interna. O objetivo desta pesquisa é determinar os efeitos dos compostos Ala-gln e Gli-gln em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos. Oócitos obtidos de ovários coletados em frigorífico foram destinados ao Laboratório experimental de Cultivo Celular - PUCPR, condicionados em solução fisiológica a 37°C. Os folículos antrais entre 3-8 mm foram aspirados, os oócitos de grau 1 e 2 selecionados e divididos em grupos de 25 unidades, colocados em maturação *in vitro* por 24 h, em TCM 199 contendo glutamina (0,06849 mM/mL), SFB (10%), piruvato (22 µg/mL), FSH (0,5 µg/ml), LH (10 UI/mL), estradiol (1 µg/mL) e sulfato de amicacina (0,1 mg/mL). A fertilização *in vitro* foi realizado por 22 h, em meio Fert-Talp contendo BSA (0,6 g/L), PHE (440 µg/mL), heparina (10 UI/mL) e sulfato de amicacina (0,1 mg/mL). Mesmo lote e partida de sêmen congelado de único reprodutor foi utilizado em todos os experimentos, o sêmen foi selecionado utilizando o gradiente Bovipure®, a dose inseminante foi de 10 µL na concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O cultivo *in vitro*, foi realizado em meio CR2 contendo BSA (0,005g/mL), SFB (5%), sulfato de amicacina (0,1 mg/mL), glutamina (0,00034 mM/mL), alanina (0,1 mM/mL) e glicina (0,1 mM/mL) por 7 dias. No experimento 1, Ala-gln e Gli-gln foram aplicados associados na substituição da glutamina, alanina e glicina em peso molar equivalente no CIV. No experimento 2, Ala-gln e Gli-gln foram aplicados associados sendo o peso molar de Ala-gln (0,6 mM) e Gli-gln (2 mM) devido a maior afinidade celular de Ala-gln. No experimento 3, foram preparados dois grupos tratados, sendo o grupo A, Ala-gln adicionado de glicina e o grupo B, Gli-gln adicionado de alanina, substituindo glutamina e alanina ou glicina. A avaliação dos embriões foi realizada por meio da cinética de desenvolvimento *in vitro* nos dias 3 (d3) e 7 (d7) de CIV. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na taxa de clivagem (d3) entre os grupos tratado e controle dos experimentos 1 (72,92/79,42%), 2 (77,37/75,01%) e 3, grupo A (69,63%), grupo B (75,27%) e controle (76,98%). Em d7, quando Ala-gln e Gli-gln foram utilizados associados (experimento 1), não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na taxa de embriões produzidos entre controle (30,84%) e tratado (27,07%). Quando em maior concentração (experimento 2), houve uma redução ( $p < 0,05$ ) na taxa embriões produzidos (d7) entre os grupos controle (28,46%) e tratado (16,92%). Quando os dipeptídeos foram adicionados separadamente, com a adição do aminoácido alanina ou glicina, observou-se redução da taxa de embriões produzidos em d7 ( $p < 0,05$ ) para ambos os grupos tratados, grupo A (21,77%), grupo B (24,95%) em relação ao controle (34,54%). Concluímos que não é indicada a aplicação dos dipeptídeos em conjunto ou isolados em meio de cultivo *in vitro* para produção de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** dipeptídeos, produção *in vitro*, bovinos.

**Key words:** dipeptides, *in vitro* production, bovine.

## **Atividade citoquímica mitocondrial, estresse oxidativo e capacitação espermática pós-descongelamento seminal de touros Pantaneiro**

*Mitochondrial cytochemical activity, oxidative stress and spermatid capacitation of post thawed semen of Pantaneiros bulls*

**Bruno Silva do Espírito Santo<sup>1</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2\*</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>3</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>4</sup>, Moacir Ferreira Duarte Junior<sup>3</sup>, Luis Eduardo Senra e Silva<sup>3</sup>, Gilmar Ferreira Rodrigues<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil;

<sup>2</sup>Docente do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brasil, <sup>4</sup>Pós-doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal - Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil.

\*E-mail: lukeiko@gmail.com

Os bovinos da raça Pantaneira (*Bos taurus taurus*), estão há quase três séculos no Pantanal, desenvolvendo características adaptativas relacionadas à região, como a termotolerância. Entender as relações adaptativas e a fisiologia reprodutiva desses animais se tornam necessários quando o assunto é a fertilidade. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade espermática pós-congelamento em reprodutores da raça Pantaneira. Foram utilizados 6 touros com idade média de 6 anos. Os ejaculados foram coletados através do método de eletroestimulação, sendo então diluídos em meio Tris-gema citrato e envasados em palhetas de 0,5mL. O resfriamento foi realizado a 4°C/ 4 horas e em seguida, o processo de congelamento foi feito em vapor de nitrogênio (N<sub>2</sub>) por 15 minutos. Ato contínuo, as palhetas foram imersas em N<sub>2</sub> e posteriormente armazenadas em botijão criogênico até análise. O descongelamento foi realizado a 37°C/30 segundos e ato contínuo, foram realizadas avaliações quanto ao estresse oxidativo espontâneo (TBARS espontâneo), atividade citoquímica mitocondrial (DAB) e reação acrossômica (coloração tripla do espermatozoide - TRYPAN). O TBARS espontâneo foi avaliado por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (ng/mL). Já a DAB (%) foi definida por meio do funcionamento peça intermediária (PI), a qual foi classificada em quatro classes: DAB-1 (todas as mitocôndrias ativas com PI totalmente corada), DAB-2 (atividade mitocondrial média a alta com PI predominantemente ativas), DAB-3 (PI com menos da metade da atividade mitocondrial e menos de 50% corada) e DAB-4 (PI totalmente descorada, sem nenhuma atividade mitocondrial). Por fim, na coloração de TRYPAN (%), as células foram avaliadas e classificadas em: classe 1: espermatozoides vivos e intactos, classe 2: espermatozoides vivos com reação acrossômica, classe 3: espermatozoides mortos com acrossoma intacto e classe 4: espermatozoides mortos com reação acrossômica degenerativa. Os dados foram descritos na forma de média e erro padrão da média. Os parâmetros obtidos foram: DAB 1 (77,25 ± 2,77), DAB 2 (16,83 ± 2,29), DAB 3 (4,08 ± 0,67), DAB 4 (1,83 ± 0,33). TRYPAN 1 (58,00 ± 2,32), TRYPAN 2 (6,50 ± 1,76), TRYPAN 3 (25,08 ± 2,93) TRYPAN 4 (10,41 ± 0,91). TBARS (284,00 ± 49,74). De acordo com os resultados obtidos, pode-se constatar que as variáveis analisadas não diferiram dos parâmetros já descritos na literatura para outras raças de bovinos. Dessa forma, conclui-se que a característica de adaptabilidade desenvolvida pelo bovino pantaneiro às adversidades ambientais e climáticas do Pantanal, habilita-o como opção de introdução de uma raça taurina em sistemas de criação locais e disseminação de seu material genético por meio de biotecnologias reprodutivas.

**Palavras-chave:** criopreservação, espermatozoide, pantanal, termotolerância.

**Keywords:** cryopreservation, spermatozoa, pantanal, thermotolerance.



## **Avaliação da idade ao primeiro parto em novilhas Girolando da Pesagro-Rio**

*Evaluation of the age at first calving Girolando Breed heifers*

**Oswaldo Almeida Resende<sup>1,2,\*</sup>, Sergio Trabali Camargo Filho<sup>2</sup> Pedro Afonso Moreira Alves<sup>2</sup>, Rosane Scatamburlo Lizieire Fajardo<sup>2</sup>, Jaci de Almeida<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Pesagro/CEPAO, Macaé, RJ, Brasil; <sup>3</sup>UFMG/EV, Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*E-mail: oaresende@uol.br

O rebanho bovino da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro/Centro Estadual de Agricultura Orgânica (Pesagro-Rio CEPAO) é oriundo do plantel do DPEA (cruzamento as raças Holandesa, Gir e Guernsey), iniciado em 1948. Nos últimos quarenta anos optou-se pelo cruzamento entre as raças holandesas (H) e Gir (G) para formar a raça Girolando. O rebanho sofreu uma redução progressiva, na última década, de 350 a 230 animais. O sistema reprodutivo tem sido de inseminação artificial com observação de cio e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com sêmen congelado, em duas estações anuais, com a finalidade de atender as necessidades dos projetos de pesquisas da Empresa. Na bovinocultura de leite a idade ao primeiro parto (IPP) tem relevante atuação na eficiência econômica da exploração. Assim já está tecnicamente estabelecido que as novilhas Girolando entre em reprodução aos 18 meses e pesos vivo acima de 330kg, para atingirem a IPP aos 27-33 meses, em manejo a base de pastagem. Objetivado estudar as IPP das novilhas Girolando, no período de 1998 a 2017, foram utilizados os registros nos fichários e software do rebanho. As IPP (dias) foram avaliadas em relação aos parâmetros: 1) Grupo Genético, 2) Ano de nascimento, 3) Mês de nascimento, 4) Estações do ano de nascimento, sendo submetidos ao teste Kruskal-Wallis (One-Way Anova), do pacote do Programa GraphPad Prism 5. Os resultados médios e desvios-padrão (transformados em meses) de IPP foram 1) Grupo genético ( $P > 0,05$ ): 1/4 HP =  $39,9 \pm 5,6/48$ ; 3/8 HP =  $38,7 \pm 6,5/52$ ; 1/2 HP =  $39,4 \pm 7,9/52$ ; 5/8 HP =  $40,1 \pm 7,6/50$ ; 3/4 HP =  $40,1 \pm 7,5/144$ ; 7/8 HP =  $39,2 \pm 7,0/98$ ; 15/16 HP =  $39,4 \pm 5,7/24$ ; 2) Ano de nascimento ( $P < 0,05$ ): 1998 =  $38,3 \pm 4,4^b/23$ ; 1999 =  $40,0 \pm 6,1^b/41$ ; 2000 =  $39,4 \pm 8,0^b/38$ ; 2001 =  $36,5 \pm 4,8^{ab}/27$ ; 2002 =  $40,3 \pm 6,0^b/40$ ; 2003 =  $41,2 \pm 5,1^b/31$ ; 2004 =  $41,1 \pm 7,9^b/33$ ; 2005 =  $39,2 \pm 5,7^b/33$ ; 2006 =  $39,6 \pm 5,8^b/26$ ; 2007 =  $42,6 \pm 6,7^{cb}/39$ ; 2008 =  $41,6 \pm 7,2^b/31$ ; 2009 =  $44,3 \pm 11,1^d/31$ ; 2010 =  $39,3 \pm 6,8^b/19$ ; 2011 =  $36,6 \pm 6,7^{ab}/18$ ; 2012 =  $36,0 \pm 6,2^{ab}/14$ ; 2013 =  $35,6 \pm 2,3^{ab}/12$ ; 2014 =  $30,1 \pm 3,1/12^a$ ; 3) Mês de nascimento ( $P > 0,05$ ): Janeiro =  $39,4 \pm 7,2/33$ ; Fevereiro =  $38,9 \pm 4,8/17$ ; Março =  $39,4 \pm 9,1/12$ ; Abril =  $39,7 \pm 7,6/56$ ; Maio =  $39,8 \pm 8,0/95$ ; Junho =  $39,4 \pm 5,7/49$ ; Julho =  $40,1 \pm 5,2/25$ ; Agosto =  $38,8 \pm 6,4/17$ ; Setembro =  $38,8 \pm 6,6/9$ ; Outubro =  $38,4 \pm 7,1/56$ ; Novembro =  $40,1 \pm 7,4/63$ ; Dezembro =  $38,0 \pm 7,1/36$ ; 4) Estações do ano de nascimento ( $P > 0,05$ ): Verão =  $39,3 \pm 6,9/62$ , Outono =  $39,7 \pm 7,3/200$ , Inverno =  $39,3 \pm 5,8/51$ , Primavera =  $39,5 \pm 7,2/155$ . Pela análise dos dados verifica-se que em relação aos fatores Grupo genético, Estação e Mês de nascimento as diferenças entre as médias de IPP não foram significativas. Já em relação ao Ano de nascimento houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), com redução acentuada nas médias da idade ao primeiro parto nos anos de 2011 a 2014 ( $36,5 \pm 6,9$  a  $30,1 \pm 3,1$  meses). Esta redução foi consequência do uso de protocolos de IATF nos experimentos nesses anos. Entretanto como os resultados ainda estão acima da média da IPP de 27 meses recomenda-se maior atenção no manejo de novilhas Girolando, principalmente em relação à qualidade da pastagem e utilização de IATF, para melhorar a eficiência reprodutiva e consequentemente obter maior eficiência econômica da atividade.

**Palavras chave:** IPP, novilhas, girolando, reprodução, IATF.



## **Avaliação de três diferentes diluentes sobre a funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino**

*Evaluation of three different diluents on functionality and integrity of plasma membrane of bovine spermatozoa*

**Monalyse Kevelyn Borges de Oliveira<sup>1</sup>, João Pedro Brandão Zandonaide<sup>1</sup>, Neimar Correa Severo<sup>2,\*</sup>, André Belico de Vasconcelos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil, <sup>2</sup>Alta Genetics do Brasil Ltda., Uberaba, MG, Brazil.

\*E-mail: ncsevero@gmail.com

A criopreservação seminal foi uma inovação marcante na produção de sêmen bovino em grande escala, embora devemos ressaltar que este processo possa causar danos a membrana plasmática das células espermáticas. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar a funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino a fresco, diluído e após criogenia, determinando a capacidade crioprotetora de três diferentes diluentes: Botu-Bov<sup>®</sup>, OptiXcell<sup>®</sup> e Tryladil<sup>®</sup>. Para isso, foram analisados dois ejaculados de 8 touros da raça Nelore, coletados pelo método de vagina artificial. Os ejaculados foram avaliados microscopicamente (concentração espermática, motilidade total, teste hiposmótico (HOST) e coloração por eosina (EOS) no ejaculado a fresco, diluído na proporção 1:1 e após congelamento. Determinou-se para as amostras criopreservadas a concentração espermática de 30 milhões de SPTZ/dose. Após diluição em tubos Falcon<sup>®</sup> 50ml e deposição deste tubos em potes contendo água a 37°C, o sêmen foi conduzido a câmara fria a 4°C para seu resfriamento por 3 horas. As amostras foram então envasadas em palhetas de 0,25ml (IMV<sup>®</sup> Technologies) devidamente identificadas com o nome do touro, partida do ejaculado e diluidor utilizado. Para a curva de estabilização em vapor de nitrogênio líquido, as palhetas foram dispostas em grade de metal depositada em caixa isotérmica convencional de 50 L a uma distância de 9 cm acima do nível do nitrogênio líquido durante 20 minutos. Posteriormente a estabilização, procedeu-se com a imersão direta das palhetas em nitrogênio líquido e armazenamento das mesmas em botijões criogênicos a -196°C até o momento da análise. Os dados foram analisados pelo programa Graphpadprism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, USA) sendo a comparação de dados entre os tratamentos utilizando teste paramétrico Oneway ANOVA, com pós teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Das médias dos resultados *in natura* apresentaram, em média, concentração de  $1886,8 \times 10^6$  (esp/ml); motilidade 71,6%, atividade de membrana pelo teste HOST 77% e pelo teste de eosina (EOS) 84,4% de células viáveis. Após a diluição observou-se com Tryladil<sup>®</sup>, Botu-Bov<sup>®</sup> e OptiXcell<sup>®</sup>: Mot (%) - (71,3 vs 71,3 vs 70,3); HOST (%) - (64,9 vs 62,6 vs 67,3); EOS (%) - (83,0 vs 83 vs 79), após o congelamento Mot (%) - (46,9 vs 48,8 vs 48,1); HOST (%) - (47,8 vs 38,8 vs 42,8); EOS (%) - (65,3 vs 54,3 vs 52,3), respectivamente. Dentre as análises obtidas, houve diferença estatística entre as amostras diluídas 1:1 no teste HOST, destacando-se a eficiência do diluidor OptiXcell<sup>®</sup> nesta avaliação. Quanto aos resultados pós-congelamento, obteve-se resultado satisfatório do diluidor Tryladil<sup>®</sup> tanto no teste HOST quanto no teste de coloração por eosina, promovendo manutenção da funcionalidade e integridade da membrana espermática após criogenia, quando comparado aos demais. Como o processo de criogenia do sêmen tende a causar danos em sua membrana espermática, a viabilização de técnicas avaliativas (motilidade progressiva, teste hiposmótico, e coloração eosina) é indicado pela sua aplicabilidade na rotina analítica do sêmen comercial, uma vez que conforme o ejaculado pode ser preconizado um diluidor específico para o processo de criogenia.

**Palavras-chave:** criopreservação, viabilidade, diluente.

**Keywords:** cryopreservation; viability, diluent.



## **Avaliação do eritrograma de vacas leite com distúrbios de involução uterina nos primeiros 60 dias de lactação**

*Evaluation of the erythrogram profile and uterine involution in milk cows during the transition period*

**Renan Braga Paiano<sup>1\*</sup>, Fábio de Carvalho Lahr<sup>2</sup>, Daniela Becker Birgel<sup>2</sup>,  
Eduardo Harry Birgel Junior<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Aluno pós graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMZV/USP); <sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: renanpaiano@hotmail.com

O período de transição nos bovinos é uma fase na qual a fêmea passa por diversas modificações metabólicas e hormonais que poderiam interferir no processo de involução uterina. Vacas lactantes podem sofrer modificações fisiológicas e hematológicas significativas durante o puerpério. A presente pesquisa tem como objetivo relatar a ocorrência de anemia no puerpério de vacas de leite e procurar responder a seguinte hipótese: animais com distúrbios de involução uterina (metrite puerperal aguda e endometrite puerperal crônica) estariam mais propensos a desenvolverem anemia durante os primeiros 60 dias de lactação, ou seja, o processo inflamatório presente nos distúrbios de involução uterina estaria associado a liberação de substâncias pró-inflamatórias que determinariam alterações no sistema hematopoiético e anemia nas vacas. O trabalho foi conduzido no Setor de Gado de Leite da Prefeitura do Campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo (USP), na cidade de Pirassununga/SP, durante os meses de maio de 2015 a junho de 2016. Foram utilizadas 25 fêmeas bovinas, da raça Holandesa. Os animais foram acompanhados durante nos primeiros 60 dias após o parto. Os tempos determinados para as coletas dos dados foram dia da parição, 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 45º e 60º dias após o parto. Os animais foram distribuídos em dois grupos: sadios e distúrbios de involução uterina (metrite puerperal aguda e endometrite puerperal crônica). Foram considerados anêmicos animais que apresentaram valores do volume globular (hematócrito) menores do que 25 % em algum período durante as colheitas. O exame ginecológico foi realizado por meio da palpação dos órgãos do trato reprodutivo, ultrassonografia e avaliação das secreções uterinas nos seguintes momentos: parto dia da parição, 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 45º e 60º dias após o parto. Dos 25 animais 64,0% (16/25) desenvolveram anemia normocítica e normocrômica, sendo que esta anemia já podia ser vista em 16,0 % (4/25) dos animais no 14º dia pós-parto, em 40,0 % (16/25) no 21º dia e 30º dia pós-parto, em 12,0 % (3/25) dos animais no 45º dia pós-parto e em 20,0 % (5/25) dos animais no 60º dia pós-parto. Durante todo o período experimental o número de hemácias, volume globular e taxa de hemoglobina nos animais sadios oscilou, respectivamente entre 5,20 e 6,31 X 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>, entre 22,8 e 32,4 % e entre 7,81 e 10,10 g/dL. No grupo dos animais com distúrbios de involução uterina o número de hemácia oscilou entre 4,78 e 6,28 X 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>, o volume globular oscilou entre 24,2 e 33,3 % e a taxa de hemoglobina oscilou entre 7,78 e 10,33 g/dL. A análise estatística não evidenciou diferenças entre os dois grupos. Em conclusão, os resultados obtidos mostram que a ocorrência de doenças puerperais e o retardo na involução uterina não foi fator predisponente para que as vacas desenvolvessem anemia durante a fase puerperal e pós-puterperal.

**Palavras-chave:** Eritrograma, involução uterina, vaca de leite.

**Keywords:** *Erythrogram, uterine involution, dairy cow.*



## **Características morfofuncionais do corioalantóide de gestações bovinas iniciais produzidas por IATF e FIV**

*Chorioalantoic morphofunctional characteristics in early bovine FTAI and IVF pregnancies*

**Marilu Martins Gioso<sup>1,2,\*</sup>, Rodrigo Silva Nunes Barreto<sup>2</sup>, Miller Pereira Palhão<sup>1,2</sup>, Jairo Pereira Neves<sup>1</sup>, Antônio Chaves de Assis Neto<sup>2</sup>, Maria Angelica Miglino<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade José do Rosário Vellano, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil; <sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

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

Apesar do potencial das biotecnologias da reprodução contribuírem com o melhoramento genético da bovinocultura, ainda algumas limitações quanto as taxas gestacionais são encontradas. A fertilização “in vitro” (FIV) gera embriões mais susceptíveis a mortalidade embrionária inicial, e consequentemente menores taxas de gestação quando comparados a outras técnicas, como a inseminação artificial (em tempo fixo - IATF) e monta natural. Isto seria resultado de alterações nas membranas placentárias antes do estabelecimento da placenta definitiva. Portanto, o propósito deste estudo foi de averiguar o desenvolvimento morfofuncional do cório e do alantóide, oriundas de gestações iniciais produzidas por FIV ou IATF. As gestações bovinas produzidas por FIV foram interrompidas nos dias 26, 32, 35, 46/47 e 61 de gestação (n = 3 para cada idade). Gestações produzidas por IATF, com idade e quantidades semelhantes, foram utilizadas como controle. As fêmeas gestantes foram eutanasiadas, em frigoríficos abatedouros, onde os úteros foram recuperados, acondicionados e transportados para o laboratório. Após incisão na linha antimesometrial do corno gestante, o feto e membranas foram expostos, e tanto o cório como o alantóide foram armazenadas em solução de paraformaldeído 4% tamponado. Em seguida as amostras foram rotineiramente processadas para histologia e coradas com hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) e tricromio de Masson. Tanto o cório como o alantóide se desenvolveram de forma semelhante nas gestações FIV como IATF, levando a fusão entre as membranas após o dia 35 de gestação. Entretanto algumas particularidades foram observadas entre os grupos. De modo geral, foram observadas células trofoblásticas gigantes desde as fases mais iniciais até as fases mais tardias estudadas, com aumento constante dessa população com o decorrer da gestação. Tais células apresentavam citoplasma rico em grânulos glicoproteicos (PAS positivos), principalmente apicais, e núcleos formados por diversos nucléolos bem evidentes. Enquanto que as outras células trofoblásticas não apresentavam tais grânulos e seus nucléolos eram pouco evidentes. A vascularização do mesênquima coriônico se tornou mais presente após o dia 32 de gestação, sendo mais evidente nas gestações FIV do que na IATF. Além disso, nas gestações FIV havia maior quantidade de pequenos vasos abaixo do trofoblasto. Portanto, nossos dados sugerem que gestações produzidas por FIV possuem um desbalanço na vasculogênese coriônica, assim como observado no saco vitelino em outros trabalhos do grupo. Entretanto investigações mais detalhadas sobre o processo de vasculogênese estão em desenvolvimento.

**Palavras-chave:** biotecnologias da reprodução, vacas, vasculogênese.

**Keywords:** *biotechnologies of reproduction, cattle, vasculogenesis.*



## **Combinação de vitamina C e glutatona reduzida na criopreservação de sêmen bovino** *Combination of vitamin C and reduced glutathione in cryopreservation of bovine semen*

**Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Diego Santos Almeida<sup>2</sup>, Giovani Santos de Abreu Junior<sup>2</sup>, Maíra Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil.  
\*E-mail: femedvet@yahoo.com.br

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica amplamente utilizada, e durante seu procedimento são formadas as espécies reativas de oxigênio (ROS) que de forma desequilibrada irá acarretar no estresse oxidativo, que corresponde ao desbalanço entre antioxidante e ROS. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da adição da vitamina C e glutatona reduzida e sua combinação, na criopreservação de sêmen bovino sobre: motilidade e vigor espermático; membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial; estresse oxidativo e morfologia espermática. Para tanto, o ejaculado de 9 animais foi dividido em quatro frações, correspondente a cada tratamento, sendo estes: grupo controle ( $G_c$ ) – sêmen diluído com extensor Tris-gema; grupo vitamina C ( $G_v$ ) – sêmen diluído em Tris-gema mais vitamina C (2,5 mM/mL); grupo glutatona ( $G_g$ ) – sêmen diluído em Tris-gema acrescido de glutatona reduzida (2,5 mM/mL) e o grupo associado ( $G_{ass}$ ) – sêmen diluído em Tris-gema acrescido de vitamina C (1,25 mM/mL) e glutatona reduzida (1,25 mM/mL). O sêmen foi envasado em palhetas francesas (0,25 mL) e submetido à criopreservação utilizando equipamento automatizado TK-3000. Para as avaliações duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. A motilidade e o vigor espermático foram analisados por microscopia de contraste de fase. Para integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e potencial mitocondrial, o sêmen foi diluído em TALP sperm ( $10 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e adicionadas as sondas fluorescentes Hoechst 33342; iodeto de propídio; JC-1 e FITC-PSA (Celeghini et al. *Reprod. Dom Anim*, v. 42, 479-488, 2007). Para avaliar estresse oxidativo utilizou-se a sonda CellRox Deep Red<sup>®</sup> (adaptada de Alves et al., *Biochem Physiol*, v. 4, 2015). A leitura das sondas fluorescentes foi realizada por microscopia de epifluorescência. A morfologia espermática foi realizada pela técnica da câmara úmida em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), classificando as alterações em defeitos maiores e menores. Os dados foram analisados utilizando o programa BioEstat 5.0. As variáveis paramétricas foram submetidas à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, e as não paramétricas pelo teste de Friedamn, utilizando o intervalo de confiança de 95%. O  $G_{ass}$  apresentou efeito benéfico para as características de motilidade espermática ( $G_c$ - 35,00±7,5b;  $G_v$ - 40,00±7,9ab;  $G_g$ - 42,22±7,12ab;  $G_{ass}$ -4,44±8,82a;  $P \leq 0,05$ ) como também preservou as membranas plasmáticas e acrossomal ( $G_c$ - 22,55±4,19b;  $G_v$ - 30,66±4,18ab;  $G_g$ - 27,22±5,10ab;  $G_{ass}$ - 37,77±2,29a;  $P \leq 0,05$ ). Quanto ao estresse oxidativo o  $G_{ass}$  apresentou maior quantificação das ROS, visto que a sonda CellRox mensura a produção destes radicais de forma geral ( $G_c$ - 4,77±0,88b;  $G_v$ -6,88±2,57b;  $G_g$ - 6,90±2,95b;  $G_{ass}$ -16,77±4,88a;  $P \leq 0,05$ ). Para morfologia espermática os antioxidantes não influenciaram no percentual de defeitos espermáticos maiores e menores após o processo de criopreservação ( $P > 0,05$ ). Assim, a combinação de vitamina C e glutatona reduzida contribuiu para preservação das células espermáticas durante a criopreservação de sêmen.

**Palavras-chave:** CellRox, estresse oxidativo, Glatutona, Vitamina C.

**Keywords:** ascorbic acid, CellRox, glutathione, oxidative stress.



## **Comparação da eficácia do Benzoato de Estradiol (BE) e do Cipionato de Estradiol (CE) na taxa de prenhez de vacas primíparas Nelore em protocolos de sincronização e ressincronização para a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)**

*Comparison between the efficacy of estradiol benzoate (EB) and estradiol cypionate (EC) in the pregnancy rate in Nelore primiparous cows in synchronization and resynchronization protocols for fixed time artificial insemination (IATF)*

**Rafaela Talini<sup>1\*</sup>, André Bastos de Souza<sup>2</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>1</sup>, Márcio Saporski Segui<sup>1</sup>, Victor Breno Pedrosa<sup>3</sup>, Ana Paula Kaminski<sup>1</sup>, Romildo Romualdo Weiss<sup>4</sup>, Ana Claudia Machinski Rangel de Abreu<sup>4</sup>, Louise Helene Bacher<sup>1</sup>, Isabella Sellmer Ramos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Curitiba (PR); <sup>2</sup>VetMaxi Consultoria Agropecuária; <sup>3</sup>Universidade Estadual e Ponta Grossa, UEPG; <sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná, Campus Curitiba.

\*E-mail: rafatalini@gmail.com

Diversos protocolos para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) estão atualmente disponíveis. Para aumentar a taxa de prenhez (TP) resultante deste investimento, os protocolos incluem a sincronização e a ressincronização dos animais. No estudo 233 vacas primíparas *Bos taurus indicus* foram distribuídas em dois grupos (BE e CE) submetidos a dois diferentes protocolos. Foram analisados os “dias em aberto” dos animais, o escore corporal (ECC) e a condição ovariana dos animais (presença de folículo, corpo lúteo ou anestro). O Grupo benzoato de estradiol (GBE), foi submetido ao seguinte protocolo: d0: P4+BE; d8: -P4+PG+eCG; d9: BE; d10: IATF e o Grupo cipionato de estradiol (GCE) recebeu: d0:P4+BE; d8: -P4+PG+eCG+ECP; d10: IATF. Para a ressincronização, os dois grupos tiveram seus respectivos protocolos repetidos. Decorridos 15 dias após a ressincronização, as vacas foram colocadas em piquetes com touros para a realização de monta natural. Nos resultados observou-se que animais com ECC > 3 apresentaram maiores TPs, na sincronização (P=0.0042), e na ressincronização (P=0.02). Vacas com “dias em aberto” ≤ 45 dias tiveram performance reprodutiva inferior na primeira IATF ao serem comparadas às vacas com “dias em aberto” > 45 dias (P=0.006), efeito este suprimido após a ressincronização. As vacas cíclicas (com folículos e/ou corpo lúteo) ao início do estudo, apresentaram maior probabilidade de prenhez do que as fêmeas em anestro, na primeira IATF (P < 0.0001) e na ressincronização (P < 0.0001). Finalmente, o GBE mostrou-se significativamente mais eficaz (P < 0.0001) para as TPs, (na IA da sincronização e na IATF após a ressincronização). Conclui-se que o uso do BE na função de indutor da ovulação (d9 do protocolo) resultou em maiores TPs, sendo, portanto, o mais indicado para primíparas.

**Palavras-chave:** primíparas, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol, IATF.

**Keywords:** *primiparous, estradiol benzoate, estradiol cypionate, FTAI.*



## Comparação da taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo de vacas com diferentes quantidades de folículos antrais

*Comparison of conception rate to fixed-time artificial insemination of cows with different amounts of antral follicles*

Fábio Lucas Zito de Moraes<sup>1</sup>, Andressa Crêscencio<sup>2</sup>, Camila Oliveira Rosa<sup>1</sup>, Camila Bizarro da Silva<sup>1</sup>, Lahys Tuigui Diniz<sup>2</sup>, Fábio Morotti<sup>3</sup>, Marcelo Marcondes Seneda<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Doutorando em ciência animal na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil; <sup>2</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil; <sup>3</sup>Professor adjunto do curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

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

Nas últimas décadas, a necessidade de se produzir animais de alto potencial genético tem aumentado exponencialmente na bovinocultura leiteira e de corte. Recentemente, buscou-se verificar a possível correlação da quantidade de folículos antrais e a fertilidade em bovinos, estudos demonstraram que vacas leiteiras *Bos taurus* com baixa contagem de folículos antrais (CFA) tem apresentado algumas características associadas à baixa fertilidade. Desta maneira, pesquisas neste âmbito tem sido fomentadas devido a possível influência da CFA nos resultados obtidos no uso das biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da quantidade de folículos antrais na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF. A CFA de 585 fêmeas *Bos indicus* foi determinada no início do protocolo de IATF para separação dos grupos experimentais, a contagem dos folículos ( $\geq 3$  mm de diâmetro) foi realizada por exame ultrassonográfico utilizando transdutor linear transretal de 5 MHz e o número total de folículos antrais foi quantificado considerando o par de ovários. As vacas do grupo de baixa CFA foram definidas com base no valor de Q1 ( $\leq 10$  folículos; n = 223 vacas), o grupo de média CFA constituiu 25% das vacas com contagem folicular próxima da mediana ( $\leq 12 \geq 18$  folículos; n = 148 vacas) e o grupo de alta CFA foi definido com base no valor de Q3 ( $\geq 20$  folículos; n = 214 vacas). O início do protocolo foi estabelecido em um dia aleatório do ciclo estral (D0) com a inserção de dispositivo intravaginal contendo 0,588g de progesterona (P4) em associação à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol via intramuscular (IM). Após 8 dias (D8), foi realizada a remoção do implante de P4, a administração de 150 $\mu$ g de d-cloprostenol sódico, de 300UI de gonadotrofina coriônica equina e 1,0mg de cipionato de estradiol via IM. A inseminação artificial com sêmen criopreservado foi realizada 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal. O diagnóstico de gestação para avaliação da taxa de concepção foi realizado em todos os animais 30 dias após a data da inseminação, as vacas foram submetidas à ultrassonografia transretal e a presença de feto visível com viabilidade confirmada (batimento cardíaco) foi considerada como prenhez positiva. A CFA foi analisada por ANOVA seguida de teste de Tukey. As taxas de concepção foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado, adotando um nível de significância quando  $p \leq 0,05$ . A taxa de concepção obtida na categoria de baixa (59,2 %; 132/223) foi maior em comparação as taxas das categorias de média (52%; 77/148) e alta (46,7%; 100/214) CFA ( $p \leq 0,05$ ). Pode-se concluir que a taxa de concepção de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF pode sofrer influência da CFA e que as vacas de baixa CFA podem apresentar maiores taxas de prenhez. A utilização desta ferramenta para auxílio na seleção de fêmeas pode colaborar para minimizar as perdas decorrentes desta influência e possibilitar adequações na utilização desta biotecnologia.

**Palavras-chave:** folículos antrais, inseminação artificial em tempo fixo, taxa de prenhez.

**Keywords:** *antral follicles, fixed-time artificial insemination, pregnancy rate.*



## **Comparação das taxas de prenhez em receptoras de embriões de fertilização *in vitro*, utilizando dois protocolos de sincronização**

*Comparison of pregnancy rates in recipients of in vitro fertilization embryos using two synchronization protocols*

**Guilherme do Amaral Alves, João Paulo Silveira Caixeta, André Belico de Vasconcelos\***

Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil.

\*E-mail: devasconcelos.a.b@gmail.com

A produção *in vitro* de embriões é uma técnica que promove o avanço genético e incrementa o potencial reprodutivo com acasalamento de animais superiores. Adicionalmente, é uma alternativa para uso em fêmeas com disfunção reprodutiva e este fato permitiu que a técnica se expandisse da pesquisa para a aplicação comercial. Assim foi possível aprimorar a recuperação de ovócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico, superando os atuais índices de transferência de embrião (TE) clássica, no que diz respeito à produção de bezerro por vaca por ano. Este trabalho teve como objetivo comparar a taxa de prenhez quando implementado dois protocolos de sincronização, no período de Agosto de 2015 até Junho de 2016, em propriedades localizadas na região noroeste do estado de São Paulo, entre os municípios de Colina e Rifaina, com índice pluviométrico anual de 1363 a 1531,6 milímetros. As receptoras utilizadas eram nelores e mestiças de nelore ½ sangue, oriundas de cruzamento industrial, primíparas e pluríparas provenientes das propriedades. Esses animais passaram por uma avaliação visual de seu estado corporal, somente foram utilizados, para este estudo, animais com escore corporal  $\geq 3$  e que não se encontravam em anestro. Em todos os animais foi realizado uma avaliação por ultrassonografia do útero e ovários, para verificação do estado clínico do animal. Quanto aos protocolos de sincronização seguiu-se: Em ambos no dia 0 foi inserido um dispositivo intravaginal contendo 0,5 mg de progesterona (Primer®) e aplicado via intramuscular 2mg de benzoato de estradiol (RIC-BE®); No protocolo A foi retirado o dispositivo intravaginal no dia 8 e aplicado via intramuscular 0,5mg de cloprostenol (Veteglan®), 300 UI de eCG (Novormon®) e 0,6mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®) e no dia 17 TE; No protocolo B, dia 7 foi aplicado via intramuscular 0,5mg de cloprostenol (Veteglan®); no dia 9 foi retirado o dispositivo intravaginal e, aplicado intramuscular 300 UI de eCG (Novormon®) e 0,6mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®); no dia 18 TE. Somou-se 780 embriões transferidos em ambos protocolos. As médias obtidas para os diferentes parâmetros foram calculadas pelo teste de Kruskal-wallis. Na análise estatística foi utilizado o programa Graphpadprism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, USA) com grau de significância de ( $p < 0,05$ ). No presente trabalho não foi observado diferença estatística entre os protocolos (A e B), para os parâmetros propostos: Percentual de prenhez (55,1 vs 58,1); percentual das fêmeas prenhe, subtraindo-se aborto e morte embrionária (% Efic - 49,3 vs 50,6); Não sexados (N/S 30,3 vs 28,7) ; Machos nascidos ou sexados (Mac - 39,4 vs 44,8) ; Fêmeas nascidas ou sexadas (Fem -30,3 vs 26,3). Pode-se observar que vários fatores interferem para que essas perdas ocorram, podendo esses serem divididos em fatores maternos, externos e ligados ao próprio embrião. Assim pode-se concluir que o resultado que as perdas gestacionais em bovinos caracterizam-se como mortalidade embrionária precoce, mortalidade embrionária tardia e mortalidade fetal, e são independentes dos protocolos utilizados.

**Palavras-chave:** produção, nelore, morte embrionária.

**Keyword:** production, nelore, embryonic death.



## **Comparativo entre benzoato de estradiol e 17-beta-estradiol no desenvolvimento do folículo dominante e taxa de prenhez na IATF em vacas de corte**

*Comparison between benzoate estradiol and 17-beta-estradiol in the development of dominant follicle and pregnancy rate in TAI in beef cows*

**Carlos Eduardo B. Tomaz<sup>1,\*</sup>, Ciro Meirelles<sup>1</sup>, Marcos Felipe Covatti<sup>1</sup>, Gabriel Zolino Agopian<sup>1</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Câmpus de Toledo, PR, Brasil; <sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Câmpus de Curitiba, PR, Brasil.

\*E-mail: kadutomaz@hotmail.com

Desde o advento da inseminação artificial (IA) e dos protocolos hormonais para sincronização do estro seguida da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) busca-se aumentar o número de animais prenhes nas referidas técnicas. Há inúmeros protocolos que utilizam fármacos com diferentes sítios de ação, sendo o benzoato de estradiol e o 17-beta-estradiol hormônios que podem ser utilizados como indutores da ovulação. O presente trabalho objetivou avaliar o desenvolvimento folicular e a taxa de prenhez (TP) de vacas submetidas à IATF utilizando-se o 17-beta-estradiol ou o benzoato de estradiol como indutor de ovulação de forma aleatória. A IA ocorreu 30 horas após sua aplicação. O escore da condição corporal variou de 2,75 a 3,0 (1 a 5). As vacas foram mantidas em pastoreio extensivo de *brachiaria brizantha* e *brachiaria decumbens*, tendo sal mineral e água à vontade. A estação reprodutiva entendeu-se de novembro de 2016 a janeiro de 2017. Para este trabalho foram avaliados 214 protocolos de sincronização e ressincronização de vacas cruzadas com predominante grau de sangue da raça Angus. O protocolo hormonal utilizado na sincronização foi: D0 – benzoato de estradiol (2mg) e implante intravaginal contendo 1g de progesterona (P4); D8 – retirada do implante de P4, D-cloprostenol (150mcg) e eCG (300UI); D9 – benzoato de estradiol (2mg) ou 17-beta-estradiol (1mg) e D10 – IATF. Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo o G1 (n=98) animais induzidos com 1 mg de 17-beta-estradiol e o G2(n=115) animais induzidos com 2mg de benzoato de estradiol. No D10 de cada grupo todos os animais foram submetidos ao exame ultrassonográfico para a mensuração da área do maior folículo ovariano presente (FD). Todos os animais protocolados utilizados para análise dos dados apresentaram FD. Após 30 dias da data de inseminação os animais foram novamente submetidos ao exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação. As TPs do G1 e G2 foram respectivamente 53,9% e 68,4%. Apesar dos valores, não houve diferença significativa ao teste do qui-quadrado (P=0,13) quanto à TP no G1 e G2. Em relação ao desenvolvimento do folículo dominante no dia da IA, observou-se que as áreas (mm<sup>2</sup>) médias dos FDs no G1 (125,35mm<sup>2</sup> ±62,5) e no G2 (116,86mm<sup>2</sup> ±79,8) não apresentaram diferenças significativas ao teste t (P=0,44). Concluímos que o uso do benzoato de estradiol ou 17-beta-estradiol nos protocolos de IATF não influenciaram de forma significativa as taxas de prenhez resultantes das inseminações subsequentes aos tratamentos hormonais ou desenvolvimento dos folículos dominantes no momento da inseminação artificial.

**Palavras-chave:** 17-beta-estradiol, Folículo Dominante, Sincronização.

**Keywords:** 17-beta-estradiol, Dominant Follicle, Synchronization.



## Condrodisplasia tipo *bulldog* em feto bovino abortado

*Chondrodysplasia bulldog type in aborted bovine fetus*

Vinicius Scenegaglia Potasio dos Santos<sup>1,\*</sup>, Claudia Del Fava<sup>2</sup>, Rosa Maria Piatti<sup>3</sup>, João Ferreira<sup>4</sup>, Edviges Maristela Pituco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Anatomia Patológica, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil; <sup>4</sup>Veterinário autônomo.

\*E-mail: [vinicius.scenegaglia.santos@usp.com](mailto:vinicius.scenegaglia.santos@usp.com)

Distúrbios no período gestacional e no puerpério são um dos principais problemas que podem ocorrer na bovinocultura, como o aborto, parto distócico, malformação e natimorto. A condrodisplasia é uma doença congênita, caracterizada por um processo de ossificação anormal, onde a cartilagem intersticial primária tem seu desenvolvimento modificado por alterações genéticas, metabólicas, mecânicas ou vasculares. O bezerro pode apresentar encurtamento proporcional ou desproporcional dos ossos, não tendo viabilidade para a criação quando nascem e por vezes são abortados. As formas de condrodisplasia que mais se destacam são tipo *bulldog* (Dexter), Telemark, Braquicefálico e Dolicocefálico, todas de origem hereditária principalmente. Relatamos um caso de condrodisplasia tipo *bulldog* em feto abortado com 6 meses de gestação, macho, de fêmea de 5 anos, mestiça miniatura, do município de Jaboticabal/SP, onde na mesma propriedade houve 7 outros casos de aborto, com 7 meses aproximadamente de gestação todos. O feto foi encaminhado ao Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico/SP para necropsia e apresentava brachygnathia de mandíbula superior e inferior; protrusão de língua; pescoço curto; membros anteriores curtos e encurvados; caixa torácica pequena, com costelas curtas e muito recurvadas, causando denteamento nos bordos pulmonares; musculatura esquelética pálida; intenso depósito de gordura na carcaça; fígado fibrosado e amarelado; discreta hidrocefalia e ascite. O diagnóstico virológico e parasitológico foi realizado pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos, e o bacteriológico pelo Laboratório de Doenças da Reprodução. Foram feitos os exames para: detecção dos vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Língua Azul (BTV) e *Neospora caninum* (NEO) pelo método PCR em tempo real; detecção do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD), Leptospirose e Toxoplasmose pelo método de PCR convencional e BVD também pelo método de ELISA-Ag e NEO por ELISA-Ac. Todos os resultados foram negativos ou não reagentes. No exame histopatológico observou-se: sistema nervoso central, língua e coração sem alterações dignas de nota; fígado com discretos focos de infiltrado inflamatório mononuclear no parênquima e moderada fibrose periportal com infiltrado inflamatório mononuclear discreto e espessamento de cápsula hepática; pulmão com discreto infiltrado inflamatório mononuclear pleural e intersticial; timo e linfonodo com moderada reação linfóide; baço com discreta reação de polpa branca. As alterações macroscópicas são compatíveis com condrodisplasia tipo *bulldog*. Agentes teratogênicos como o BTV e BVD foram investigados, mas não encontrados, bem como outros patógenos causadores de aborto. O abortamento próximo ao sétimo mês é bastante relatado neste tipo de anomalia. O gene associado à doença é de dominância incompleta, está presente em diversas raças e, quando em homozigose, é letal para o conceito. Os principais fatores de risco são a utilização de reprodutores com histórico de condrodisplasia em seus irmãos ou em sua progênie e acasalamentos endogâmicos, aumentando a chance de homozigose. Os responsáveis pelo manejo reprodutivo das propriedades devem se atentar aos fatores de risco da doença para evitá-la em suas propriedades.

**Palavras-chave:** condrodisplasia, bovino, feto, *bulldog*.

**Keywords:** *chondrodysplasia, bovine, fetus, bulldog.*



## Contagem folicular antral (CFA) e sua associação com características reprodutivas em fêmeas bovinas

*Antral follicular count (AFC) and its association with reproductive traits in cattle*

Gisvani Lopes de Vasconcelos<sup>1</sup>, Marcelo Siqueira El Azzi<sup>2,\*</sup>, Jesús Alfonso Sánchez Viafara<sup>3</sup>, Nathália Alves<sup>4</sup>, Ana Lecia Aparecida Patto Lara Ribeiro<sup>5</sup>, Renata Maculan<sup>1</sup>, Gabriel Miranda Moreira<sup>1</sup>, Louise Marques Coelho<sup>4</sup>, Anita Soares Barbosa Guimarães<sup>6</sup>, Raphael Melo<sup>5</sup>, Cintia Vanin Ribeiro<sup>4</sup>, José Camisão de Souza<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Doutorando em Zootecnia; <sup>2</sup>Mestrando em Zootecnia; <sup>3</sup>Doutorando em Ciências Veterinárias; <sup>4</sup>Graduanda em Medicina Veterinária; <sup>5</sup>Graduando em Zootecnia, UFLA, Lavras, MG, Brasil; <sup>6</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, UFRB, Cruz das Almas, BA, Brasil; <sup>7</sup>Professor de Fisiologia da Reprodução, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

\*E-mail: marceloelazzi@gmail.com

A CFA está intimamente relacionada com a quantidade de oócitos e embriões produzidos, número de embriões por doadora, e eficiência do processo. Este estudo foi conduzido para determinar se CFA está positivamente associado com o CFA total, graus oocitários, oócitos viáveis, total de oócitos e volume ovariano. Ovários foram coletados em abatedouro de 105 fêmeas bovinas mestiças (predominância *Bos taurus taurus*) cíclicas, multíparas e condição corporal 3 e 4 (1- 5) com 3 a 10 anos de idade. Os ovários foram transportados ao laboratório em solução de NaCl 0,9% a 37°C por 1h contendo penicilina (100UI/ml; Sigma) e estreptomicina (50µg/ml; Sigma). Os tratamentos foram divididos em alta (≥25 folículos) (A), intermediária (16- 24 folículos) (M) e baixa (≤ 15 folículos) (B) CFA. Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos de 3 a 8mm de diâmetro utilizando seringa acoplada a agulha 40G. Foram utilizados somente oócitos de qualidade 1 a 3 para o experimento. COCs viáveis foram colocados em gotas de 90 µl de meio de maturação (máximo 30 oócitos) que consistem em TCM-199 com 22 µg/mL de piruvato de sódio, 5 µg/mL de FSH bovino, 10 UI/mL de LH, 20 µg/mL de estradiol, 20 mg/mL de amicacina e 10% de SFB, e equilibrado em incubadora por 2h. A Maturação *in vitro* (MIV) de oócitos das classes de CFA foi realizada em 24h a 38,7°C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada. Os oócitos foram examinados a cada 2 dias usando óptica Nomarski (200-400 ampliação) em microscópio Nikon Diaphot DTM (Nikon, Tokyo, Japan). As análises foram realizadas por programa estatístico SAS® (SAS Institute, Cary, NC, USA). Análise de variância para testar as variáveis reprodutivas (CFA total, graus oocitários G1, G2 e G3, oócitos viáveis, total de oócitos e volume ovariano). O GLM procedido do teste Tukey's para diferenças entre médias individuais. A média ± o erro padrão da média foi utilizada. O P foi significativo quando < 0,05. A CFA total, oócitos de grau 1, oócitos viáveis, total de oócitos e volume ovariano foram maiores em ovários A (69,69±2,144; 7,86±0,603; 30,97±5,173; 12,60±0,739) (p<0,001) comparada com M (36,73±2,383; 4,85±0,670; 13,05±1,235; 38,32±5,750; 10,10±0,750) e B (20,65±2,580; 3,27±0,726; 13,05±1,235; 20,81±6,226; 8,09±0,858). Similarmente, o CFA total, número de folículos saudáveis, número de folículos saudáveis por grama de ovário e número de oócitos morfológicamente viáveis foram menores (P<0,01 a P<0,05) em animais B. Em relação ao volume ovariano, houve uma redução significativa (P<0,001) no peso e tamanho ovariano (comprimento e altura) em ovários B comparado com A. Em consonância, o volume ovariano foi menor (P<0,001 a P<0,05) em B (8,09±0,858) comparado com A (12,60±0,739) durante ondas foliculares. Desta forma, a variação entre os animais nas classes de CFA durante as ondas foliculares foi positivamente correlacionada (r = 0,80-0,90, P<0,01) com variação no peso ovariano e número total de folículos. Em relação à categoria oocitária, número de oócitos com grau 2 e 3 foram maiores (p<0,001) em ovários A (4,02±0,388 em G2; 2,09±0,389 em G3) comparada com M (2,76±0,432 em G2; 2,48±0,439 em G3). Já o B (1,24±0,467 em G2; 1,27±0,468 em G3) foi similar ao M (p=0,009 para G2 e p=0,007 para G3). Sabe-se que em programas de produção de embriões comerciais em larga escala, a variação animal individual no grau oocitário é de suma importância. Estudo recente demonstrou que o número de oócitos viáveis e embriões é maior em oócitos G1 comparados com G2 e G3). A CFA esta diretamente associada a quantidade e qualidade oocitária e ao volume ovariano, indicando que essas características poderão ser facilmente utilizadas em processos de seleção em fêmeas bovinas.

**Palavras-chave:** embrião, bovinos, CFA.

**Keywords:** embryo, cattle, AFC.



## Correlação entre fatores climáticos e temperatura da vulva por termografia infravermelha em vacas de leite

*Correlation between climatic factors and vulva temperature measured by infrared thermography in dairy cows*

**Guilherme P. Bastos<sup>1</sup>, Douglas S. Vivian<sup>1</sup>, Juliana S. Araujo<sup>1</sup>, Leandro Silva<sup>1</sup>, Luana N.F. Chiari<sup>1</sup>, Camila D. Souza<sup>1</sup>, Luiz R.A. Gabriel Filho<sup>2</sup>, Marcelo George M. Chacur<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil;

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Tupã, SP, Brasil.

\*E-mail: chacur@unoeste.br

Atualmente, diversos estudos com uso de termografia digital por infravermelho são realizados com a finalidade de balizar valores de temperatura de áreas do corpo de vacas de leite em diferentes ambientes e climas. A termografia infravermelha é um exame não invasivo e de acurácia para mensurar temperaturas da superfície do corpo de animais. Objetivou-se estudar a correlação de fatores climáticos, entre os meses de janeiro a maio, com a temperatura da região da vulva em vacas de leite da raça Holandesa Preto e Branca. Foram utilizadas 18 vacas da raça Holandesa em lactação, mantidas em pastagem *Urochloa decumbens*, recebendo 2 kg de milho/animal/dia, mistura mineral e água *ad libitum*. Termografia, por infravermelho da região da vulva, foi realizada a cada 30 dias, durante cinco meses, de janeiro a maio, com câmera termográfica (E40®, FLIR, Suécia). As imagens térmicas (termogramas) foram processadas com o programa *Flir Tools 2.1*®, avaliando a vulva como um todo, um ponto específico na sua comissura ventral, dorsal e central. Os fatores climáticos -temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram monitorados com termômetro de globo (ITitwtg 2000®, Instrutemp, Brasil). Para a análise estatística, foi realizada análise de variância, Tukey a 5% e correlação de Pearson. As seguintes médias de temperaturas da vulva foram obtidas: em janeiro 36,7°C; fevereiro 37,4°C; março 33,1°C; abril 38,4°C; maio 33,0°C. Para a temperatura retal as médias foram: em janeiro 38,8°C; fevereiro 38,9°C; março 38,6°C; abril 39,6°C; maio 38,5°C. Houve correlações significativas ( $P < 0,05$ )\* entre: temperatura ambiente (TA) x temperatura retal (TR) de  $r = 0,41^*$ ; TA x temperatura da vulva (TV) de  $r = 0,77^*$ ; umidade relativa do ar (UR) x TR de  $r = -0,36^*$ ; UR x TV de  $r = -0,69^*$ ; TR x TV de  $r = 0,52^*$ ; TA x comissura dorsal da vulva (CD)  $r = 0,72^*$ ; TA x região entral da vulva (CC)  $r = 0,72^*$ ; e TA x comissura ventral da vulva (CV)  $r = 0,62^*$ ; UR x CD  $r = -0,64^*$ ; UR x CC  $r = -0,67^*$ ; e UR x CV  $r = -0,61^*$ . Conclui-se que os fatores climáticos: temperatura ambiente e umidade relativa do ar influenciam de forma significativa a temperatura da vulva. O fator temperatura ambiente influencia com alta correlação positiva a temperatura da vulva. A termografia infravermelha se mostrou como uma ferramenta útil no exame de vacas de leite, sendo recomendada como exame complementar na avaliação ginecológica.

**Palavras-chave:** vacas taurinas. Termograma, temperatura corpórea, vulva.

**Keywords:** *taurine cows, termogram, body temperature, vulva.*



## **Correlação entre temperamento e fertilidade de bovinos de corte**

*Correlation between temperament and fertility of beef cattle*

**Leonardo Severo Dall Asta<sup>1</sup>, Zilah Maria Gervasio Cheuiche<sup>2</sup>, Mara Francelina Severo Dall Asta<sup>3</sup>,  
Tisa Echevarria Leite<sup>4\*</sup>**

<sup>1</sup>Médico Veterinário Autônomo, Bagé, RS, Brasil; <sup>2</sup>Médica Veterinária, Associação Brasileira de Hereford e Braford, Bagé, RS, Brasil; <sup>3</sup>Zootecnista Autônoma, Dom Pedrito, RS, Brasil; <sup>4</sup>Professora da Universidade Federal do Pampa, Dom Pedrito, RS, Brasil.

\*E-mail: tisael@unipampa.edu.br

O temperamento, conjunto de respostas comportamentais apresentadas por um animal frente a modificações no ambiente, pode interferir na determinação de estratégias relativas à eficiência reprodutiva, como para o acasalamento e cuidado das crias, o que pode se refletir nos índices de prenhez e desmame. O objetivo deste trabalho foi observar a associação entre temperamento e fertilidade pós-parto de vacas de corte. O experimento foi conduzido utilizando 98 vacas com cria ao pé de um rebanho comercial, das raças Braford, Brangus, Hereford e Angus, criadas em condições extensivas em campo nativo, no município de Dom Pedrito, na região da Campanha do Rio Grande do Sul. Foram realizadas pesagens, avaliações da condição corporal (CC) e testes de temperamento durante três momentos, com dois meses de intervalo entre os mesmos, iniciando quando as vacas apresentavam 40 dias pós-parto, em média. Os animais foram avaliados quanto ao temperamento, através da utilização do Escore Composto (EC) construído com a avaliação da movimentação, posição corporal, ocorrência de mugidos e coices, audibilidade da respiração e tensão muscular durante o manejo na balança. Foram atribuídos valores ao EC correspondendo a uma escala nominal de 1 a 5, na qual animais identificados com  $EC > 2$  foram classificados como reativos. A análise estatística foi feita no programa SPSS 18, utilizando os testes de Correlação e Qui Quadrado de Pearson. O EC foi correlacionado significativamente de modo negativo com a taxa de prenhez ( $r = -0,209$ ,  $p = 0,039$ ). No entanto, quando submetido à verificação do efeito do escore composto sobre a taxa de prenhez, não foi observado efeito significativo ( $p = 0,353$ ). A ausência de efeito do EC sobre a taxa de prenhez pode ser um indicativo de que o temperamento por si só não exerceu influência determinante sobre a fertilidade das vacas mantidas em situação extensiva. Entretanto, conclui-se que a correlação significativa indica a existência de uma associação, mesmo fraca, que pode influenciar na redução da fertilidade naqueles animais que apresentam temperamento mais reativo.

**Palavras-chave:** comportamento, vacas de corte, eficiência reprodutiva, pós-parto.

**Keywords:** *behavior, beef cows, reproductive efficiency, postpartum.*



## Desempenho de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*

*Performance of recipients of bovine embryos in vitro produced*

**Mônica Zuchelli Jaguszeski<sup>1</sup>, Adalgiza Pinto Neto<sup>2,\*</sup>, Helton A. Garcia Gregianini<sup>3</sup>, Jennifer T. Ferreira Gregianini<sup>4</sup>, Mariana Pedroso<sup>1</sup>, Fernando Skonieski<sup>2</sup>, Marcelo Falci Mota<sup>2</sup>, Antônio Campanha Martinez<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, Realeza, PR, Brasil; <sup>2</sup>Docentes do Curso de Medicina Veterinária (UFFS), Campus Realeza, Realeza, PR, Brasil; <sup>3</sup>Médico Veterinário Autônomo, *In Vitro Acre*, Rio Branco, AC, Brasil; <sup>4</sup>Biomédica, *In Vitro Acre*, Rio Branco, AC, Brasil; <sup>5</sup>Docente do Programa de Pós Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil.

\*E-mail: adalgiza.uffs@gmail.com; adalgiza.neto@uffs.edu.br

O avanço da pecuária brasileira, associado a difusão de biotecnologias, como a produção *in vitro* de embriões, deve-se ao aumento rápido do número de animais geneticamente superiores, diminuição do intervalo de gerações e aumento intensivo na seleção dos animais produzidos. Nesse contexto, analisou-se o desempenho de receptoras de embriões produzidos *in vitro* (PIV) por uma empresa particular (*In Vitro Acre*) localizada em Rio Branco, Acre, nos anos de 2015 e 2016. Para tanto, 4798 embriões PIV foram transferidos a receptoras localizadas em sete diferentes propriedades, sendo quatro no Estado do Acre (3019 embriões), e as outras três, na Bolívia (722 embriões), Peru (423 embriões) e Estado de Rondônia (634 embriões). Analisou-se a taxa de gestação, bem como os efeitos da fazenda, do número de transferências de embriões (TE) por receptora (uma, duas e três a oito vezes), da raça da doadora e do touro (Nelore, Brahman e Gir), do técnico que realizou a TE (três técnicos diferentes), do estágio de desenvolvimento embrionário [mórula, blastocisto (bl) inicial, bl, bl expandido e bl em eclosão ou eclodido], do mês da TE (janeiro, abril, junho, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro), do ano da TE (2015 e 2016) e da época do ano (águas e seca), sobre a mesma, utilizando-se o Teste de Dispersão de Frequência (Qui-quadrado). A taxa de gestação foi de 43,64% (2094/4798), sendo semelhante nas fazendas do Acre, Bolívia e Rondônia ( $p > 0,05$  - 45,25% - 1366/3019, 46,81% - 338/722 e 43,22% - 274/634, respectivamente) e menor na fazenda localizada no Peru ( $p < 0,05$  - 27,42% - 116/423). Taxa de gestação foi semelhante foi observada ao se realizar uma ou mais de oito TE por receptora ( $p > 0,05$ ). A raça Nelore, tanto para a doadora, quanto para o touro, apresentou taxa de gestação superior ( $p < 0,05$ ) quando comparada as raças Brahman e Gir, que apresentaram taxa de gestação semelhantes ( $p > 0,05$ ), sendo de 45,15% (1951/4321), 38,31% (77/201) e 23,91% (66/276) para as doadoras, e de 45,21% (1978/4375), 36,97% (61/165) e 21,32% (55/258) para os touros, das raças Nelore, Brahman e Gir, respectivamente. Os meses de julho a dezembro apresentaram taxa de gestação semelhantes ( $p > 0,05$ ) seguida pelo meses de junho e janeiro (34,44% - 153/398 e 34,76% - 73/210) e abril (18,03% - 11/61), que diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). Nos anos de 2015 e 2016 observou-se taxa de gestação semelhante, sendo de 42,65% (1093/2563) e de 44,79% (1001/2235), respectivamente ( $p > 0,05$ ). De forma semelhante, na época das águas e seca, a taxa de gestação não variou ( $p > 0,05$  - 43,39% - 729/1680 e 43,78% - 1365/3118). A taxa de gestação não variou com o técnico que realizou a TE ( $p > 0,05$ ). Maior taxa de gestação foi observada em embriões PIV no estágio de blastocisto expandido (47,04% - 1294/2751), enquanto a menor no estágio de mórula (25,89% - 87/336) ( $p < 0,05$ ). Nas condições desse estudo, conclui-se que a taxa de gestação de embriões PIV foi influenciada pela fazenda, raça da doadora e do touro, pelo mês da TE e pelo estágio do desenvolvimento do embrião transferido. No entanto, o número de TE por receptora, o ano, a época do ano e o técnico que realizou a TE não influenciaram a mesma.

**Palavras-chave:** taxa de gestação, PIVE, TE, bovinos.

**Keywords:** pregnancy rate, IVPE, ET, bovine.



## **Desempenho de vacas Girolando durante tratamento com PGF2 $\alpha$ no pós-parto precoce** *Performance of crossbred Holstein x Zebu cows with PGF2 $\alpha$ treatment during early postpartum*

**Antônio Jorge Del Rei<sup>1</sup>, Claudio Coutinho Bartolomeu<sup>2</sup>, Caio Tacito Gomes Alvares<sup>3</sup>,  
José Assunção Silveira Júnior<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>UESB, Itapetinga, BA, Brasil; <sup>2</sup>UFRPF, Recife, PE, Brasil; <sup>3</sup>UESC, Ilhéus, BA, Brasil; <sup>4</sup>IFBAIANO, Guanambi, BA, Brasil.  
\*E-mail: jdelrei@yahoo.com.br

A maximização na criação de gado leiteiro tem como base a eficiência reprodutiva, cujo fator mais limitante, no Brasil, é o longo intervalo de partos. Neste cenário atual, a intensificação reprodutiva se torna uma solução viável para rebanho leiteiro. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar os efeitos do tratamento no pós-parto precoce com PGF2 $\alpha$  (Ciosin®, cloprostenol sódico Lab. MSD, SP- BRASIL) sobre a eficiência reprodutiva de vacas mestiças leiteiras Girolando (Gir x Holandês) sincronizadas para reprodução controlada por monta natural, após o período de espera voluntária (PEV, de 45 dias pós-parto). Utilizou-se 240 vacas multíparas com escore de condição corporal médio de  $3 \pm 0,5$  (escala de 1, muito magra, a 6, obesa) e cinco touros de fertilidade comprovada, portando buçal-marcador com tinta. As vacas foram distribuídas em três grupos (G1, G2 e G3) independentes da presença ou ausência de corpo lúteo: no G1 (n=80) foi administrado 500 $\mu$ g de PGF2 $\alpha$  via IM no 15º dia (D15) pós-parto (PP), no G2 (n=80), 500 $\mu$ g de PGF2 $\alpha$  no D30 PP e no G3 (n=80), 500 $\mu$ g de PGF2 $\alpha$  no D45 PP, e nenhum grupo recebeu tratamento com PGF2 $\alpha$  até o final do PEV (D45). Somente após o 45º dia PP (fim do PEV) que todas as vacas foram tratadas com PGF2 $\alpha$  em intervalos de 14 dias até o serviço por monta natural. Quanto ao desempenho reprodutivo entre os grupos, observou-se redução do período à primeira monta no G1,  $62,3 \pm 1,5$  dias ( $P < 0,05$ ) em relação ao G2 ( $72,3 \pm 3,7$ ) e G3 ( $71,3 \pm 3,3$ ), e consequente redução dos dias em aberto:  $117,2 \pm 3,1$  dias no G1 ( $P < 0,001$ ),  $134,6 \pm 2,4$  e  $137,9 \pm 3,2$  dias nos G2 e G3, respectivamente. O número de serviço/concepção também foi menor no G1 ( $1,9 \pm 0,1$  doses,  $P < 0,05$ ) comparado ao G2 ( $2,5 \pm 0,1$ ) e G3 ( $2,4 \pm 0,1$ ). As taxas de prenhez entre os grupos tanto aos  $32 \pm 3$  quanto aos  $62 \pm 3$  dias da monta foram 52,5% (42/80) no G1 ( $P < 0,01$ ), 40,0% (32/80) no G2 42,5% (35/80) no G3. O percentual de vacas *repeat breeders* (RP) foi 10,0% (8/80); 15,0% (12/80) e 17,5% (14/80), respectivamente, tendendo a uma significância ( $0,05 > P < 0,1$ ), o que permite se observar que a frequência da síndrome de vacas RP tendeu a ser diminuída pelo tratamento do G1. Pode-se concluir que o tratamento com PGF2 $\alpha$  a partir do 15º dia pós-parto melhorou a eficiência reprodutiva de vacas Girolando submetidas à monta natural.

**Palavras-chave:** espera voluntária, monta natural, vaca de leite.

**Keywords:** *milk cow, natural mating, voluntary wait.*



## **Deteção de partículas virais do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) em ovários, útero e tubas uterinas de vacas naturalmente infectadas**

*Detection of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) viral particles in ovaries, uterus and uterine tubes of naturally infected cows*

**Vanessa Lopes Dias Queiroz<sup>1</sup>, Eduardo Paulino da Costa<sup>2,\*</sup>, Abelardo Silva Júnior<sup>2</sup>, José Domingos Guimarães<sup>2</sup>, Marcus Rebouças Santos<sup>1</sup>, Saullo Vinicius Pereira Alves<sup>3</sup>, Stella Domingos Vieira<sup>4</sup>, Caroline Gomides Ribeiro<sup>5</sup>, Rebeca Toledo Caldas<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Doutorandos em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV);

<sup>2</sup>Professores do DVT/UFV; <sup>3</sup>Mestrando em Medicina Veterinária DVT/UFV; <sup>4</sup>Médica Veterinária, <sup>5</sup>Bolsistas de Iniciação Científica DVT/UFV, Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: epcosta@ufv.br

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), está praticamente presente em rebanhos bovinos de todo o mundo. Trata-se de uma relevante doença, tendo em vista os transtornos reprodutivos causados, a facilidade de disseminação e o difícil controle. O objetivo deste estudo foi verificar a presença ou não de partículas virais do BoHV-1 em ovários, útero e tubas uterinas de animais naturalmente infectados. Foram coletados órgãos genitais e sangue de vacas abatidas em frigorífico, sem histórico de vacinação contra o BoHV-1. O sangue foi destinado a realização da sorologia em microplacas, a fim de identificar os animais soropositivos para o BoHV-1. Foram retirados fragmentos dos ovários e do segmento cranial, medial e caudal do útero e das tubas uterinas, processados como um *pool* e armazenados em lâminas para a realização da técnica de Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A leitura das lâminas foi realizada no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa utilizando o Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss LSM 510 META. Verificou-se a presença de partículas virais em tecido ovariano, uterino e tubárico de vacas infectadas naturalmente, sendo em substancial quantidade no tecido ovariano. Os resultados ainda são parciais, sendo portanto prematura qualquer afirmação. Contudo, caso estas observações se consolidem, indicariam uma afinidade do vírus com estes órgãos genitais, com destaque para o tecido ovariano. Os resultados obtidos até o presente momento, associados aos obtidos com a continuidade deste estudo poderão fornecer subsídios e informações quanto à patogenia do vírus, especificamente relacionado aos órgãos genitais femininos. Apoio financeiro: FAPEMIG.

**Palavras-chave:** herpesvírus bovino 1, partículas virais, órgãos genitais.

**Keywords:** bovine herpesvirus 1, viral particles, genitals.



## **Diâmetro folicular e fertilidade de vacas mestiças leiteiras submetidas a protocolo de IATF com ajustes no proestro**

*Follicular diameter and fertility of dairy cows submitted to IATF protocol with adjustments in proestrus*

**Alexandra Soares Rodrigues<sup>1,\*</sup>, Tiago Oliveira Brandão<sup>2</sup>, Mariana Alves Andrade Silva<sup>2</sup>, Alessandro Bitencourt Nascimento<sup>2</sup>, Aloísio Bitencourt Nascimento<sup>2</sup>, Ailton Batista Pereira<sup>1</sup>, Jackeline Ferreira dos Santos<sup>1</sup>, Tatiane Marques Bezerra Santos<sup>1</sup>, Bia Santos Souza Caroso<sup>2</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>2</sup>, Marcos Chalhoub<sup>2</sup>, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinar Campus da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil; <sup>2</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: alexandra.rodrigues@ufob.edu.br

Objetivou-se comparar o diâmetro do folículo ovulatório (DFOL) e a taxa de concepção de fêmeas mestiças leiteiras cíclicas submetidas a protocolos de sincronização com uma e duas aplicações de um luteolítico simultâneas ou não a gonadotrofina coriônica equina (eCG). Para tanto, foram utilizadas 116 fêmeas mestiças multíparas 3/4 Gir x Holandês não lactantes com idade média de 5,69±1,06 anos, escore de condição corporal (ECC) de 3,01±0,39 avaliado utilizando-se a escala de 1 a 5 e criadas em sistema extensivo com pastagem predominantemente de *Bachiaria Decumbens*, suplementação mineral e água *ad libitum*. As vacas utilizadas foram selecionadas por meio da avaliação da presença de corpo lúteo (CL) nos ovários por ultrassonografia transretal (US), utilizando-se um transdutor linear com frequência de 6,0MHz, sendo consideradas aptas a participar do experimento aquelas com presença de tecido luteal com diâmetro ≥1,5cm no início do tratamento hormonal. Em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia zero (D0) foi iniciado o protocolo de sincronização por meio da inserção de dispositivo de progesterona (P4) e aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol. No dia sete (D7), os animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina. No dia nove (D9) foi realizada a remoção dos dispositivos de P4 e se aplicou 0,6mg de cipionato de estradiol. Nesse momento, as fêmeas foram subdivididas nos seguintes tratamentos: Grupo Controle – foi administrado 2,5mL de solução fisiológica, Grupo 2PGF – aplicou-se 12,5mg de dinoprost trometamina, Grupo eCG – administrou-se 300UI de eCG, Grupo 2PGF+eCG – foi realizado a aplicação de 300UI de eCG e 12,5mg de dinoprost trometamina. No dia 11 (D11) do protocolo de sincronização previamente a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), todos os animais foram examinados por US para mensuração do DFOL. As inseminações foram realizadas utilizando sêmen criopreservado de um único touro da raça Girolando. O diagnóstico de gestação foi realizado por US 55 dias após a IATF. Os dados obtidos foram processados pelo SPSS considerando  $P \leq 0,05$ , para avaliar as diferenças entre as médias de DFOL utilizou-se a análise de variância e o teste de Tukey, a taxa de concepção entre os grupos foram comparadas empregando o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). A média geral do DFOL foi de 11,63±2,76mm, sendo que os tratamentos Controle e eCG apresentaram um DFOL de 11,53±2,64 e 11,52±2,98mm, semelhante aquele apresentado pelos grupos 2PGF e 2PGF+eCG de 11,36±3,02 e 12,13±2,51mm, respectivamente. No que se refere aos índices de fertilidade, não houve diferença entre os grupos experimentais Controle, 2PGF, eCG e 2PGF+eCG apresentando taxas de concepção de respectivamente, 41,9%; 46,7%; 42,9% e 59,3%. O diâmetro folicular e os índices de fertilidade não foram afetados pelo tratamento com uma e duas aplicações de um agente luteolítico simultâneas ou não ao eCG sugerindo que em animais cíclicos a utilização de protocolos de sincronização com uma única dose prostaglandina e sem o suporte gonadotrófico do eCG parece proporcionar adequada resposta folicular e índices de fertilidade satisfatórios.

**Palavras-chave:** bovinos, gonadotrofina coriônica equina, luteólise, taxas de concepção.

**Keywords:** bovine, conception rate, equine chorionic gonadotropin, luteolysis.



## Dinâmica da proteína cinase II dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina II durante a capacitação de espermatozoides bovinos

*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II dynamics during bovine sperm capacitation*

Thais de Sousa Santos<sup>1</sup>, Isabelle Scarpini Contrim<sup>1</sup>, Daniela Franco da Silva<sup>2</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção<sup>3</sup>, Fabiola Freitas de Paula Lopes<sup>1</sup>, Weber Beringui Feitosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>DCB - UNIFESP, Diadema; <sup>2</sup>IB - UNESP, Botucatu; <sup>3</sup>FMVZ, USP, São Paulo, Brasil.

\*E-mail: feitosawb@hotmail.com

As alterações bioquímicas e fisiológicas que promovem a capacidade fecundante dos espermatozoides são conhecidas como capacitação espermática. Como parte deste processo, os espermatozoides desenvolvem batida flagelar assimétrica conhecida como hiperativação e adquirem a capacidade de sofrer a reação acrossômica. A proteína cinase II dependente de  $Ca^{2+}$  e calmodulina (CamKII), é uma serina/treonina envolvida nos eventos da capacitação espermática, como na regulação da hiperativação. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a dinâmica da localização da CamKII durante a capacitação de espermatozoides bovinos. Para isso, o sêmen foi descongelado e centrifugado em gradiente de Percoll (45/90%) a 9000 g por 5 minutos, sendo o sedimento ressuspense e lavado em meio não-capacitante (TL-Fert sem cálcio e bicarbonato) a 900 g por 2,5 minutos. Após a separação, os espermatozoides foram imediatamente processados (Controle 0h) ou ressuspensos em meio não-capacitante ou em meio capacitante (TL-Fert suplementado com albumina sérica bovina; BSA) na concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL e incubados a 38,5°C e 5%  $CO_2$  por 4 horas. Ao término de cada tratamento, os espermatozoides foram fixados em paraformaldeído 3,7% por 30 minutos, permeabilizados em triton X-100 0,1% por 10 minutos e bloqueados em 1% de BSA em PBS overnight. Após o bloqueio, os espermatozoides foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-CamKII (isoformas alfa, beta, gama e delta) ou coelho anti-CamKII fosforilada em treonina 286 (T286; fosfoCamKII) na diluição de 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida os espermatozoides foram lavados e incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor-555 anti-IgG de coelho na diluição de 1:200 por 1 hora a temperatura ambiente. O DNA dos espermatozoides foi corado com Hoescht 33342 (5  $\mu$ g/ml) e a membrana acrossomal com FITC-PSA (100  $\mu$ g/ml). Ao término da imunofluorescência, os espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, e as imagens analisadas pelo software image J. Foram realizadas 3 replicatas, sendo avaliada 100 células por tratamento em cada replicata. Os dados foram analisados estatisticamente pelo SAS empregando o teste 't-student'. Os resultados da imunofluorescência demonstraram que no espermatozoide pós-descongelamento (Controle 0h), a CamKII foi observada ao longo da cauda e peça intermediária. Esse padrão de localização não foi afetado pela incubação tanto no meio não-capacitante quanto no meio capacitante. A CamKII também foi observada na cabeça do espermatozoide em dois padrões (P) distintos: P1 – Alta concentração na região pós-acrossomal e; P2 – Alta concentração na região acrossomal. Nos espermatozoides pós-descongelamento a maior parte das células apresentavam o padrão 1 ( $93,1 \pm 3,9$  % P1 *versus*  $6,9 \pm 3,9$  % P2). Seguindo 4 horas de incubação em meio não-capacitante, embora tenha ocorrido um aumento na porcentagem de células no padrão 2, a maioria dos espermatozoides apresentavam o padrão 1 ( $65,7 \pm 3,9$  % P1 *versus*  $34,3 \pm 3,9$  % P2). Contudo, esse padrão se inverteu após 4 h de incubação em meio capacitante, no qual a maior parte dos espermatozoides apresentavam o padrão 2 ( $21,3 \pm 3,9$  % P1 *versus*  $78,7 \pm 3,9$  % P2). Ao avaliar a fosforilação da CamKII em T286, foi observado que a totalidade dos espermatozoides apresentavam a fosfoCamKII na peça intermediária e cauda dos espermatozoides. A fosfoCamKII também foi observada na cabeça dos espermatozoides, no qual o padrão predominante observado foi na região apical do acrossomo. Esse padrão de localização da fosforilação em T286 da CamKII na região apical do acrossomo não foi afetado pela incubação em meio não-capacitante ( $82,2 \pm 2$  %) ou capacitante ( $85,9 \pm 2$  %) comparados aos espermatozoides pós-descongelamento ( $79,1 \pm 2$  %). Conclui-se que a capacitação espermática resulta na translocação da CamKII total da região pós-acrossomal para a região acrossomal sem afetar a localização da CamKII fosforilada em T286.

**Palavras-chave:** acrossomo; fosforilação; maturação espermática.

**Keywords:** *capacitation, fertilization.*

\*Bolsista do programa "Atração de Jovens Talentos" do Ciências Sem Fronteiras, CAPES - CSF-PAJT - 88887.068701/2014-00.



## **Dinâmica folicular e taxa de prenhez de novilhas e vacas cruzadas produtoras de leite submetidas à IATF**

*Follicular dynamics and P/AI in dairy crossbred heifers and cows submitted to TAI*

**Lucas Oliveira e Silva<sup>1\*</sup>, Laís Reis Carvalho<sup>1</sup>, Paulo Henrique Alves Marinho<sup>1</sup>, João Bosco Barreto Filho<sup>2\*</sup>, José Nélio de Sousa Sales<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

\*E-mail: lucasoo18@hotmail.com; barreto@dmv.ufla.br

O objetivo do estudo foi avaliar a dinâmica folicular e fertilidade de novilhas e vacas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) produtoras de leite submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. Foram utilizadas 19 vacas em lactação e 67 novilhas com idade média de  $26,0 \pm 0,2$  meses. Os animais foram submetidos ao protocolo de IATF que consistiu em administrar 2 mg de benzoato de estradiol e um implante intravaginal de progesterona (FertilCare 1200, Vallée, Montes Claros) previamente utilizado por 8 dias no D0. Oito dias depois (D8), o implante foi retirado e administraram-se 0,5 mg de prostaglandina (Sincrosin, Vallée, Montes Claros). No D9, administraram-se 1 mg de benzoato de estradiol (FertilCare sincronização, Vallée, Montes Claros). A inseminação artificial foi realizada 48 horas após a retirada do implante de progesterona (D10). A dinâmica folicular foi realizada por ultrassonografia no D-20 e no D0 para avaliar o número total de folículos e a presença de corpo lúteo (CL). Além disso, exames ultrassonográficos foram realizados no D8 e D10 para avaliar o diâmetro do folículo dominante e a taxa de crescimento final do folículo. A taxa de ovulação foi avaliada no D15 e o diagnóstico de gestação realizado no D40 e D70. Não houve diferença entre novilhas e vacas quanto ao número de folículos recrutados ( $P=0,89$ ) e à presença de CL antes da sincronização ( $P=0,09$ ). Além disso, a taxa de crescimento final do folículo dominante ( $P=0,29$ ), a taxa de ovulação ( $P=0,12$ ), a taxa de prenhez aos 30 dias ( $P=0,08$ ) e aos 60 dias ( $P=0,23$ ) e perda embrionária ( $P=0,31$ ) foram semelhantes entre as categorias de animais. No entanto, verificou-se que novilhas possuem menor diâmetro do folículo ovulatório no D10 ( $10,0 \pm 0,5$  mm em novilhas e  $14,2 \pm 0,9$  mm em vacas;  $P=0,001$ ) e menor diâmetro do CL no D15 ( $14,8 \pm 0,6$  mm em novilhas e  $23,1 \pm 1,3$  mm em vacas;  $P=0,001$ ). Em relação à ciclicidade dos animais no início do protocolo, a taxa de prenhez das novilhas e das vacas foi de 43,8% e 45,5% nas fêmeas cíclicas e 12,0% e 50,0% nas fêmeas não cíclicas, respectivamente. A taxa de prenhez final foi de 29,8% nas novilhas e 42,1% nas vacas. Conclui-se que novilhas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus* produtoras de leite possuem menor diâmetro do folículo ovulatório e menor diâmetro do CL do que vacas.

**Palavras-chave:** folículo; prenhez; reprodução; fertilidade; categoria animal.

**Keywords:** follicle; pregnancy; reproduction; fertility; animal category.



## Dipeptídeo alanil-glutamina e glicil-glutamina em meio para maturação *in vitro* de oócitos bovinos

*Dipeptide alanyl-glutamine and glycyl-glutamine in medium for in vitro maturation of bovine oocytes*

**João Filipi Scheffer Pereira<sup>1,2,\*</sup>, Jonathan Jesus da Silva<sup>1</sup>, Cátia de Paula Sant'Anna<sup>1</sup>, Maria Theresa Scheffer Pereira da Silva<sup>1</sup>, Hellen Braga<sup>2</sup>, Alessandra Lazarin<sup>2</sup>, Liédge Camila Simioni Felício<sup>1,2</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>1</sup>, Maurício Barros Fernandes<sup>3</sup>, Cristina Santos Sotomaior<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Brasil; <sup>3</sup>PrófiV Genética Animal, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

\*E-mail: joao.filipi@gmail.com

Em meios de produção *in vitro* de embriões bovinos o aminoácido glutamina é adicionado nas etapas de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV). A glutamina é um aminoácido conhecidamente instável em soluções aquosas como os meios de produção *in vitro* de embriões. Desta forma a quebra da molécula de glutamina libera componentes tóxicos no meio de cultivo da produção *in vitro* de embriões. O objetivo desta pesquisa é avaliar a substituição da glutamina por dipeptídeos alanil-glutamina (Ala-gln) e glicil-glutamina (Gli-gln) no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Oócitos obtidos de ovários coletados em frigorífico foram destinados ao Laboratório experimental de Cultivo Celular - PUCPR, condicionados em solução fisiológica a 37°C. Os folículos antrais entre 3-8 mm foram aspirados, os oócitos de grau 1 e 2 selecionados e divididos em grupos de 25 unidades, colocados em maturação *in vitro* por 24 h, em TCM 199 contendo glutamina (0,06849 mM/mL) ou peso molar equivalente de ala-gln ou gli-gln, SFB (10%), piruvato (22 µg/mL), FSH (0,5 µg/ml), LH (10 UI/mL), estradiol (1 µg/mL) e sulfato de amicacina (0,1 mg/mL). A fertilização *in vitro* foi realizado por 22 h, em meio Fert-Talp contendo BSA (0,6 g/L), PHE (440 µg/mL), heparina (10 UI/mL) e sulfato de amicacina (0,1 mg/mL). Mesmo lote e partida de sêmen congelado de único reprodutor foi utilizado em todos os experimentos, o sêmen foi selecionado utilizando o gradiente Bovipure®, a dose inseminante foi de 10 µL na concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O cultivo *in vitro*, foi realizado em meio CR2 contendo BSA (0,005g/mL), SFB (5%), sulfato de amicacina (0,1 mg/mL), glutamina (0,00034 mM/mL), alanina (0,1 mM/mL) e glicina (0,1 mM/mL) por 8 dias. No experimento 1, Ala-gln foi aplicado no meio de MIV em substituição da glutamina em peso molar equivalente. No experimento 2, Gli-gln foi aplicado no meio de MIV em substituição da glutamina em peso molar equivalente. A avaliação dos embriões foi realizada por meio da cinética de desenvolvimento embrionário *in vitro* nos dias 3 (d3), 7 (d7) e 8 (d8) de CIV. Não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) na taxa de clivagem em d3 nos experimentos 1 e 2 para os grupos controle (67,02/67,99%) e tratado (70,43/69,13%) respectivamente. Em d7 e d8 respectivamente, foram encontradas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) na taxa de produção de embriões entre os grupos controle (21,82/25,73%) e tratado (33,66/36,41%) do experimento 1. Para o experimento 2, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre controle (17,51/26,3%) e tratado (23,08/31,98%) em d7 e d8 respectivamente. Em d8, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) na taxa de eclosão embrionária entre os grupos controle e tratado do experimento 1 (42,24/58,34%) e experimento 2 (67,42/76,05%). Em conclusão, o dipeptídeo alanil-glutamina é uma importante alternativa em substituição a glutamina, aumentando a taxa de produção de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** dipeptídeos, maturação *in vitro*, bovinos.

**Key words:** dipeptides, *in vitro* maturation, bovine.



## **Efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol no ejaculado sobre a qualidade do sêmen refrigerado de touros adultos da raça Nelore**

*Effect of addition of cholesterol-loaded cyclodextrin in ejaculate on the quality of cooled semen of Nelore bulls*

**Douglas Potratz Rodrigues<sup>1</sup>, Leonardo Franco Martins<sup>2\*</sup>, Silvio Henrique Dias Ferreira<sup>3</sup>, Caio Eduardo Phillipsen<sup>3</sup>, Carlos Eduardo Andreotti Linhares<sup>3</sup>, André Giarola Boscarato<sup>3</sup>, Victor Henrique Miquelanti<sup>2</sup>, Luiz Henrique Garcia Abreu<sup>2</sup>, Juliano Pianowski Marques da Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando do programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná, Brasil;

<sup>2</sup>Professor do programa em Ciência Animal da Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná, Brasil; <sup>3</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná, Brasil; <sup>4</sup>Doutorando do programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná, Brasil.

\*E-mail: leonardomartins@prof.unipar.br

A perda de colesterol da membrana plasmática de células refrigeradas pode causar uma capacitação prematura, reduzindo a viabilidade de espermatozoides no trato reprodutivo feminino. O colesterol pode ser incorporado nas membranas plasmáticas das células usando ciclodextrinas. O complexo ciclodextrina-colesterol pode interagir com os componentes lipídicos da gema de ovo contidos no diluente, transferindo o colesterol a estes compostos ao invés da membrana espermática, fato que não ocorre quando se utiliza um diluente a base de lecitina de soja. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) durante o resfriamento de espermatozoides de touros da raça Nelore com diluentes a base de gema de ovo e lecitina de soja sobre os aspectos físicos, morfológicos e integridade da membrana plasmática. Foram utilizados três touros da raça Nelore com idade média de três anos criados em regime de pastejo com suplementação mineral. Pelo método de eletroejaculação, foram obtidos quatro ejaculados de cada touro para serem submetidos a refrigeração. Cada ejaculado foi dividido em quatro tratamentos com e sem a adição de 2mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides com o diluente a base de gema de ovo, e com e sem a adição CCC para cada  $120 \times 10^6$  de espermatozoides com o diluente a base de lecitina de soja. A concentração espermática nas amostras diluídas foi ajustada para 30 milhões de espermatozoides totais por palheta de 0,25mL. Após a adição de CCC, foi feita homogeneização manual e os tubos foram mantidos por um período de incubação em banho maria por 15 minutos à 37°C. Após o resfriamento das amostras foi realizada a análise da motilidade espermática retilínea progressiva e vigor espermático e a integridade física da membrana (coloração Supravital) nos tempos 0, 24 e 48 horas após a diluição do sêmen. Não foram observadas diferenças entre as médias de todos os aspectos físicos e morfológicos do sêmen dos touros ( $P > 0,05$ ). Foram detectadas diminuição na motilidade retilínea progressiva, vigor espermático e coloração Supravital durante o resfriamento, ao longo do tempo de incubação ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre as médias do teste Supravital, motilidade espermática retilínea progressiva e vigor espermático entre os tratamentos nos tempos de 24 e 48 após a diluição ( $P > 0,05$ ). A integridade física da membrana plasmática apresentou uma relação com os principais aspectos físicos do ejaculado, correlações positivas e altas foram observadas do teste Supravital realizado em sêmen *in natura* com a motilidade espermática progressiva retilínea (0,64) e turbilhonamento (0,7). Conclui-se que a adição de CCC ao ejaculado não influencia a qualidade espermática do sêmen refrigerado nas condições utilizadas para realizar a incorporação da CCC realizados no presente experimento.

**Palavras-chave:** bovinos, criopreservação, espermatozoide, membrana espermática.

**Keywords:** bovine, cryopreservation, spermatic membrane, spermatozoa.



## **Efeito da bainha de inseminação sobre a ocorrência retenção residual de sêmen e taxa de concepção de vacas submetidas à inseminação artificial em tempo-fixado**

*Influence of the insemination sheath on the semen retention in the AI gun and conception rate in fixed time AI in cows*

**Helton Nunes Pinto<sup>1</sup>, Vivian Matzkeit<sup>1</sup>, Tiago Camargo<sup>1</sup>, Gustavo Mendes Gomes<sup>2</sup>, Kleber Peixoto Jr<sup>3</sup>, André Maciel Crespillo<sup>2,3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Norte Consultoria Agropecuária, Coxim, MS, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil.

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

Inúmeros fatores como sanidade e status nutricional das matrizes, qualidade do sêmen, habilidade e comprometimento de inseminadores, além da eficiência dos protocolos hormonais podem influenciar o sucesso de um programa de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF) em bovinos. Além disso, a qualidade do material empregado para a inseminação artificial (IA) também pode representar importante fonte de variação para os resultados da IATF. O objetivo do estudo foi verificar o efeito do modelo de bainha utilizada para IA sobre a ocorrência de retenção residual de sêmen e fertilidade de vacas sincronizadas para IATF. Doses de sêmen comerciais previamente selecionadas para IATF (valores médios para motilidade espermática total de 63,4%, integridade de membrana plasmática 43,2%, defeitos espermáticos maiores 16,17%, concentração de 18,82 milhões células/dose) foram descongeladas em banho-maria (37°C/30 segundos) e aleatoriamente montadas em um dos 3 modelos de bainha para inseminação em teste: marca líder no mercado global (G1), modelo líder no mercado nacional (G2), modelo nacional identificado como de baixa taxa de retenção residual de sêmen. As bainhas foram montadas em aplicadores universais para a IA em bovinos e randomicamente utilizadas para a IATF de 859 vacas Nelore ou ½ sangue, sincronizadas através de dispositivos intravaginais de progesterona de uso único, que permaneceram nos animais por 8 dias, seguido da indução de ovulação e inseminação 48-52 horas após a retirada dos implantes. Após cada IA às bainhas foram inspecionadas individualmente para constatação da presença (1) ou ausência (0) macroscópica de retenção residual de sêmen. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 30 dias após a IATF. Os dados gerados foram analisados através de modelo de análise de variância (GLM-SAS®, USA), considerando os efeitos da bainha de IA, qualidade de sêmen, lote, touro e escore de condição corporal (ECC) das vacas como variáveis independentes. A taxa de concepção foi de 58,96<sup>a</sup> (n=181/307), 58,39<sup>a</sup> (n=160/274) e 59,35<sup>a</sup> (n=165/278), respectivamente para os grupos G1, G2 e G3 (p=0,4773). Não houve efeito de qualidade do sêmen, lote, touro, ECC, bem como suas interações sobre as taxas de concepção. No entanto, efeito significativo da bainha de IA foi observado para a retenção residual de sêmen, que foi de 10,42%<sup>a</sup> para G1, 22,99%<sup>b</sup> para G2 e 0,72%<sup>c</sup> para G3 (p<0,0001). Conclui-se que a qualidade da bainha exerce influência na taxa de retenção residual de sêmen, determinando desperdícios quanto à deposição de células espermáticas no aparelho reprodutor de fêmeas bovinas durante a IATF. Como em nosso estudo as doses de sêmen foram previamente selecionadas, não foram observadas as prováveis interações entre a bainha utilizada para IA e a qualidade e concentração espermática.

**Palavras-chave:** bainha, inseminação artificial em tempo-fixado, sêmen.

**Keywords:** *fixed-time artificial insemination, insemination sheath, semen.*

**Agradecimentos:** Watanabe Tecnologia Aplicada, Sertãozinho, SP e Fazenda Recanto Paraíso, Sonora, MS.



## **Efeito da ingestão de água tratada por campo magnético no sêmen e proteínas do plasma seminal em touros Nelore (*Bos taurus indicus*)**

*Effect of magnetic field-treated water intake on semen and seminal plasma proteins in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*)*

**Isamara Batata Andrade<sup>1,5</sup>, Camila Dutra de Souza<sup>1</sup>, Fernanda Luiza G.B. Deak<sup>1</sup>, Caio O. Siqueira<sup>2</sup>, Pedro A.A. Alcântara<sup>2</sup>, Gabriela C. Figueiredo<sup>2</sup>, Camila P. Cremasco<sup>3</sup>, Luiz Roberto A. Gabriel Filho<sup>3</sup>, Fernando Ferrari Putti<sup>3</sup>, Luciana Guaberto<sup>4</sup>, Marcelo George Mungai Chacur<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-Graduandos em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil;

<sup>2</sup>Graduandos do Curso de Medicina Veterinária (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>3</sup>Docentes - Universidade Estadual Paulista-UNESP, Tupã, SP, Brasil; <sup>4</sup>Docentes - Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

\*E-mail: isamara\_batata@hotmail.com

Objetivou-se estudar o efeito da água tratada por campo magnético no espermiograma e perfil proteico do plasma seminal em bovinos da raça Nelore, mantidos à pasto e em confinamento. Durante 7 meses foi fornecida *ad libitum* água tratada por campo magnético pelo dispositivo magnetizador Sylocimol Rural, da empresa Timol Indústria e Comércio de Produtos Magnéticos, mergulhado e fixado no fundo do bebedouro do grupo tratado. Para o Grupo 1 - tratado (n=10) machos da raça Nelore, com idade inicial de 14 meses, ingeriram *ad libitum* água tratada por campo magnético. O Grupo 2 - controle (n=10) machos, da mesma raça e idade, receberam *ad libitum* água mineral de fonte natural. Ambos os grupos foram submetidos a idênticas condições de manejo, sendo nos primeiros 4 meses em regime de pasto e, subsequentes 3 meses em regime de confinamento. Foram obtidas amostras de sêmen dos 20 animais em 4 colheitas, sendo duas coletas com os animais em regime de pasto e duas coletas no confinamento, totalizando 80 amostras de sêmen coletadas e avaliadas quantitativamente e qualitativamente com posterior identificação de bandas proteicas do plasma seminal por eletroforese em SDS-PAGE. As características quantitativas e qualitativas do sêmen não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) em nenhum parâmetro quando comparados o grupo tratado (ingestão de água magnetizada) e o grupo controle. No grupo controle, a média do volume ejaculado foi de  $2.16 \pm 1.00$ , turbilhonamento  $0.33 \pm 0.15$ , motilidade  $46.67 \pm 10.33$ , defeitos maiores  $13.29 \pm 10.75$ , defeitos menores  $7.88 \pm 6.03$  e defeitos totais  $19.50 \pm 13.42$ . No grupo tratado, a média do volume ejaculado foi de  $2.81 \pm 2.17$ , turbilhonamento  $0.11 \pm 0.20$ , motilidade  $43.33 \pm 21.60$ , defeitos maiores  $15.56 \pm 20.76$ , defeitos menores  $19.11 \pm 14.32$  e defeitos totais  $33.56 \pm 21.63$ . A análise dos géis da eletroforese em SDS-PAGE possibilitou a identificação de 10 bandas de proteínas, sendo: 18, 20, 26, 27, 30, 36, 44, 50, 55 e 66KDa. As bandas de 66, 36 e 18KDa foram as com menor incidência, e as bandas de 20 e 50KDa foram as de maior incidência nas amostras de plasma seminal. Conclui-se que a ingestão de água tratada por campo magnético não influenciou de forma significativa as características do espermiograma e das proteínas do plasma seminal em touros criados à pasto e em confinamento. A água tratada por campo magnético pode ser fornecida aos touros sem afetar a qualidade do sêmen.

**Palavras-chave:** machos, SDS-PAGE, manejo extensivo, manejo de confinamento.

**Keywords:** bulls, SDS-PAGE, extensive management, confinement management.

## **Efeito de diferentes concentrações de soro fetal bovino sobre o teor lipídico e o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro***

*Effect of different concentrations of fetal bovine serum on the lipidic content and development of embryos produced in vitro*

**Karynne de Nazaré Lins de Brito<sup>1\*</sup>, Ana Júlia Mota de Lima<sup>2</sup>, Nathália Nogueira da Costa<sup>3</sup>, Thiago Velasco Guimarães<sup>4</sup>, Mauro Andrey Rodrigues Moraes<sup>2</sup>, Marcielly de Fátima da Costa Lobato<sup>2</sup>, Eduardo Baia de Souza<sup>2</sup>, Moisés Moreira Lima<sup>2</sup>, Vanessa Cunha de Brito<sup>2</sup>, Anelise de Sarges Ramos<sup>5</sup>, Simone do Socorro Damasceno Santos<sup>6</sup>, Otávio Mítio Ohashi<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Pará, Altamira, PA, Brasil; <sup>2</sup>Bolsista PIBIC/CNPq, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil; <sup>3</sup>Bolsista da Capes Projeto 88881.0681/2014-01; <sup>4</sup>Professor da escola da aplicação da UFPA, PA, Brasil; <sup>5</sup>Residente em Reprodução Animal da UFRA, Belém, PA, Brasil; <sup>6</sup>Professor da Universidade Federal do Pará, PA, Brasil.

\*E-mail: anajuliamotadelima@gmail.com

A fim de se obter embriões *in vitro* de melhor qualidade, a suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino (SFB) é amplamente utilizada, entretanto apresenta um ponto negativo por estar relacionado ao maior acúmulo lipídico intracelular nos embriões. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de SFB sobre o desenvolvimento embrionário e o acúmulo lipídico, e definir qual a melhor concentração de SFB a ser utilizada no cultivo *in vitro* de embriões de modo a diminuir tal acúmulo sem afetar negativamente o desenvolvimento dos embriões. Para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) os ovários bovinos foram obtidos de abatedouro local e no laboratório os Complexos Cumulus-Oophorus (CCOs) foram selecionados e, posteriormente, fecundados utilizando-se sêmen de um único touro 22 horas após a maturação. Aproximadamente 24 horas após a FIV, os prováveis zigotos foram transferidos para gotas com meio de SOF (Synthetic fluid oviduct) de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo sem SFB, Grupo 2,5% (meio SOF acrescido de 2,5% de SFB); Grupo 5% (meio SOF acrescido de 5% de SFB) e Grupo 10% (meio SOF acrescido de 10% de SFB). Os embriões foram cultivados durante sete dias com análise da clivagem no 2º dia e taxa de blastocisto no 7º dia. A quantificação das gotas lipídicas foi feita através da marcação com corante Sudan Black a 1%. A quantificação foi realizada através da quantidade de pixels por meio do programa ImageJ. As taxas de desenvolvimento embrionário e quantificação do conteúdo lipídico foram submetidos à ANOVA, com o pós-teste de Holm-Sidak, adotando-se o nível de significância de 5% no programa SIGMAPLOT 11.0. No que refere-se à suplementação com diferentes concentrações de SFB sobre o desenvolvimento embrionário, não observou-se diferença na taxa de clivagem entre os grupos experimentais; já em relação a taxa de blastocisto foi observado um aumento na taxa nos três grupos respectivamente (39,1±8,5, 42,4±13,6 e 32,2±10,2) suplementados com SFB em relação ao grupo sem suplementação (5,1±1,0), contudo não houve diferença na taxa entre os três grupos cultivados com SFB. O grupo suplementado com 2,5% (175,6±26,5) apresentou diferença na quantidade de gotas lipídicas intracitoplasmáticas em relação aos grupos cultivados com 5% (203,9±15,5) e 10% (194,1±22,0) de SFB, assim como com o grupo sem SFB (189,2±22,4), sendo claramente observada a menor quantidade de gotas lipídicas. Nossos resultados sugerem que a suplementação com SFB, independente da sua concentração, favoreceu quantitativamente o desenvolvimento embrionário devido aumentar a taxa de blastocisto em D7. Além disso, a suplementação do meio de cultivo com 2,5% de SFB diminuiu o acúmulo lipídico, o que pode favorecer a qualidade do embrião no processo de criopreservação.

**Palavras-chave:** soro fetal bovino, gotas lipídicas, produção *in vitro* de embriões bovinos.

**Keywords:** bovine fetal serum, lipid droplets, *in vitro* production of bovine embryos.



## **Efeito de diferentes concentrações de taurina na refrigeração de espermatozoide epididimários de bovinos**

*Effect of different concentrations of taurine on the cooling of bovine epididymal spermatozoa*

**André Luiz Pereira Tork<sup>1\*</sup>, Alex Souza Rique<sup>1</sup>, Amanda Freire de Souza<sup>1</sup>, Camilla Flávia Avelino de Farias<sup>1</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos do curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; <sup>2</sup>Professora do curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

\*E-mail: andptork@gmail.com

A criopreservação de espermatozoides é uma biotécnica importante para aumentar o tempo de viabilidade celular e otimizar a reprodução e propagação de genes de animais com dificuldade de monta ou com grande valor genético agregado. A taurina é um aminoácido que tem potencial antioxidante e regula o colesterol; estes efeitos são amplamente desejados na refrigeração (5 °C) de células devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso durante o processo, que tornam a membrana celular alvo de degradação. Desta forma, objetivou-se estudar o efeito da adição de taurina na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos. Os espermatozoides foram obtidos através da extração, pela técnica de flutuação, da cauda do epidídimo de bovinos abatidos. Os espermatozoides (sptz) recuperados foram avaliados quanto à motilidade e selecionados para a formação de um *pool*, e foram divididos em quatro grupos experimentais, com diferentes concentrações de taurina: TAC= sptz (grupo controle; sem taurina); TA5= sptz + 5 mM de taurina; TA25= sptz + 25 mM de taurina; TA50= sptz + 50 mM de taurina. Os grupos foram submetidos à avaliação em três diferentes testes: motilidade, integridade e funcionalidade de membrana plasmática, em três diferentes tempos de refrigeração a 5 °C: 0h de estabilização na temperatura de 5 °C, 24h e 48h. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, sendo considerada a significância de 5%. Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão. Quanto a motilidade observada em 0h: TAC= 68,30±8,28; TA5= 73,30±5,28; TA25= 73,28±7,92; TA50= 59,95±20,52. A motilidade em 24h pós-estabilização foi: TAC= 63,3±4,31; TA5= 70,8±5,68; TA25= 67,05±17,26; TA50= 55,8±20,41. Após 48h de refrigeração foi observado: TAC= 63,10±7,79; TA5= 62,05±6,57; TA25= 55,83±15,74; TA50= 58,73±6,43. Não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tempos de refrigeração e os grupos utilizados para o parâmetro motilidade. No teste de integridade de membrana, no tempo de 0h: TAC= 83,05±2,59; TA5= 83,3±3,22; TA25= 84,70±4,29; TA50= 83,63±4,04 em porcentagem de células com membrana íntegra. Em 24h de refrigeração a porcentagem de células com membrana íntegra foi de TAC= 75,78±4,69; TA5= 75,3±3,88; TA25= 78,65±2,09; TA50= 69,98±5,64, e em 48h TAC= 75,28±6,38; TA5= 76,43±6,89; TA25= 76,4±2,73; TA50= 76,45± 2,96. Observou-se que a partir de 24h de refrigeração houve redução na integridade da membrana celular ( $P > 0,05$ ) porém não houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre as concentrações de taurina. Quanto à funcionalidade de membrana: 0h: TAC= 71,08±5,76; TA5= 67,03±13,02; TA25= 71,2±8,37; TA50= 64,78±10,36; 24h: TAC= 62,95±13,15; TA5= 66,3±9,76; TA25= 67,48±7,95; TA50= 59,3±12,33; 48h: TAC= 61,03±5,85; TA5= 59,98±13,65; TA25= 60,28±14,98; TA50= 59,70±14,02. Não foi observada diferença entre os grupos e os tempos de armazenamento ( $P < 0,05$ ) para este parâmetro. Diante disso conclui-se que a adição de taurina não influencia na qualidade de espermatozoides retirados da cauda do epidídimo de bovinos e submetidos à refrigeração a 5 °C por até 48 horas.

**Palavras-chave:** aminoácido, criopreservação, epidídimo.

**Keywords:** amino acid, cryopreservation, epididymis.



## **Efeito do bloqueio da Na, K-ATPase em espermatozoides bovinos descongelados**

*Effect of Na, K-ATPase blocking on thawed bull sperm*

**Elton Amorim Romão<sup>1</sup>, Aline Saraiva de Oliveira<sup>2</sup>, Lucia Cristina Pereira Arruda<sup>2</sup>, Milena Maria Monteiro<sup>2</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>, Diogo Ribeiro Câmara<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal (LARA), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

\*E-mail: diogo@vicoso.ufal.br

A Na, K-ATPase é uma proteína transmembrana primariamente pela troca de íons sódio e potássio entre os meios intra e extracelular. Todavia, a isoforma  $\beta 1\alpha 4$  (ATP1A4), específica do trato reprodutor masculino, foi identificada na região da cabeça em espermatozoides bovinos, sendo capaz de regular a capacitação espermática e até mesmo sofrer tradução durante esse processo. O bloqueio da Na, K-ATPase com oubaina (inibidor altamente específico) induziu a capacitação através de mecanismos que envolvem quinases, associado a redistribuição da  $\beta 1\alpha 4$  para região pós-acrossomal dos espermatozoides capacitados. Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar a influência do bloqueio da Na, K-ATPase com oubaina sobre as características espermáticas em amostras de sêmen descongelado de touros. Para isso, amostras de sêmen de quatro touros, previamente criopreservadas, foram utilizadas. O estudo foi realizado em quadruplicata e para cada repetição, quatro palhetas de uma mesma partida de cada touro foram descongeladas e acondicionadas em microtubos, para realização das análises. Após descongelação (37°C por 30 segundos), alíquotas do *pool* de cada reprodutor foram submetidas as análises de cinética espermática (CASA; SCA™; Microptics, S.L, Barcelona, Espanha), bem como a associação de sondas fluorescentes foi utilizada para avaliação de subpopulações espermáticas, com auxílio de citometria de fluxo (Amnis ImageStreamx Mark II; EMD Millipore Corp., Seattle, EUA), tendo sido determinados os parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/PNA), estabilidade de membrana (MERO/YO-PRO) e estresse oxidativo (DCFDA/IP). As amostras restantes de cada *pool* foram centrifugadas e após descarte do sobrenadante foram ressuspensas em meio Tris-Gema com oubaina ( $10^{-9}$  M; tratado) ou sem oubaina (controle), mantidas em banho-maria (37°C) e submetidas as mesmas avaliações supracitadas, após 60 e 120 minutos de incubação. Diferenças entre os resultados foram determinadas utilizando-se *one-way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey pareado. Comparando-se com os valores obtidos imediatamente após a descongelação, durante a incubação foi observado uma redução significativa em todos os parâmetros cinemáticos ( $P < 0,05$  a  $P < 0,001$ ), bem como no percentual de células com membrana plasmática estável e íntegra (MERO-/YP-;  $P < 0,001$ ), não sendo observada influência do bloqueio da Na, K-ATPase. Além disso, ao longo da incubação, foi observada uma elevação no percentual de espermatozoides com baixo estresse oxidativo e membrana íntegra (DCFDA-/IP-;  $P < 0,01$ ), o que pode refletir um restabelecimento do balanceamento REDOX nas células viáveis ao longo do período de incubação, com exceção das amostras controle após 120 minutos, que permaneceram com valores equivalentes ao das amostras pós-descongelação. Apenas na amostras tratadas com oubaina, após 120 minutos de incubação, foi observada uma redução ( $P < 0,05$ ) no percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas (IP-/PNA-) quando comparada as amostras pós-descongelação, provavelmente devido aos eventos relacionados a capacitação devido a interação oubaina-Na, K-ATPase. Concluiu-se que o bloqueio da Na, K-ATPase com oubaina influencia negativamente a integridade acrossomal e plasmática de espermatozoides bovinos pós-descongelação, sem detrimento às características cinemáticas, de estresse oxidativo e estabilidade de membrana.

**Palavras-chave:** bomba de sódio, fisiologia espermática, touro.

**Keywords:** sodium pump, sperm physiology, bull.



## **Efeito do estresse térmico testicular em touros *Bos taurus* na integridade do DNA espermático**

*Effect of testicular thermal stress on Bos taurus bulls on the integrity of sperm DNA*

**João Diego de Agostini Losano, Andressa Dalmazzo, Daniel de Souza Ramos Angrimani, Carolina Camargo Rocha, Máira Morales Brito, Eduardo Gualtieri de Andrade Perez, Renato Bueno Flores\*, Camilla Mota Mendes, Mayra Elena Ortiz D'Avila. Assumpção, Valquiria Hyppolito Barnabe, Marcilio Nichi**

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

\*E-mail: renato.bflores@usp.br

Há um aumento significativo na utilização de touros *Bos taurus* em programas reprodutivos no Brasil, visando obter o máximo de heterose das proles, por meio do cruzamento industrial (*Bos taurus* x *Bos indicus*). No entanto, estudos demonstram que bovinos taurinos (*Bos taurus taurus*) são mais susceptíveis ao estresse térmico (ET) quando comparados aos zebuínos (*Bos taurus indicus*), os quais são adaptados ao clima tropical. Desta forma, o estresse térmico testicular (ETT) de touros *Bos taurus* durante programas reprodutivos pode impactar negativamente na fertilidade do rebanho. Hipotetizamos que uma das possíveis causas da redução na fertilidade, é o aumento dos danos ao DNA espermático durante a espermatogênese, como consequência do estresse térmico. Para verificar nossa hipótese, 16 touros *Bos taurus* (N=16) foram submetidos à insulação escrotal, por meio de bolsas insuladoras, durante um período de 4 dias para induzir um quadro de ETT. Ejaculados foram coletados por meio de eletroejaculação, em quatro tempos: Tempo 0 (antes da insulação escrotal), Tempo 1 (imediatamente após a retirada da bolsa de insulação), Tempo 45 (45 dias após a insulação) e Tempo 60 (60 dias após a insulação). Cada ejaculado foi submetido à análise da susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA<sup>®</sup>), por meio da técnica de citometria de fluxo (Guava EasyCyte<sup>™</sup> Mini System, Guava<sup>®</sup> Technologies, Hayward, CA, E.U.A.). A avaliação foi baseada na diferença entre a fluorescência emitida pelos espermatozoides com DNA íntegro (verde) e os espermatozoides com DNA fragmentado (vermelha). Os dados foram analisados por meio do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.), sendo que, os diferentes tempos foram comparados por análise de variância utilizando o teste LSD. Observamos aumento significativo na susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida 60 dias após a insulação (Tempo 0: 30,8±6,2<sup>a</sup>; Tempo 1: 20,6±3,6<sup>a</sup>; Tempo 45: 25±5,2<sup>a</sup>; Tempo 60: 91,2±0,7<sup>b</sup>). Estudos relatam que durante o processo de ETT, os danos ao DNA espermático ocorrem principalmente após a espermição, durante o transporte espermático através dos túbulos seminíferos e ductos epididimários, como consequência do estresse oxidativo pós-testicular. No entanto, verificamos aumento do dano espermático apenas 60 dias após a indução do estresse térmico testicular (período de um ciclo espermatogênico). Portanto, podemos inferir que o ETT em touros *Bos taurus* aumenta significativamente as taxas de fragmentação do DNA espermático durante o processo de espermatogênese.

**Palavras-chave:** *Bos taurus taurus*, estresse térmico testicular, DNA espermático, espermatozoide bovino.

**Keywords:** *Bos taurus Taurus*, testicular thermal stress, spermatic DNA, bovine spermatozoa.

**Suporte financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## **Efeito do momento pós-parto sobre a produção e qualidade de embriões *in vitro* oriundos de vacas Nelore (*Bos indicus*)**

*Effect of postpartum time on in vitro embryo yield and quality obtained from Nelore (Bos indicus) cows*

**Marina Anchieta Trevisoli<sup>1,\*</sup>, Cecília Rodrigues Alves Silveira<sup>1</sup>, Julia Cestari Pierucci<sup>1</sup>, Gustavo Luiz dos Santos<sup>2</sup>, Walt Yamazaki<sup>2</sup>, Luciana Terumi Sanomia Yamazaki<sup>2</sup>, Erika Aline Ribeiro Dias<sup>3</sup>, Cláudia Cristina Paro de Paz<sup>4</sup>, Fabio Morato Monteiro<sup>3</sup>, Pietro Sampaio Baruselli<sup>4</sup>, Lindsay Unno Gimenes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>2</sup>Bioembryo, Bauru, SP, Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Zootecnia (IZ), Sertãozinho, SP, Brasil;

<sup>4</sup>FMVZ-USP, São Paulo, SP, Brasil.

\*E-mail: ma\_trevisoli@hotmail.com

No presente estudo avaliou-se o efeito do momento pós-parto sobre a produção e a qualidade de embriões *in vitro* oriundos de vacas Nelore. Para tanto, 17 animais, com ECC inicial de  $2,72 \pm 0,04$ , foram submetidos a seis réplicas (T1 a T6) de aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (OPU; Aloka 500®, Tóquio, Japão; frequência 5 MHz) a cada 14 dias a partir dos  $11,5 \pm 0,3$  dias pós-parto. Os folículos  $\geq 2$  mm foram contados previamente à OPU e os oócitos recuperados foram classificados de acordo com a homogeneidade do citoplasma e número de camadas de células do *cumulus*. Oócitos de graus 1 a 3 foram submetidos aos procedimentos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) em laboratório comercial (Bioembryo®, Bauru - SP). Após completar o desenvolvimento (D8, sendo D0 o dia da fertilização *in vitro*) parte dos embriões foram colocados em microtubos contendo paraformaldeído 2% para posterior contagem de núcleos. Os embriões recuperados (n=88) foram corados com Hoescht 33342/ PBS (1:10), depositados entre lâmina e lamínula contendo glicerol e a leitura foi realizada no microscópio de epifluorescência (excitação 330-385nm e emissão 420-490nm; Olympus IX-FLA-70, Tóquio, Japão). A quantificação dos núcleos foi realizada com o auxílio do programa ImageJ. Os dados foram analisados por regressão logística utilizando o PROC GENMOD (SAS versão 9.1.3, 2003) considerando-se a distribuição de Poisson. Pôde-se observar efeito de momento pós-parto (T1, T2, T3, T4, T5 e T6, respectivamente) para as seguintes variáveis: número de folículos visualizados ( $36,6 \pm 4,6^b$ ;  $35,9 \pm 5,0^b$ ;  $37,8 \pm 4,5^b$ ;  $38,7 \pm 4,8^b$ ;  $41,8 \pm 5,5^b$ ;  $53,4 \pm 6,6^a$ ;  $P=0,05$ ), número de oócitos totais ( $31,4 \pm 5,2^{bcd}$ ;  $26,3 \pm 4,6^{cd}$ ;  $27,7 \pm 4,5^d$ ;  $31,5 \pm 4,7^c$ ;  $37,8 \pm 6,1^{ab}$ ;  $43,1 \pm 6,1^a$ ;  $P=0,03$ ); taxa de recuperação ( $79,0 \pm 5,7^{bc}$ ;  $73,4 \pm 6,2^{bc}$ ;  $71,6 \pm 5,1^c$ ;  $81,7 \pm 3,9^{ab}$ ;  $90,4 \pm 5,7^a$ ;  $82,6 \pm 4,0^b$ ;  $P=0,03$ ); e número de oócitos viáveis ( $24,5 \pm 4,1^{bc}$ ;  $15,2 \pm 3,4^d$ ;  $21,3 \pm 3,6^c$ ;  $24,8 \pm 3,9^b$ ;  $28,4 \pm 4,8^b$ ;  $34,5 \pm 4,9^a$ ;  $P=0,02$ ). Contudo, a taxa de clivagem ( $83,1 \pm 3,1$ ;  $85,0 \pm 2,1$ ;  $78,6 \pm 3,1$ ;  $81,3 \pm 2,6$ ;  $77,1 \pm 3,2$ ;  $67,6 \pm 6,9$ ;  $P=0,12$ ), a taxa de blastocistos ( $28,2 \pm 5,1$ ;  $40,2 \pm 4,2$ ;  $38,7 \pm 4,5$ ;  $36,0 \pm 4,3$ ;  $36,7 \pm 3,3$ ;  $37,1 \pm 5,0$ ;  $P=0,60$ ) e a contagem de núcleos ( $88,3 \pm 7,2$ ;  $80,8 \pm 5,4$ ;  $105,6 \pm 6,0$ ;  $86,1 \pm 10,0$ ;  $77,8 \pm 7,7$  e  $88,9 \pm 5,0$ ;  $P=0,14$ ) não sofreram alterações ao longo do tempo. Diante dos resultados expostos, não houve diferença na quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* oriundos de doadoras em diferentes momentos do pós-parto. Sendo assim, é possível a obtenção de oócitos de fêmeas a partir de 11,5 dias pós-parto, desde que o útero esteja com volume reduzido para que seja possível a aspiração folicular.

**Palavras-chave:** aspiração folicular, PIVE, contagem de núcleos.

**Keywords:** *Ovum pick-up, IVEP, nucleus counting.*



## **Efeito dos estágios da gestação em termogramas de infravermelho em vacas de leite** *Effect of pregnant phases on the infrared thermograms in dairy cows*

**Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak<sup>1\*</sup>, Camila D. Souza<sup>1</sup>, Murilo Redivo<sup>1</sup>, Caio O. Siqueira<sup>1</sup>, Isamara B. Andrade<sup>1</sup>, Gabriela F. Cornacini<sup>1</sup>, Luis Roberto A. Gabriel Filho<sup>2</sup>, Marcelo George Mungai Chacur<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista, Tupã, SP, Brasil.

\*E-mail: fernanda.deak@etec.sp.gov.br

A termografia digital de infravermelho é um exame de imagem não invasivo, de fácil realização, eficaz e possui alta acurácia para mensurar as temperaturas das áreas do corpo dos animais. Objetivou-se estudar os efeitos dos estágios da gestação nas temperaturas retal, e nos termogramas infravermelhos do globo ocular e do períneo em vacas da raça Holandês Preto e Branco. As temperaturas foram obtidas a partir de áreas da superfície do corpo do animal: globo ocular e períneo; e mensuração da temperatura retal em vacas prenhes e não prenhes. Utilizaram-se vacas ( $n=24$ ) da raça Holandês Preto e Branco, divididas em grupos conforme o estágio gestacional: 1 (1-95 dias de prenhez); 2 (96-190 dias de prenhez); 3 (191-285 dias de prenhez); 4 (pós-parto imediato) e 5 (vacas não prenhes); mantidas em pastagem de *Urochloa decumbens*, recebendo silagem de milho, mistura mineral e água *ad libitum*. O período do experimento foi de abril a setembro, com coleta de dados a cada 28 dias: termografia de áreas do corpo com câmera termográfica (E40®, FLIR, Suécia), termometria retal, ultrassonografia transretal (Aloka 500®, Japan) para comprovar as fases da gestação e fatores climáticos monitorados com termômetro de globo (ITitwtg 2000®, Instrutemp, Brasil), foram procedidos e coletados no período da manhã entre sete e nove horas. As imagens térmicas (termogramas) foram processadas pelo programa Flir Tools 2.1. A análise estatística foi processada com teste de Tukey a 5% e pela comparação de estágio Leeds. Para as temperaturas obtidas por termogramas, houve diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os períodos do ano e entre as fases reprodutivas. As médias de temperaturas para cada fase gestacional foram: fase 1:  $34,2 \pm 1,8^\circ\text{C}$ , fase 2:  $34,3 \pm 2,1^\circ\text{C}$ ; fase 3:  $34,4 \pm 1,8^\circ\text{C}$ ; fase 4:  $34,5 \pm 1,9^\circ\text{C}$ ; fase 5:  $33,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$ . As temperaturas obtidas para períneo em cada estágio gestacional foram: fase 1:  $35,2 \pm 1,2$ ; fase 2:  $35,3 \pm 1,4$ ; fase 3:  $35,2 \pm 1,2$ ; fase 4:  $35,8 \pm 0,9$ ; fase 5:  $34,6 \pm 1,2$ . Os estágios gestacionais influenciaram na temperatura de áreas do corpo de vacas de leite. Os animais não mostraram alterações comportamentais durante o exame de termografia. Em animais leiteiros recomenda-se o uso de termografia infravermelha como um teste de rotina para mensurar as temperaturas das áreas do corpo. O processamento das imagens foi prático e bastante rápido, recomendando-se o exame de termografia na rotina como complementar ao exame clínico.

**Palavras-chave:** vaca de leite, prenhez, termografia infravermelha, vulva.

**Keywords:** *milk cow, pregnancy, infrared thermography, vulva.*



## Environment Effects in Nelore and Braford bull's semen on the Brazilian tropical region

*Efeitos do ambiente no sêmen de touros Nelore e Braford na região tropical do Brasil*

**Silvio Menegassi<sup>1,\*</sup>, Marcela Rocha<sup>1</sup>, Carolina Berlitz<sup>1</sup>, Celso Koetz Jr<sup>2</sup>, Gabriel Pereira<sup>2</sup>, Cristiane Matté<sup>3</sup>, Pauline August<sup>3</sup>, Marcio Gomes<sup>4</sup>, Júlio Barcellos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>2</sup>University of Northern Paraná, Brazil; <sup>3</sup>Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>4</sup>Federal University of Tocantins, Brazil.

\*E-mil: programa.paat@gmail.com

The Brazilian tropical region is marked by two main seasons. Failure to regulate the body temperature, especially during spermiogenesis, can lead to reproductive losses. The study's objective was to evaluate, in the Brazilian tropical environment, through morphology alterations, sperm functional tests and redox status, the Nelore and Braford bull's semen. In the Brazilian tropical region, in Porto Nacional-TO (10°42'29"S, 48°25'02"W, Height 212m, climatic classification of "Aw" according to Köpper) was collected the semen of 16 Nelore bulls and 12 Braford bulls, between October 2015 and January and March 2016. Referent to the spermiogenesis 18-day period of each sampling, the environment was analyzed through the Temperature and Humidity Index (ITU) and the Equivalent Temperature Index (ETI) using data from the National Institute of Meteorology. Sperm quality was evaluated by conventional tests (total defects (TD), major defects (MaD), minor defects (MiD), proximal gout (Gpro), distal gout (Gdist) and bent tail with gout (Gtail)) and functional tests (colorations of Pope, Eosin/Nigrosine (Eos/Nig), DAB Class I, II, III and IV). The antioxidant activity included the quantification of reactive species (DCF), the evaluation of Glutathione (GSH) by fluorometry, and Glutathione Peroxidase (GPx) and Glutaredoxin (GRx) by indirect assay reducing the absorbance at 340nm and via NADH oxidation followed in a spectrophotometer, respectively. The statistical analysis was performed by ANOVA (One-Way) and Person's Correlation using MiniTab® v17.1.3. The ITU was not significant between the sampling (oct 80.48, Jan 80.34 and mar 79.54), although January had 3 days in the emergency zone ( $\geq 84$ ) with a maximum of 94, while October and March had 1 day with 85. March had the highest ETI of 28.53 (13 days in care zone-27 to 32), January as the second highest of 27.44 (11 days in care zone) and October 24.73 (comfort zone  $\leq 27$ ) ( $p=0.000$ ). Nelore bulls had fewer changes in all evaluated morphologies during the experiment (MaD, TD, and Gpro:0.000; MiD:0.008; Gdis:0.006 and Gtail:0.011). Braford bulls had a positive correlation between TD and ITU (0,998). The lowest percentages of Pope were found in January for both breeds, Braford 94.96% and Nelore 92.72%, being different between the groups in March, Braford 97.82% and Nelore 99.41% ( $p=0.011$ ). In the Eos/Nig test, in March, both breeds obtained the highest percentage of active spermatozoa ( $p=0.000$ ) and had a negative correlation with the ITU (-0.998). The DAB Class I and II had a higher value in the Nelore group (95.17%) than in Braford (91.14%) in January ( $p=0.035$ ). In the DCF, Braford bulls had a lower count (333.8) than the Nelore animals (579.4) ( $p=0.000$ ), being this last data positively correlated to the Pope% (0,099). GSH and GPx with higher activity in Braford (4.08 and 2.24) than the Nelore (2.64 and 1.39). A negative correlation in Braford bulls was observed of MaD and Gprox with GSH and GRx (-0,998 and -1) and TD with GSH (-0,997). The ITU and ETI differed by the wind speed inclusion in the second index. The seminal quality was different because the Nelore breed is more adapt to the tropical environment, which is referenced by the functional test of Pope and DAB I and II in March and January, respectively. The enzymatic tests suggest a higher level of oxidative stress in Braford breed compared to the Nelore. Although the Braford breed presented a reaction, it was not enough to overcome the cell damage observed in the sperm morphology.

**Keywords:** Thermic Index, Spermiogenesis, Seminal Quality, Antioxidant enzymes, sperm functional test.

**Palavras-chave:** índice térmico, espermiogênese, qualidade seminal, enzimas antioxidantes.



## Estudo da capacitação do espermatozoide bovino após terapia fotodinâmica

*Study capacitation of bovine spermatozoa after photodynamic therapy*

Antonieta Lourenia Gomes<sup>2,3</sup>, João Pedro Brandão Zandonaide<sup>1</sup>, André Belico Vasconcelos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba MG, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Estudos Avançados em Veterinária, UNIUBE/FAZU/ABCZ, Uberaba, MG, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório Bio Vitro LTDA, Uberaba, MG, Brasil.

\*E-mail: andre.vasconcelos@uniube.br

A capacitação espermática é o processo pelo qual espermatozoides alcançam a habilidade fecundante ao percorrer o trato genital feminino. Indutores específicos como heparina e cálcio ionóforo são utilizados na indução deste processo fisiológico. Por conseguinte, com o advento das biotecnologias, estudos com a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido empregadas na obtenção de diversas respostas fisiológicas em células somáticas e germinativas. Desta forma este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da terapia fotodinâmica na indução da reação acrossomal bovina *in vitro*. Foram utilizadas seis doses de sêmen, duas partidas, de um único touro da raça Nelore, obtidas na Central de Produção de Sêmen Alta Genetics. Os grupos experimentais foram divididos em dois. Primeiro - Terapia Fotodinâmica (TFD) sem fotossensibilizador com tempo de exposição à luz (120 min), potência (10 J/cm<sup>2</sup>), distancia de exposição à luz (4,0 cm). Segundo – Heparina adicionados em 1 ml de meio FIV, conforme protocolo do Laboratório BioVidro. As análises do sêmen após os protocolos de TFD e heparina foram feitas por citometria de fluxo (CF), utilizando como marcador da integridade da membrana plasmática o iodeto de propídio (Ip - 1,5 mM) e a taxa de capacitação pela sonda fluorescente de FluoróforoIsotiocianato de Fluoresceína/*ArachishypogaeaLectin* (PNA-FITC- 1,125 g/ml). Também foram avaliados após o protocolo de fertilização *in vitro* os índices de clivagem (D3) e conversão embrionária (D7). Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 cujos dados foram expressos em média e desvio padrão de cinco repetições e os tratamentos foram analisados pelo teste paramétrico oneway ANOVA, com pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,001$ . Analisando os dados de citometria para os dois grupos quanto a integridade de membrana e células não reagidas (IP negativo/PNA negativo) observa-se que terapia fotodinâmica ( $4,8 \pm 3,4$ ), *versus* o grupo com heparina ( $38 \pm 3,7$ ). Quanto a taxa de capacitação (IP negativo/PNA positivo) a TFD ( $39,9 \pm 0,9$ ) *versus* ( $5,1 \pm 1,2$ ) da heparina. Na avaliação da taxa de clivagem após tratamento com terapia fotodinâmica, observou-se significância estatística no grupo controle (83,8%) *versus* heparina (60%). Na análise de embriões produzidos em D7, também ocorreu significância estatística no grupo TFD (21,6%) *versus* Heparina (37,2%). Estudos apontam que o tempo de estimulação e o potencial de luz, podem aumentar ou deprimir processos fisiológicos que poderiam induzir modificações nas estruturas biológicas, podendo ocasionar uma lipoperoxidação ou aquecimento de proteínas provocando sua desnaturação. A resposta bioquímica da capacitação também descreve resposta fisiológica pela ação de glicosaminoglicanas, uma vez que estes se ligam as proteínas do plasma seminal bovino (BSP). Concluiu-se que o efeito da terapia fotodinâmica causa alterações sobre os processos da capacitação espermática, alterando a taxa de capacitação espermática.

**Palavras-chave:** heparina, taxa de clivagem, citometria.

**Keyword:** *heparin, cleavage rate, cytometry.*



## **Função folicular e luteal de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona durante a sincronização da ovulação em um protocolo de IATF**

*Follicular and luteal function of crossbred cows with different circulating concentrations of progesterone during a synchronization of ovulation in a protocol of TAI*

**Bia Santos Souza Carôso, Priscila Assis Ferraz, Mariana Alves de Andrade Silva, Elisiane Sateles dos Santos, Endrigo Adonis Braga de Araujo, Gabriel Felipe Oliveira de Menezes, Fernando de Lima Cardoso, João Victor Gomes da Silva Carvalho, Álvaro dos Santos Alves, Eliardo Rodrigues Flores, Marcus Vinícius Galvão Loiola, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho\***

Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: [alisboafilho@ufba.br](mailto:alisboafilho@ufba.br)

Tem sido relatado que as concentrações séricas de progesterona (P4) no momento da sincronização da ovulação em um protocolo de IATF refletem na probabilidade de concepção, visto que altera características foliculares e luteais, havendo relação com o tipo racial e o grau de produção de leite dos animais. No entanto, ainda não foi relatado os impactos da concentração de P4 durante a sincronização da ovulação em vacas mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). Diante disso, objetivou-se estudar os efeitos das diferentes concentrações circulantes de P4, no momento da sincronização da ovulação em um protocolo de IATF, sob a dinâmica folicular e características do corpo lúteo (CL). Foram utilizadas 12 fêmeas mestiças com média de escore de condição corporal de  $3,07 \pm 0,38$ , que foram submetidas a um protocolo de pré-sincronização, para garantir que todos os animais apresentassem CL no início do protocolo, confirmando a presença dessa estrutura através da ultrassonografia (US) transretal. Em seguida no D0, todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 associado a 2mg de benzoato de estradiol via intramuscular (i.m.) e metade destes foram tratados com 12,5mg de PGF2 $\alpha$  i.m. No D8 foi realizada a retirada desse dispositivo de P4 e administrado 12,5mg de PGF2 $\alpha$  i.m., seguido por 1mg de cipionato de estradiol i.m., em todos os animais. Nesse momento, os animais foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com a aplicação de PGF2 $\alpha$  no D0: grupo C/CL (n=6) e grupo S/CL (n=6). Os animais foram submetidos a avaliação da dinâmica e vascularização folicular por meio de US em modo B e Doppler colorido a cada 12 horas a partir do D8 até o momento da ovulação. Além disso, foram realizadas coletas de sangue para determinação da concentração sérica de P4 pré-ovulatória (D0, D8 e D10 do protocolo). No D24 do protocolo foi realizada a avaliação das características morfológicas e funcionais do CL por meio da US modo B e Doppler colorido e também foi coletado sangue para mensuração da concentração sérica de P4 do CL subsequente ao protocolo. Os dados foram analisados utilizando o procedimento ANOVA e o teste Tukey no SPSS ( $P < 0,05$ ). A presença do CL no início do protocolo impactou negativamente no diâmetro do folículo no D10 ( $8,78 \pm 2,04$  e  $13,12 \pm 3,52$ mm), diâmetro do folículo pré-ovulatório ( $9,48 \pm 2,12$  e  $13,66 \pm 2,58$ mm) e na área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório ( $0,09 \pm 0,04$  e  $0,18 \pm 0,09$ cm<sup>2</sup>), quando comparado com os animais do grupo S/CL, respectivamente. As vacas do grupo S/CL apresentaram concentrações de P4 de  $1,72 \pm 1,16$ ng/mL inferiores ao grupo C/CL que apresentaram  $7,56 \pm 3,70$ ng/mL, no momento da sincronização da ovulação (D8). As fêmeas do grupo C/CL ainda apresentaram menor diâmetro ( $17,66 \pm 1,89$  e  $23,25 \pm 4,46$ mm) e área de vascularização ( $0,82 \pm 0,29$  e  $1,21 \pm 0,27$ cm<sup>2</sup>) do CL subsequente ao protocolo de sincronização (D24) quando comparada às fêmeas do grupo S/CL, respectivamente. Todavia, a concentração sérica de P4 no D24 não diferiu entre os grupos experimentais. Assim, conclui-se que elevadas concentrações de P4 no momento da sincronização da ovulação impactam negativamente no diâmetro e vascularização folicular e luteal de vacas mestiças.

**Palavras-chave:** Bovino, folículo, corpo lúteo, Doppler.

**Keywords:** Bovine, follicle, corpus luteum, Doppler.



## Hipoplasia ovariana unilateral total em bovino da raça Gir – relato de caso

*Unilateral total ovarian hypoplasia in Gir cattle - case report*

Lucas Pereira Balieiro<sup>1\*</sup>, Isadora Martins Fernandes Pereira<sup>1</sup>, Edgar Andres Diaz Miranda<sup>2</sup>, Giancarlo Magalhães dos Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências e Tecnologia de Viçosa (Univiçosa), Viçosa, MG, Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, (Univiçosa), Viçosa, MG, Brasil;<sup>3</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências e Tecnologia de Viçosa, (Univiçosa), Viçosa, MG, Brasil.

\*E-mail: lucasbalieiro@hotmail.com

A hipoplasia ovariana é uma condição congênita de origem hereditária, causada por um gene autossômico recessivo de penetrância incompleta, podendo ser unilateral ou bilateral e parcial ou total, causando grandes falhas reprodutivas nos rebanhos bovinos. Os ovários afetados são pequenos, rígidos, com estrias longitudinais e pode não ter a presença de folículos devido a uma falha na migração e sincronia das divisões mitóticas das células germinativas primordiais. Em casos de hipoplasia bilateral total, ocasionalmente aparece um infantilismo do restante do trato genital. Animais homocigotos para a anomalia, ou seja, com hipoplasia total bilateral são inférteis, já animais que apresentam hipoplasia total unilateral são subférteis e passam essa característica para a sua progênie. O tratamento é inexistente, sendo um processo irreversível, sendo a prevenção a melhor forma de evitar a propagação, evitando reproduzir as fêmeas com diagnóstico sugestivo de hipoplasia unilateral e evitar realizar o mesmo acasalamento que gerou animais hipoplásicos, afim de não obter linhagens com este problema. Relata-se o caso de uma fêmea, da raça Gir-PO de aproximadamente 21 meses, produto da biotecnologia da fertilização *in vitro* (FIV) a qual foi adquirida com finalidade de ser doadora de oócitos, portanto na primeira aspiração ovariana deste animal o médico veterinário que estava procedendo o serviço observou ausência de estruturas foliculares no ovário direito, suspeitando assim de hipoplasia unilateral total de ovário direito. Meses após o mesmo técnico retornou a propriedade para realização de uma nova avaliação, observando que não ocorreu modificações no ovário anteriormente analisado, para evitar quaisquer coincidência no diagnóstico, o técnico administrou um análogo de GnRH (acetato de busserelina) e retornou depois de quatro dias para uma nova avaliação, onde constatou não haver ocorrido modificação da estrutura ovariana, sugerindo o diagnóstico de hipoplasia unilateral total do ovário direito. As hipoplasias ovarianas se apresentam com maior frequência unilateral esquerda e bilateral, divergindo com o relato descrito aonde o animal apresenta hipoplasia total no ovário direito, dados literários citam que a incidência do ovário direito observado foi de apenas 4% de animais acometidos com hipoplasia. Há trabalhos relatando hipoplasia testicular em bovinos da raça Gir, sugerindo que existem linhagens desta raça que transmite o gene para a anomalia em questão. Neste caso mostra-se a importância de realizar um exame ginecológico detalhado, além de isolar as linhagens transmitentes, para se evitar que tal anomalia se difunda pela raça e cause grandes falhas reprodutivas nos rebanhos.

**Palavras-chave:** Bovino, Hipoplasia, ovário.

**Keywords:** Bovine, Hypoplasia, ovary.



## **Impacto da somatotrofina bovina (bST) aplicada no dia 0 ou no 8 sobre a dinâmica folicular ovariana de vacas cruzadas *Bos taurus taurus***

*Impact of bovine somatotrophin (bST) applied on day 0 or 8 on the ovarian follicular dynamics in *Bos taurus taurus* crossbred cows*

**Ana Paula Kaminski<sup>1\*</sup>, Maria Luisa de Andrade Carvalho<sup>1</sup>, Márcio Saporski Segui<sup>1</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>1</sup>, Rafaela Talini<sup>1</sup>, Victor Breno Pedrosa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Curitiba, PR, Brasil; <sup>2</sup> Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil.

\*E-mail: anapkaminski95@gmail.com

A somatotrofina bovina recombinante (bST) é frequentemente utilizada em fazendas produtoras de leite, visando expandir a produção de leite, sendo administrada principalmente em animais com boa performance leiteira. Diversos estudos foram conduzidos para verificar e confirmar a eficácia da utilização do bST na reprodução animal. Seguidos sucessos da bST conduzem a sua utilização para determinar o melhor momento de uso, especialmente em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O presente estudo teve por objetivo checar o emprego da bST com vistas ao recrutamento e desenvolvimento da dinâmica folicular ovariana em um protocolo para sincronizar o estro e a ovulação. Foram utilizadas vinte e quatro vacas multíparas cruzadas (europeias) da Fazenda Experimental Galha Azul (PUCPR), com escore corporal (ECC) médio de 3,3; alimentadas com silagem de milho em cocho e ração, isentas de afecções genitais. Os animais foram distribuídos em três grupos (grupo controle (GC; n = 9); grupo bST0 (GbST0; n=9), grupo bST8 (GbST8; n = 6) e todos foram submetidos a idêntico protocolo: dia0 (d0) implante intravaginal de progesterona (1.5 g de P4) + 2 mg de benzoato de estradiol (IM); d8 retirada do implante + prostaglandina F2 $\alpha$  (150 mcg de D-cloprostenol, IM); d9: 1 mg de benzoato de estradiol; exceto que o GbST0 recebeu 250 mg (IM) de bST no d0 e o GbST8 recebeu de bST em d8. A dinâmica folicular foi avaliada por ultrassonografia (US) transretal no d0, d8, d10 e d15. Todas as estruturas ovarianas encontradas (folículo, corpo lúteo), foram avaliadas e mensuradas por meio de dispositivos do próprio aparelho (Sonoscape, China; transdutor 5.0 MHz). Os resultados foram calculados com base no programa estatístico (SAS, 2014). Resultados: o GbST0 desenvolveu folículos maiores em todos os dias do protocolo (d0: 11,6 $\pm$ 2,6; d8:11,6 $\pm$ 1,1; d10: 14,2 $\pm$ 1,2; d15: 14,5 $\pm$ 2,8) no confronto ao GC e GbST8, apresentado diferença estatística (P < 0,05) em todos os dias dos exames US. Relativamente às dimensões dos corpos lúteos advindos da ovulação, o GbST0 igualmente se destacou evidenciando estruturas maiores (d0: 20,6 $\pm$ 2,3; d8: 13,4 $\pm$ 2,9; d15: 19,8 $\pm$ 2,5), mostrando diferença significativa (P < 0,05) em relação aos outros grupos. Concluiu-se que o bST exerceu significativas influências no desenvolvimento de folículos e corpos lúteos relevantes na dinâmica ovariana; o momento mais adequado para a administração do bST durante um protocolo de IATF, é no início do protocolo (dia zero), resultando em folículos e corpos lúteos com maiores dimensões e mais competentes.

**Palavras-chave:** vacas mestiças europeias, bST, protocolo hormonal, dinâmica folicular.

**Keywords:** *european crossbred cows, bST, hormonal protocol, follicular dynamics.*



## Índice CAP como avaliação reprodutiva de touros da raça Gir candidatos a teste de progênie

*CAP Index a reproductive evaluation in Gir bulls candidates for progenie test*

**Gustavo Lima Ribeiro, Natácia Gaia Figueiredo, Juliano Ronda Bergamo, André Belico Vasconcelos\***

University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil.

\*E-mail: andre.vasconcelos@uniube.br

O Gir com aptidão Leiteira tem alcançado um papel importante dentro do cenário da pecuária nacional. Suas características produtivas e morfológicas estão sendo evidenciadas por meio do Teste de Progênie. Desta forma pode-se observar que o potencial reprodutivo de um touro é a soma de diversos fatores ligados à reprodução e, diante da importância das características andrológicas, notadamente aquelas ligadas à circunferência escrotal e qualidades do sêmen, definindo índices mais adequados de seleção andrológica. Em vista disso, os touros podem ser avaliados e submetidos a sistemas de tabelas por pontos que lhes conferem classificações dependendo do seu potencial reprodutivo como na utilização da classificação andrológica por pontos (CAP). Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar por meio de parâmetros estatísticos, a predição dos resultados clínico-andrológicos sobre a classificação andrológica por pontos (CAP), definindo qualidade reprodutiva de touros da raça Gir. Foram avaliados 34 touros Gir com aptidão leiteira, com idades iniciais entre 14 a 29 meses, e peso vivo médio de 450 kg. A prova classificatória foi conduzida na fazenda-escola das Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU), no município de Uberaba-MG. A coleta de amostras de sêmen foram realizadas utilizando eletro ejaculador. Foram coletadas três ejaculados de cada touro, com intervalos de 15 dias entre as coletas. Antes de cada coleta foi mensurado o perímetro escrotal com fita métrica. As análises laboratoriais foram concentração espermática, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático, e patologias espermáticas. Com os dados foi calculado o índice CAP. As médias obtidas para os diferentes parâmetros foram comparadas pelo teste Kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ), posteriormente, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Na análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, EUA). Na correlação entre motilidade e vigor, encontrou-se correlação positiva ( $R^2 = 0,72 - p < 0,05$ ). Por conseguinte também foi observado correlação significativa entre motilidade e defeitos totais ( $R^2 = 0,40 - p < 0,05$ ). Para a correlação entre CAP e motilidade, o resultado desta pesquisa apresentou significância quanto a estes parâmetros ( $R^2 = 0,42 - p < 0,05$ ), como também observado na correlação entre CAP e vigor ( $R^2 = 0,55 - p < 0,05$ ). A correlação entre circunferência escrotal e CAP foi ( $R^2 = 0,53 - p < 0,05$ ), o que referencia-se ao volume testicular e a produção espermática, quando relacionados com os dados de correlação dos defeitos totais e CAP ( $R^2 = 0,14 - p < 0,05$ ), verifica-se que pode ser utilizada como parâmetro de seleção de touros jovens. A classificação andrológica por pontos (CAP) sugere uma forma adequada de avaliação e identificação de touros com características andrológicas superiores, na raça Gir. Por incluir, além da circunferência escrotal, também características ligadas à qualidade seminal, fatores esses determinantes na classificação andrológica, fatores importantes para a fisiologia da reprodução do macho.

**Palavra Chave:** circunferência escrotal, Gir leiteiro, seleção genética.

**Keyword:** *scrotal circumference, dairy Gir, genetic selection.*



## **Influência do formol salino e da presença de corantes no meio de fixação sobre os resultados da avaliação morfológica de espermatozoides bovinos**

*Influence of formol-saline and the presence of dyes in the fixative preparation on bull semen morphology evaluation*

**Mauricio Faria<sup>1\*</sup>, Tatiana Issa Uehara Berton<sup>2</sup>, Kleber Peixoto Jr<sup>3</sup>, André Maciel Crespillo<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ; <sup>2</sup>Central de Congelamento de Sêmen Tairana S/A, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil.

\*E-mail: [acrespilho@unisa.br](mailto:acrespilho@unisa.br)

Atualmente existem muitas fórmulas diferentes para a preparação do formol salino (FS), solução Mundialmente utilizada para a conservação de espermatozoides bovinos para avaliação morfológica em microscopia de contraste de fase (CF). Da mesma forma, a necessidade da adição de corantes ao FS para melhora das características tintórias e, portanto, da avaliação espermática, também não possui uma definição clara na literatura, gerando dúvidas na execução dessa importante etapa do exame andrológico de touros. O trabalho tem por objetivo a comparação de duas fórmulas de FS, utilizando ou não a adição do corante básico azul cresil brilhante à preparação, em relação à qualidade e nitidez de avaliação e quantificação dos defeitos dos espermatozoides de touros. Para o estudo foram colhidos através de vagina artificial 100 ejaculados de touros adultos de diferentes raças. Todas as amostras foram homogeneizadas no ato da colheita e submetidas à avaliação imediata de concentração, motilidade total, progressiva e vigor espermático. De cada ejaculado foram retiradas quatro alíquotas de 40 µL de sêmen, que foram depositadas em frascos modelo Eppendorf de 1,5mL contendo um dos quatro tratamentos em teste: solução de formol salino citrato de sódio 2,96% (G1); formol salino PBS (2ml de formalina 38% em 98ml de tampão fosfato salino comercial; G2); formol salino citrato acrescido por 40 µL de azul cresil brilhante (110 µL do formol + 40 µL azul cresil; G3) e formol salino PBS acrescido por 40 µL de azul cresil brilhante (110 µL do formol PBS + 40 µL azul cresil; G4), respeitando-se os volumes finais de 150 µL de solução. Após a diluição do sêmen as amostras foram armazenadas em geladeira (4°C) até o momento da avaliação morfológica realizada em microscópio de CF (Nikon Eclipse E200, Japão) sob aumento de 1000x. A nitidez e qualidade de avaliação dos espermatozoides foi atribuído um escore (1 a 3, onde 1=ruim, 2=regular, 3=boa visualização) e os defeitos morfológicos foram classificados de acordo com Blom (1983), em função de cada grupo experimental. Os dados gerados foram submetidos à análise estatística utilizando modelo linear geral (GLIMMIX, SAS, USA). Maior nitidez na avaliação morfológica foi associada às preparações contendo apenas formol salino citrato (escore médio de 2,6<sup>a</sup>) ou PBS (escore 2,54<sup>a</sup>) em comparação aos grupos G3 (média 2,04<sup>b</sup>) e G4 (escore de 1,8<sup>c</sup>). Não foram observadas diferenças para a contagem de defeitos maiores (p=0,5658), menores (p=0,0560), defeitos acrossomais (p=0,3128) e de cabeça (p=0,7804) em função dos tratamentos seminais. No entanto, houve interação entre a técnica de preparação seminal sob a proporção de defeitos de peça intermediária (0,45<sup>a</sup>%, 1,14<sup>a</sup>%, 0,21<sup>b</sup>%, 0,34<sup>b</sup>%, respectivamente para os grupos G1, G2, G3 e G4; p=0,0047). Conclui-se que não existem diferenças entre as duas principais formulações de FS utilizadas para a preservação e preparação do sêmen bovino para avaliação morfológica em CF, podendo ser empregado tanto o citrato de sódio como o PBS como soluções tampão. A adição de azul cresil brilhante, corante básico com afinidade pelo DNA espermático, determinou a redução da nitidez e da qualidade de visualização espermática, resultado que contra indica sua utilização para a preparação de espermatozoides bovinos para avaliação morfológica.

**Palavras-chave:** bovino, espermatozoide, coloração, formol salino, morfologia espermática.

**Keywords:** bull, dye, formol saline, sperm morphology, spermatozoa.



## **Influência do soro fetal bovino sobre a viabilidade das células do *cumulus* de oócitos bovinos recuperados de ovários resfriados**

*Influence of fetal bovine serum on the viability of cumulus cells of bovine oocytes recovered from cooled ovaries*

**Alzira Regina Silva de Deus\*, Maria Bárbara Silva, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira, Luanna Lorena Vieira Rodrigues, Maria Diana Cáritas Barros dos Santos, Maria Valéria de Oliveira Santos, Luiza Bento de Queiroz Neta, Alana Azevedo Borges, Alessandra Fernandes Pereira**

Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: alziraregina@hotmail.com

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido amplamente utilizada por proporcionar várias vantagens aos programas de reprodução animal. Nesse sentido, uma importante fonte de ovários para a realização da PIVE são os abatedouros, os quais muitas vezes encontram-se distantes dos laboratórios. Dessa forma, as condições de transporte dos ovários, especialmente por longos períodos de tempo, podem levar a uma perda na viabilidade dos oócitos. Portanto, torna-se importante o estabelecimento de meios e suplementações capazes de manter as características de qualidade oocitária, como a viabilidade das células do *cumulus* (CCs). Assim, o objetivo foi avaliar a influência do soro fetal bovino (SFB) em meio simples [solução tampão fosfato (PBS)] e complexo [meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM)] durante o resfriamento (4–6°C) por 24 h de ovários bovinos sobre a viabilidade das CCs. Para tanto, dois experimentos foram realizados, onde no experimento I foram comparados ovários resfriados em PBS, PBS suplementado com 10% de SFB e não resfriado (controle). Já no experimento II, foram avaliados ovários resfriados em DMEM, DMEM suplementado com 10% de SFB e não resfriado (controle). Os ovários foram obtidos em abatedouro e transportados imediatamente ao laboratório em solução salina (NaCl 0,9%; 35–37°C). Para o resfriamento, ovários foram divididos aleatoriamente entre os grupos e armazenados por 24 h a 4–6°C. Todos os ovários foram submetidos à aspiração folicular (agulha 21G/seringa 5 mL) para recuperação oocitária. Os oócitos apresentando uma ou mais camadas de CCs foram selecionados e submetidos à desagregação mecânica para formação de uma suspensão de CCs. Em seguida, as células foram coradas com azul de tripano (0,2%) e visualizadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. Assim, células vivas (incolor) e mortas (azul) foram contadas. A taxa de viabilidade ( $n^\circ$  de células vivas/total de células contadas\*100) foi analisada pelo teste de chi-quadrado ( $P < 0,05$ ) considerando cinco repetições por experimento. No experimento I, um total de 108 ovários foi utilizado, onde o grupo resfriado na presença de SFB apresentou CCs com viabilidade de  $46,3\% \pm 3,3$ , a qual foi significativamente superior ao grupo resfriado com PBS que apresentou  $41,7\% \pm 1,4$  de células viáveis ( $P < 0,05$ ). Além disso, o resultado do grupo PBS/SFB, apesar da diferença estatística, mostrou uma maior proximidade ao grupo controle ( $49,0\% \pm 2,8$ ). No experimento II, 109 ovários foram distribuídos entre os grupos, onde o DMEM/SFB também apresentou melhor viabilidade das CCs em comparação ao grupo resfriado apenas com DMEM ( $42,0\% \pm 8,2$  vs.  $34,5\% \pm 8,8$ ;  $P < 0,05$ ), os quais foram inferiores ao controle ( $51,7\% \pm 3,2$ ). Diante dos resultados, observou-se que o processo de resfriamento ovariano influenciou negativamente a viabilidade celular. Além disso, meios acrescidos de suplementação proteica, como o SFB, garantem melhores condições para a manutenção das CCs e, portanto, da qualidade oocitária. Assim, pode-se concluir que a adição de SFB ao meio de resfriamento de ovários bovinos por 24 h proporciona um melhor ambiente para manutenção da viabilidade das CCs.

**Palavras-chave:** azul de tripano, DMEM, PBS, suplementação proteica.

**Keywords:** *trypan blue, DMEM, PBS, protein supplementation.*



## Influência dos “dias em aberto” na taxa de prenhez em programas de sincronização e ressincronização de vacas de corte

*Influence of days open on pregnancy rate at synchronization and resynchronization programs in beef cows*

**Ciro Meirelles\*, Rafaela Talini, Ana Paula Kaminski, Luis Fernando Garrido, Luiz Ernandes Kozicki**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Câmpus de Toledo, PR, Brasil.

\*E-mail: meirelles.ciro@pucpr.br

A ressincronização do estro visa a execução de nova sincronização da ovulação e inseminação de fêmeas previamente submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O presente estudo objetivou verificar a influência dos “dias em aberto” (pós-parto) sobre a taxa de prenhez de vacas submetidas à protocolos de sincronização e ressincronização. No estudo foram utilizadas 397 vacas pluríparas, sendo 215 da raça Nelore e 182 cruzadas (Nelore X Angus), de um rebanho comercial na região Oeste do Paraná. A média de idade atingiu 64 meses, o peso corporal médio de 415 kg, o escore da condição corporal (ECC) médio foi de 3,2 e dias abertos de 24 a 74. As vacas eram mantidas em pastoreio extensivo com *Brachiaria brizantha*, com sal mineral e água *ad libitum*. A estação reprodutiva entendeu-se de outubro de 2012 a fevereiro de 2013. As vacas estavam alocadas em três diferentes fazendas comerciais. O protocolo hormonal utilizado na sincronização foi: d0 (dia 0)–benzoato de estradiol (BE; 2mg, IM) e implante intravaginal de medroxiprogesterona (P4); d8 – retirada do implante + D-cloprostenol (150mcg) e eCG (300UI); d9 – BE (2mg); e d10 – IATF. O protocolo da ressincronização foi idêntico ao da sincronização exceto a exclusão do BE em d9 e aplicação de 2mg de BE no D8. Observou-se que a média de “dias em aberto” ( $52,4 \pm 1,9$  dias) das vacas prenhes pela ultrassonografia após a sincronização da ovulação e IATF, foi significativamente maior ao teste t ( $P=0,01$ ) que o grupo de fêmeas não prenhes ( $48,6 \pm 2,1$  dias). As vacas não prenhes na IATF foram ressincronizadas após 39 dias e re-submetidas a novo protocolo de IATF. Semelhantemente à sincronização, na ressincronização houve diferença ( $P=0,008$ ) na média de “dias em aberto”, sendo maior no grupo de vacas prenhes ( $54,3 \pm 3,0$  dias) comparativamente ao grupo de vacas não prenhes ( $46,9 \pm 2,7$  dias). Houve diferença significativa ( $P = 0,02$  pelo qui-quadrado) relativo à taxa de prenhez (TP) após sincronização nas vacas Nelore (51%;  $n=215$ ) em comparação às vacas Cruzadas (63%;  $n=182$ ). A diferença na TP também foi significativa na ressincronização ( $P<0,0001$ ) das vacas Nelore (33%;  $n=76$ ) em comparação às Cruzadas (86%;  $n=67$ ). Entretanto, comparando-se a média de “dias em aberto” para a sincronização entre as diferentes raças estudadas, observou-se diferença significativa ( $P<0,0001$ , teste t), apresentando as vacas Nelore a média de  $48,2 \pm 2,32$  dias, ao passo que as Cruzadas apresentaram a média de  $56,2 \pm 3,48$ . Não se verificou diferença entre vacas Nelore ou Cruzadas, prenhes ou não prenhes, relativas ao ECC e a presença de corpo lúteo no início do tratamento hormonal. Concluiu-se que o intervalo de “dias abertos” pós-parto afeta de forma significativa as TPs relativas ao início das atividades de sincronização e de ressincronização da ovulação.

**Palavras-chave:** IATF; ressincronização; dias em aberto.

**Keywords:** TAI; resynchronization; days open.

## Influência dos hormônios esteróides sobre o cultivo *in vitro* de células do epitélio tubário de bovinos

*Steroid hormone influence on the in vitro bovine tubal epithelial cells culture*

**Marcielly de Fátima da Costa Lobato<sup>1,\*</sup>, Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos<sup>2</sup>, Anelise de Sarges Ramos<sup>3</sup>, Nathália Nogueira da Costa<sup>4</sup>, Alessandra Ximenes Santos<sup>2</sup>, Priscilla di Paula Bessa Santana<sup>2</sup>, Vanessa Cunha de Brito<sup>5</sup>, Marcela da Silva Cordeiro<sup>6</sup>, Simone do Socorro Damasceno Santos<sup>6</sup>, Otávio Mitio Ohashi<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil; <sup>2</sup>Doutoranda de Pós graduação Ciência animal, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil; <sup>3</sup>Residente Multiprofissional em Saúde na área de Reprodução Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil; <sup>4</sup>CAPES, Brasília, DF, Brasil; <sup>5</sup>Graduanda da Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil; <sup>6</sup>Professora do Instituto Federal do Pará, IFPA, Castanhal, PA, Brasil; <sup>7</sup>Professores da Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

\*E-mail:marciellylobato@hotmail.com

A tuba uterina é de suma importância para a reprodução, em virtude dos eventos que ocorrem nela, como o transporte de gametas masculino e feminino, capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. A tuba é constituída por três camadas ou túnicas, a serosa, muscular e mucosa. Na mucosa se encontra o epitélio da tuba uterina que é formado por duas populações celulares, as células ciliadas e não ciliadas, esta última pode ainda ser chamada de secretora. As células ciliadas ajudam no transporte dos gametas através dos movimentos dos seus cílios e as células secretoras, secretam substâncias, como heparina, ovidutinas, mucinas que são capazes de auxiliar os gametas a se capacitar e no desenvolvimento inicial do embrião. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos dos hormônios estradiol e progesterona sobre a morfologia das células epiteliais da tuba uterina. As células epiteliais da tuba uterina foram avaliadas em dois experimentos, no primeiro foram cultivadas em meio *Fluid Oviduct Synthetic* (SOF) suplementado sem ou com estradiol na concentração de 10 pg/mL por 6 e por 18 horas enquanto que no segundo experimento as células foram cultivadas em SOF sem ou com progesterona a 10 ng/mL. As células da tuba foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que as células epiteliais cultivadas com estradiol por 6 horas mostravam maior quantidade de cílios e essa proporção permanecia até 18 horas de cultivo. Quando cultivadas com progesterona por 1 hora, as células epiteliais apresentavam poucos cílios, e após 24 horas, ausência de cílios quando comparado ao grupo cultivado sem hormônio, que apresentava cílios durante todo o cultivo. Os resultados mostram que os hormônios estradiol e progesterona influenciam na morfologia das células epiteliais da tuba uterina, modulando a presença de cílios. Nesse sentido podemos sugerir que as células epiteliais quando estimuladas pelo estradiol atingem a sua capacidade de formar cílios, já a progesterona induz a perda de cílios, e assim aumentando o número de células secretoras. Essas mudanças morfológicas estão de acordo com os eventos que ocorrem *in vivo* na fase estrogênica e progesterônica do ciclo estral de bovinos.

**Palavras-chave:** tuba uterina, células epiteliais, estradiol e progesterona.

**Keywords:** *uterine tube, epithelial cells, estradiol and progesterone.*



## **Localização da proteína cinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina II (CamKII) é afetada durante a reação acrossomal em espermatozoides bovinos**

*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization is affected during acrosome reaction in bovine sperm*

**Isabelle Scarpini Cotrim<sup>1</sup>, Thais de Sousa Santos<sup>1</sup>, Daniela Franco da Silva<sup>2</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção<sup>3</sup>, Fabiola Freitas de Paula Lopes<sup>1</sup>, Weber Beringui Feitosa<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>DCB - UNIFESP, Diadema, SP, Brasil; <sup>2</sup>IB - UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>3</sup>FMVZ - USP, São Paulo, Brasil.

\*E-mail: feitosawb@hotmail.com

A ligação à zona pelúcida estimula os espermatozoides capacitados a sofrerem a reação acrossomal que resulta na liberação de enzimas hidrolíticas responsáveis pela digestão da zona pelúcida. Isto permite que o espermatozoide se ligue com a membrana do oócito para fecundá-lo. Entre as proteínas envolvidas na regulação desse processo, tem sido demonstrado que a atividade da proteína cinase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina II (CamKII), é importante na regulação da reação acrossômica. Contudo, a dinâmica da sua localização durante esse processo não é conhecida. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica da localização da CamKII durante a reação acrossomal em espermatozoides bovinos. Para isso, o sêmen foi descongelado e centrifugado em gradiente de Percoll (45/90%) a 9000 g por 5 minutos e o sedimento ressuspensão e centrifugado em meio TL-Fert (sem cálcio e bicarbonato) a 900g por 2,5 minutos. Os espermatozoides recuperados foram ressuspensos em meio TL-Fert suplementado com albumina sérica bovina (BSA; 3 mg/ml) na concentração de  $1 \times 10^6$  /mL e incubados a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas. Após esse período, os espermatozoides foram mantidos por 1 h adicional no mesmo meio (controle) ou suplementados com heparina (20 mg/ml) e cálcio ionóforo A23187 (5  $\mu$ M) para indução da reação acrossomal. Ao final dos tratamentos, os espermatozoides foram fixados em 3,7% de paraformaldeído por 30 minutos, permeabilizados em 0,1% de triton X-100 por 10 minutos e bloqueados em 1% de BSA em PBS overnight. Ao término do bloqueio, os espermatozoides foram incubados por 1 h a temperatura ambiente com anticorpo primário de coelho anti-CamKII (isoformas alfa, beta, gama e delta) ou de coelho anti-CamKII fosforilada em treonina 286 (T286; fosfoCamKII) na diluição de 1:100. Em seguida os espermatozoides foram lavados e incubados por 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário Alexa Fluor-555 anti-IgG de coelho na diluição de 1:200. O acrossomo foi marcado com FITC-PSA (100  $\mu$ g/ml) e o DNA com Hoescht 33342 (5  $\mu$ g/ml). Após a imunofluorescência, os espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, e as imagens analisadas pelo software image J. Foram realizadas 3 replicatas, sendo avaliada 50 células por tratamento em cada replicata. Os dados foram analisados estatisticamente pelo SAS empregando o teste 't-student'. Os resultados da Imunofluorescência expresso em média da porcentagem  $\pm$  erro padrão mostraram que o padrão de localização da CamKII e fosfoCamKII foi consistente com o processo de reação acrossomal. Após 5 h de incubação em meio de capacitação, a maioria dos espermatozoides apresentavam a CamKII localizada na região acrossomal dos espermatozoides com o acrossoma íntegro ( $94,4 \pm 2,4\%$ ). A medida que os espermatozoides começaram a sofrer a reação acrossomal como indicado pela intensidade da marcação do acrossomo com FITC-PSA, a localização CamKII na região acrossomal diminuiu gradativamente até não ser mais observada na região acrossomal da maior parte dos espermatozoides com o acrossoma reagido ( $98,7 \pm 1,1\%$ ). Padrão semelhante foi observado na localização da CamKII fosforilada em T286. A maioria dos espermatozoides com a membrana acrossomal íntegra apresentava a CamKII fosforilada em T286 localizada na região apical da membrana acrossomal ( $96,7 \pm 2,7\%$ ). A CamKII fosforilada em T286 migrou da região acrossomal seguindo o processo de reação acrossomal até não ser mais observada na região acrossomal da maioria dos espermatozoides ( $98,6 \pm 0,6\%$ ) com acrossoma reagido. Os dados apresentados no presente trabalho estão de acordo com o papel inibitório da CamKII na reação acrossomal, no qual a CamKII localizada na região acrossomal em espermatozoides com acrossoma íntegro atuaria na inibição da reação do mesmo.

**Palavras-chave:** capacitação, fecundação.

**Keywords:** *capacitation, fertilization.*

**\*Bolsista do programa** "Atração de Jovens Talentos" do Ciências Sem Fronteiras, CAPES - CSF-PAJT - 88887.068701/2014-00.



## **Manifestação de cio e uso de GnRH sobre a taxa de concepção de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo**

*Manifestation of heat and use of GnRH on the conception rates of lactating Nelore cows inseminated at fixed time*

**Luis Eduardo Senra e Silva<sup>1,2,\*</sup>, Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis<sup>1,2</sup>, Moacir Ferreira Duarte Júnior<sup>1,2</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>1,2</sup>, Rodrigo Delbem Almeida<sup>1,2</sup>, Bruno Silva do Espírito Santo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

\*E-mail: luissenra@hotmail.com

O uso da IATF em rebanhos de corte tem proporcionado incremento nos índices de prenhez ao final da estação de monta, melhor uniformidade dos bezerros à desmama e aumento nos índices zootécnicos pós desmama. Sabe-se que o comportamento de estro após a retirada do dispositivo intravaginal aumenta significativamente a probabilidade de concepção à IATF. Contudo, por vezes observa-se baixo número de fêmeas manifestando cio e conseqüentemente taxas de concepção insatisfatórias. Nesse sentido objetivou-se avaliar o uso do GnRH no momento da inseminação em vacas que manifestaram cio ou não sobre a taxa de concepção de vacas Nelore com pós-parto entre 30 e 60 dias. Foram utilizados 879 animais divididos em 4 lotes, cada lote foi submetido à inserção do dispositivo intravaginal novo com 1,2 g de progesterona e 2 mg de benzoato de estradiol no início do protocolo, oito dias após, o implante foi retirado e feita a administração de 250 mg de cloprostenol sódico, 300 UI de eCG e 2 mg de cipionato de estradiol, bem como a marcação da região do osso sacro até a inserção da cauda com bastão de tinta à base de cera. As vacas foram inseminadas em tempo fixo 54 horas após a remoção do dispositivo intravaginal e neste momento foi feita a leitura da marcação com o bastão e a divisão nos seguintes tratamentos: CSGS (cio sim GnRH sim); CSGN (cio sim GnRH não); CNGS (cio não GnRH sim) e CNGN (cio não GnRH não). Os animais foram considerados em cio quando no momento da IATF não apresentavam nenhum resquício da marcação feita no manejo anterior. A administração de gonadorelina (hormônio sintético análogo ao GnRH) ocorreu pela via intramuscular no momento da inseminação, na dose de 0,1 mg. O experimento foi conduzido em blocos casualizados onde cada lote foi considerado um bloco e os dados analisados pelo teste de Qui-quadrado. No presente estudo foi observado aumento de aproximadamente oito pontos percentuais na taxa de concepção de vacas que manifestaram cio frente àquelas que permaneceram com a tinta (59,86% vs. 52,40%,  $p < 0,0001$ ). A probabilidade de concepção à IATF aumenta com a manifestação de cio das vacas submetidas ao protocolo, isso porque fêmeas que demonstram sintomatologia de estro têm folículos ovulatórios maiores que por sua vez secretam mais estrógeno e estimulam com mais eficiência o pico pré ovulatório de GnRH e conseqüentemente LH. As taxas de concepção para os grupos foram as seguintes: CSGS 62,42%<sup>a</sup>; CSGN 57,10%<sup>b</sup>; CNGS 55,91%<sup>b</sup>; CNGN 49,75%<sup>c</sup> ( $p < 0,0001$ ). Mesmo em vacas com presença de estro, que teoricamente têm secreção endógena de GnRH suficiente para induzir a ovulação, o uso do GnRH exógeno promoveu incremento na taxa de concepção, que pela nossa ótica pode ser explicado por melhor sincronização da ovulação neste grupo. A administração de GnRH em vacas sem comportamento estral (CNGS) elevou o índice de concepção para nível próximo ao grupo CSGN, provavelmente porque o GnRH exógeno supriu a deficiência no grupo sem detecção de estro. Portanto, conclui-se que o uso de GnRH exógeno no momento da IATF promove incremento na taxa de concepção de vacas lactantes com e sem a manifestação de estro.

**Palavras-chave:** Estro, GnRH, IATF, Nelore.

**Keywords:** *Estrus, GnRH, FTAI, Nelore.*



## Marcação da pluripotencialidade do fígado de embriões bovinos através da imunohistoquímica Oct4

*Marking of pluripotency of the liver of bovine embryos through the immunohistochemistry Oct4*

**Rafael Garcia Karam<sup>1,\*</sup>, Ana Lídia Jacintho Delgado<sup>1</sup>, Naira Caroline Godoy Pieri<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Ambrósio<sup>2</sup>, Mirella Ridolfi de Freitas<sup>1</sup>, Ana Flávia de Carvalho<sup>1</sup>, Celina Almeida Furlanetto Mançaneres<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), São João da Boa Vista, SP, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (FZEA/USP), Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: rafgkaram@gmail.com

O fígado é a maior glândula do corpo animal e tem função tanto exócrina quanto endócrina localizado na porção cranial do abdome caudal ao diafragma. É um importante órgão de destoxificação do corpo, como um importante órgão hematopoietico, devido a sua possível pluripotencialidade na fase embrionária, que poderá ser a chave para o futuro tratamento de doenças hepáticas. Durante a gestação processo de hematopoiese migra temporariamente do saco vitelino para o fígado fetal, sendo o principal sítio de hematopoiese no feto até o desenvolvimento da medula óssea. Entender os mecanismos que controlam a pluripotência e a capacidade de auto-renovação das células tronco embrionárias é fundamental para o controle da diferenciação *in vitro*. Entretanto, células-tronco embrionárias proliferam indefinidamente *in vitro*, mantendo seu potencial de diferenciação para quase todos os tipos celulares, sendo assim é essencial estabelecer métodos para proliferação de células-tronco hepáticas como uma fonte bipotencial para diferenciação de hepatócitos. Devido a estes fatos este trabalho tem por objetivo identificar os sítios de células pluripotentes no fígado de embriões bovinos em diferentes estágios por meios de marcação com Oct 4 (Fator de transcrição Oct-4 POU - Pict-Oct-Unc), visando futuras pesquisas para caracterização “*in vitro*” destas células. Para este trabalho foram coletados em frigorífico embriões bovinos de 24 a 60 dias de gestação que foram divididos em grupos de acordo com suas idades gestacionais e analisados através da imunohistoquímica para marcação de Oct4. Os embriões do grupo 1, com Crown Rump (CR) 0,4 cm e idade gestacional de 24 a 26 dias, apresentaram-se com um grande número de células pouco desenvolvidas, pois a marcação do Oct-4 é muito inespecífica, marcado muito pouco ou quase nada das células encontradas. No grupo 2, CR 0,9 cm e idade gestacional de 27 a 29 dias, os embriões ainda obtinham células pouco desenvolvidas e específicas, porém foi possível observar a marcação em regiões com aglomerados de eritroblastos sem a marcação em hepatoblastos. No grupo 3, CR 1,4 cm e idade gestacional de 30 a 35 dias, os embriões ainda apresentam uma marcação imunopositiva pelo Oct-4 em eritroblastos e poucas marcações de células precursoras hepáticas. Os embriões do grupo 4, CR 2,5 cm e idade gestacional de 36 a 46 dias, apresentaram-se um número consideravelmente mais baixo de células marcadas pelo anticorpo do que nos grupos anteriores, provavelmente devido a suas células estarem mais especializadas e a diminuição do número de eritroblastos presentes no fígado. No grupo 5, CR 5,8 cm e idade gestacional de 47 a 60 dias, os embriões continuaram a apresentar um menor número de células marcadas. Com o evoluir do desenvolvimento embrionário podemos observar que os hepatoblastos vão se organizando e o tecido mesenquimal vai sendo substituído por pequenos capilares sinusóides e uma grande quantidade de células hepáticas especializadas. Concluímos até o momento que os hepatoblastos começam a se diferenciarem em hepatócitos por volta do 33º dia de gestação e os eritrócitos foram as células que mais se destacaram na marcação pelo Oct-4, expressando assim sua pluripotencialidade, podendo esta ser a melhor fase para o cultivo dessas células.

**Palavras-chave:** desenvolvimento embrionário, fígado, bovinos.

**Keywords:** *embryonic development, liver, bovine.*

<sup>‡</sup>Bolsista da FAPESP.



## O processo de inseminação artificial interfere na concentração de parâmetros sanguíneos relacionados ao bem-estar animal?

*Does the process of artificial insemination interfere with the concentration of blood parameters related to animal welfare?*

**Bruna Marcele Martins de Oliveira<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Milton Maturana Filho<sup>1</sup>, Eduardo Harry Birgel Júnior<sup>3</sup>, Daniela Becker Birgel<sup>3</sup>, Fábio Celidônio Pogliani<sup>4</sup>, Luciano Andrade Silva<sup>5</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório Multiusuário de Análises clínicas Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária, FZEA/USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>4</sup>Clínica de bovinos e pequenos ruminantes, Departamento de Clínica Médica, FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil; <sup>5</sup>Laboratório de Teriogenologia Dr. O.J. Ginther, FZEA/USP, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: celeghin@usp.br

O objetivo deste estudo foi verificar se o processo da inseminação artificial (IA) causa alterações nas concentrações de parâmetros relacionados com o bem-estar em vacas paridas da raça Nelore. Os 18 animais foram submetidos a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação e divididos em dois grupos experimentais: grupo controle, não inseminado (GC, n=9) e grupo submetido à inseminação artificial (GIA, n=9). Foram utilizadas amostras de sangue de ambos os grupos, que foram coletadas 30 horas antes da IA (T-30), 4 (T4), 24 (T24), 48 (T48) e 168 (T168) horas após a IA. As amostras foram submetidas à quantificação dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) e beta-hidroxibutirato (BHB) utilizando analisador bioquímico automático (RX Daytona) e à dosagem de cortisol, pela técnica de radioimunoensaio. Os dados foram analisados pelo PROC MIXED (SAS, versão 9.2, 2010). Foram consideradas diferenças estatísticas quando  $P < 0,05$ . Em nenhum dos períodos de avaliação foi notada diferença entre os grupos com relação aos valores de NEFA (mmol/L). No decorrer do tempo, o GC não teve alterações nas concentrações deste metabólito (T-30:0,92±0,14; T4:0,86±0,18; T24:1,08±0,17; T48:0,92±0,14; T168:0,73±0,12) ( $p=0,62$ ). Já o GIA apresentou concentrações mais altas 24 horas após o procedimento, quando comparado às concentrações observadas 168 horas após a IA (T-30:0,65±0,07<sup>ab</sup>; T4:0,69±0,11<sup>ab</sup>; T24:1,18±0,14<sup>a</sup>; T48:0,90±0,16<sup>ab</sup>; T168:0,64±0,14<sup>b</sup>) ( $p=0,02$ ). Com relação ao BHB (mg/dL) também não foi notada diferença entre os grupos em nenhum dos períodos de avaliação. No decorrer do tempo, os grupos se comportaram de maneira semelhante, apresentando concentrações mais altas desse metabólito 48 horas após a IA quando comparados aos demais momentos de avaliação (GC - T-30:4,96±0,62<sup>b</sup>; T4:5,28±0,49<sup>b</sup>; T24: 6,87±1,05<sup>b</sup>; T48: 9,09±1,17<sup>a</sup>; T168: 5,08±0,59<sup>b</sup>) ( $p=0,004$ ), (GIA - T-30: 5, 33±0,31<sup>b</sup>; T4:6,59±0,50<sup>b</sup>; T24:7,63±0,87<sup>b</sup>; T48:10,38±0,63<sup>a</sup>; T168:5,45±0,47<sup>b</sup>) ( $p < 0,0001$ ). Já para o cortisol (nM/L), as concentrações foram semelhantes entre os grupos em todos os períodos de avaliação, sendo que não foram observadas alterações no decorrer dos momentos de avaliação. (GC - T-30:60,88±9,90; T4:88,05±16,62; T24: 63,88±9,97; T48:59,21±11,58; T168: 71,54±9,82) ( $p=0,42$ ), (GIA - T-30:60,75±10,70; T4:88,06±18,87; T24:89,18±30,19; T48:75,57±21,88; T168:79,93±16,92) ( $p=0,87$ ). No entanto, após o início do manejo a concentração ultrapassa os valores de referência para este hormônio (68,9 nM/L). Sendo assim, nessas condições experimentais e utilizando esse número de animais, o processo da IA não causa alterações nas dosagens de NEFA, BHB e cortisol em vacas paridas da raça Nelore. No entanto, os procedimentos realizados durante o protocolo de IATF é capaz de alterar as concentrações de cortisol, atingindo parâmetros acima do estabelecido como fisiológico.

**Palavras-chave:** bovinos, IATF, cortisol, NEFA, BHB.

**Keywords:** bovine; timed artificial insemination; cortisol; non-esterified fatty acids; beta-hydroxybutyrate.



## **Pré-sincronização do estro em novilhas *Bos taurus indicus* visando o incremento da eficiência reprodutiva na estação de monta**

*Estrus pre synchronization in Bos taurus indicus heifers aiming reproductive efficiency maximization during breeding season*

**Rafaela Talini<sup>1</sup>, André Bastos de Souza<sup>2</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>1</sup>, Marcio Saporski Segui<sup>1</sup>, Victor Breno Pedrosa<sup>3</sup>, Romildo Romualdo Weiss<sup>4</sup>, Ana Claudia Machinski Rangel de Abreu<sup>4</sup>, Grassiele Gassenferth<sup>1</sup>, Louise Helene Bacher<sup>1</sup>, Isabella Sellmer Ramos<sup>1</sup>, João Vitor Viscardi Brighenti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>PUCPR, Medicina Veterinária, Curitiba, PR, Brasil; <sup>2</sup>Vet Maxi Consultoria Pecuária, Curitiba, Paraná, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; <sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

\*E-mail: isabella\_sellmer@hotmail.com

O presente estudo teve como objetivo verificar a eficácia da aplicação de protocolos hormonais de pré-sincronização em novilhas *Bos taurus indicus*, antes do início da estação reprodutiva em uma fazenda comercial, visando o incremento da taxa de prenhez (TP) ao final da estação de monta. Foram utilizadas 277 novilhas da raça Nelore (15 a 25 meses), distribuídas em três grupos, para efeitos de pré-sincronização (46 dias antes do protocolo da IATF). Grupo GnRH, recebeu no dia d-46 100,00 mcg de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (n= 117); o grupo benzoato de estradiol (BE; n = 82) recebeu 1,0 mg de BE e um grupo controle, não recebeu hormônio algum (n=78). Todos os grupos foram submetidos à exames de ultrassonografia para checagem do status ovariano em d-46 e d0. Após 46 dias, os grupos foram submetidos a aplicação de idêntico protocolo para a IATF, tendo os ovários sido examinados novamente com vistas à ciclicidade. Protocolo de IATF administrado aos grupos: d0: P4 + BE; d8: -P4 + PGF2 alfa + eCG; d9: BE; d10: IATF. As TP dos grupos GnRH+BE (somadas) quando comparada a do controle após a IATF resultou respectivamente em 30,6 e 47,4% (P<0,05), porém, ao final da estação de monta, a TP (final) dos tratados foi superior à do controle (82,9% e 70,5%, respectivamente) (P<0.05). Concluiu-se que os tratamentos de pré-sincronização, independente dos hormônios utilizados, incrementaram a eficiência reprodutiva ao final da estação de monta, sendo recomendada sua aplicabilidade.

**Palavras-chave:** novilhas *Bos taurus indicus*, pré-sincronização, GnRH, Benzoato de estradiol, eficiência reprodutiva.

**Keywords:** heifers, pre synchronization, GnRH, oestradiol benzoate, reproductive efficiency.



## Prevalência de desordens reprodutivas no período pós-parto em vacas leiteiras

*Prevalence of reproductive disorders in the post partum period in dairy cows*

**Cristiano Oliveira Pereira<sup>1</sup>, Matheus Soares<sup>1</sup>, Marco Túlio Resende dos Reis<sup>2</sup>, João Bosco Barreto Filho<sup>3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Médico Veterinário, Fazenda Vargem Grande, Itutinga, MG, Brasil; <sup>3</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

\*E-mail: barreto@dmv.ufla.br

As patologias puerperais afetam negativamente a eficiência reprodutiva do rebanho. Na bovinocultura de leite, aumentam o período de serviço e diminuem a produção leiteira levando à perdas econômicas na atividade. As desordens reprodutivas se estabelecem devido a fatores relacionados à nutrição, ao balanço energético negativo, à doenças infecciosas e à genética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de desordens reprodutivas no período pós-parto em vacas leiteiras e investigar a sua incidência em relação às variáveis período do ano (“secas”, “águas”) e número de lactações da fêmea (1-6 ou mais lactações). A avaliação foi realizada no ano de 2016 em uma propriedade localizada no município de Itutinga, Minas Gerais, Brasil, (21°18'29.89"S 44°42'30.89"W), com produção de leite diária de 9.000 litros. Foram analisados os dados coletados entre abril de 2014 e abril de 2016 de 649 animais com variados graus de cruzamentos entre as raças Gir e Holandesa, dos quais 400 encontravam-se em lactação. Utilizou-se o *software* de controle de dados dos animais (IDEAGRI, Belo Horizonte, Brasil) para consultar seus históricos individuais e para a análise estatística utilizou-se o teste de Qui-quadrado que avalia a associação existente entre variáveis qualitativas. As prevalências das desordens apresentadas pelo rebanho foram: aborto (10,02%), cistos ovarianos (17,41%), infecções uterinas (18,33%), mortalidade embrionária (8,32%) e retenção de placenta (22,34%). Foram encontradas diferenças estatísticas para as ocorrências de cistos ovarianos em função do número de lactações e mortalidade embrionária de acordo com o período do ano ( $p < 0,05$ ). Os índices do rebanho para aborto, mortalidade embrionária e retenção de placenta foram superiores aos encontrados na literatura que são de 1,5-6,5%, 3,2% e 10%, respectivamente. Já as taxas de cistos ovarianos e infecções uterinas foram semelhantes às encontradas em outros trabalhos 18-19% e 21,6% para as respectivas patologias. A relação cistos ovarianos X número de lactações apresentou os seguintes índices: lactação 1 (7,84%); 2 (19,74%); 3 (20,71%); 4 (29,35%); 5 (14,75%) e 6 ou mais (11,76%). Os índices de mortalidade embrionária observados foram de 6,6% para o período das águas e 10,71% para o período das secas. É possível que a ordem de lactação tenha influenciado a incidência de cistos foliculares pelo aumento da produção de leite e demanda metabólica dos animais, levando a distúrbios no processo de ovulação. Por outro lado a mortalidade embrionária observada foi maior no período das secas, fato inusitado, pois se sabe que uma das principais causas de perda embrionária são as altas temperaturas características do período das águas que levam os animais ao estresse térmico e baixa eficiência reprodutiva. Outros fatores relacionados à mortalidade embrionária devem ser investigados para determinação das causas que levaram a esta alta prevalência.

**Palavras-chave:** bovino, vacas leiteiras, reprodução, desordens reprodutivas.

**Keywords:** bovine, dairy cows, reproduction, reproductive disorders.



## **Produção *in vitro* de embriões bovinos com sêmen capacitado e suplementado com pentoxifilina**

*Bovine in vitro embryo production with capacitated sperm supplemented with pentoxifylline*

**Fabiana Mariani Wingert, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis\*, Tathiana Ferguson Motheo, Carolina Ines de Oliveira Pereira**

Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil.

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

O processo de criopreservação espermática além de causar danos a membrana plasmática, resulta em diminuição da motilidade celular. Ainda, tais efeitos deletérios têm influência direta sobre os resultados da produção *in vitro* de embriões (PIVE). A pentoxifilina (PTX) é uma metilxantina utilizada em biotecnologias de reprodução, que é capaz de aumentar a motilidade espermática. Objetivo do presente estudo foi verificar se diferentes concentrações de pentoxifilina, utilizadas na capacitação espermática, influenciam nas taxas de fertilização e na PIVE. Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) graus I, II e III foram obtidos por meio de aspiração de ovários provenientes de abatedouro e foram submetidos à maturação *in vitro* em meio comercial de maturação (MIV: TCM-199 + glutamina + Hepes + piruvato + SFB + antibióticos + FSH + LH + estradiol + aminoácidos) em incubadora de CO<sub>2</sub> à 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar por 24 horas. Após esse período, os COCs foram transferidos para meio comercial de fertilização (FIV – TL Sperm: meio de Tyrode + albumina + lactato + BSA + piruvato + antibióticos + PHE + heparina). Para a fertilização, foram utilizadas palhetas de sêmen de 4 touros da raça Nelore, descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Análises de motilidade e vigor espermáticos foram realizadas e em seguida, o sêmen foi submetido a gradientes descontínuos de Percoll (45% e 90%) por 7 minutos a 575 x g. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 1mL de meio FIV. A amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos e retirou-se 240µL do pellet, no qual foi acrescido o mesmo volume de meio FIV. O volume final foi dividido em 3 alíquotas correspondentes a três tratamentos: Controle (C - sem suplementação), T10 (suplementação com 10mM de PTX) e T20 (suplementação com 20mM de PTX). Após esse processo, novas análises de motilidade e vigor foram realizadas e utilizando uma dose inseminante de 10<sup>5</sup> espermatozoides/gota, procedeu-se a FIV em incubadora de CO<sub>2</sub> nas mesmas condições de temperatura e atmosfera por mais 20 horas. Após esse período, os oócitos fertilizados foram desnudados e submetidos ao cultivo *in vitro* em meio comercial de cultivo (CIV: SOFaac + aminoácidos essenciais + BSA + antibióticos + SFB) em incubadora à 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar por 7 dias. As taxas de clivagem e o percentual de blastocistos expandido/ número de clivados foram determinados no dia 3 e 7 do cultivo, respectivamente. Ainda alíquotas dos meios FIV e CIV foram retiradas, após a fertilização e cultivo, para a avaliação do estresse oxidativo espontâneo (TBARS espontâneo) O experimento foi realizado por meio de delineamento de blocos casualizados. As médias foram analisadas através de análise de variância (ANOVA), sendo comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, por meio do programa estatístico SAS (versão 9.2). A utilização de PTX nas concentrações de 10 e 20 mM após a capacitação espermática não alterou a produção de espécies reativas ao oxigênio nos meios FIV e CIV após a fertilização e cultivo *in vitro* e as taxas de fertilização *in vitro*. Porém, observou-se diminuição das taxas de clivagem dos grupos T10 (35%) e T20 (34%) comparativamente ao controle (40%) (p=0,0173). Ademais, foi observado decréscimo na porcentagem de blastocistos expandidos produzidos nos grupos tratados com PTX (T10: 14% e T20: 20%) em relação ao controle (27%) (p=0,0424). Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a adição de PTX nas concentrações de 10mM e 20mM é deletéria quando utilizada na capacitação espermática durante a PIVE.

**Palavras-chaves:** fertilização, metilxantina, PIV.

**Keywords:** fertilization, methylxanthine, IVP.



## **Produção *in vitro* de embriões bovinos na presença de meio condicionado por células tronco mesenquimais**

*In vitro production of bovine embryos in the presence of mesenchymal stem cells conditioned medium*

**Mídyan Daroz Guastali<sup>1</sup>, Marina Alvarenga<sup>2</sup>, Danielle Jaqueta Barberini<sup>1</sup>, Pericles Assad Hassun Filho<sup>2</sup>, Mateus José Sudano<sup>3</sup>, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>2</sup>Omics Biotecnologia Animal LTDA, Fazenda Matão, Botucatu, SP, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Uruguaiana, RS, Brasil.

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

No meio condicionado (MC) pelas células tronco mesenquimais (CTM) estão presentes inúmeros fatores tróficos como citocinas e fatores de crescimento que levam ao aumento da proliferação celular e diminuição da apoptose. Na produção *in vitro* de embriões bovinos, a adição de fatores de crescimento tem sido preconizada em substituição ao uso do SFB, devido aos efeitos deletérios do último. Sendo assim, neste experimento, esperamos demonstrar que os constituintes do meio condicionado por CTM possuem propriedades tróficas capazes de sustentar a sobrevivência e desenvolvimento de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos submetidos ao cultivo *in vitro* em 3 tipos de meios condicionados por CTM. Os meios condicionados foram obtidos pós-cultivos de células mesenquimais de tecido adiposo em ausência de SFB por 72 horas, foram utilizados os meios DMEM alta glicose (G1), DMEM baixa glicose (G2) e SOFaaci acrescido de 0,005g/ml de BSA, 0,011g/ml de Piruvato e 100µg/ml de Penicilina/Estreptomicina (G3). Como controle (C) foi utilizado o SOFaaci acrescido de 0,005g/ml de BSA, 0,011g/ml de Piruvato, 2,5% de SFB e 100µg/ml de Penicilina/Estreptomicina. Vinte e cinco complexos cumulus-oócito (COC) de graus 1 e 2 foram maturados em gotas de 90µl de TCM199 acrescido de 2,5% de SFB, 0,011g/ml de piruvato, 50UI/ml e 100µg/mL penicilina e estreptomicina. Após um período de maturação de 22-24 horas, os oócitos foram lavados e transferidos para placas contendo gotas de 90µl de meio de fertilização (FIV) composto por TL-stock, 0,006g/ml de BSA, 0,011g/mL de Piruvato, 176UI/mL de heparina, PHE, 100µg/ml de Penicilina/Estreptomicina em estufa a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Vinte horas após a FIV, os possíveis zigotos foram desnudados por repetidas pipetagens e subdivididos nos 4 grupos de cultivo *in vitro*. As estruturas foram transferidos para gotas de 90 uL do respectivo meio, sendo cultivadas por sete dias em estufa a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Noventa e seis horas após a fertilização (D4), a taxa de clivagem foi avaliada, as estruturas degeneradas e os embriões clivados em duas células foram descartados e realizado o feeding. Foram realizadas 3 repetições. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de múltiplas comparações utilizando o programa SAS-PROC GLM. As taxas de produção de blastocistos/maturados foram mais altas no grupo controle (24,85%-37/148) em comparação aos demais grupos. O DMEM (tanto o alta quanto baixa glicose) condicionado por CTM se mostrou mais adequado para produção de blastocistos em comparação ao SOF, com taxas de produção de blastocistos de 18,50% (25/137), 16,24% (22/133) e 9,93% (13/129) para os meios DMEM alta, DMEM baixa e SOF respectivamente. Conclui-se que o meio DMEM (baixa e alta glicose), mais comumente utilizado em cultivos celulares, é mais eficiente na produção de meios condicionados visando à produção de blastocistos bovinos *in vitro* em ausência de SFB.

**Palavras-chave:** produção *in vitro* de embriões, bovinos, meio condicionado, células-tronco mesenquimais.

**Keywords:** *in vitro production of embryos, bovine, conditioned medium, mesenchymal stem cells.*

## Produção *in vitro* de embriões bovinos vitrificados pela técnica de Cryotop

*In vitro production of bovine embryos vitrified by the technique of Cryotop*

**Anelise de Sarges Ramos<sup>1,\*</sup>, Alessandra de Moraes Sousa<sup>2</sup>, Elenara Botelho Araújo<sup>3</sup>, Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos<sup>4</sup>, Marcielly de Fátima da Costa Lobato<sup>5</sup>, Mauro Andrey Rodrigues Morais<sup>5</sup>, Moises Moreira Lima<sup>6</sup>, Vanessa Cunha de Brito<sup>6</sup>, Nathalia Nogueira da Costa de Almeida<sup>7</sup>, Otávio Mitio Ohashi<sup>8</sup>, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro<sup>9</sup>, Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>9</sup>**

<sup>1</sup>Residente de Reprodução Animal, UFRA, Belém, PA, Brasil; <sup>2</sup>Mestranda de Pós-graduação Ciência Animal, UFMT, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Médica Veterinária; <sup>4</sup>Doutoranda de Pós-graduação Ciência Animal, UFPA, Belém, PA, Brasil; <sup>5</sup>Graduandos da FIBRA Belém, PA, Brasil; <sup>6</sup>Graduandos da UFPA, Belém, PA, Brasil; <sup>7</sup>Professora da FIBRA Belém, PA, Brasil; <sup>8</sup>Professor da UFPA; <sup>9</sup>Professor da UFRA, Belém, PA, Brasil.

\*E-mail: anelise.sarges@hotmail.com

O processo de vitrificação de embriões bovinos possui grande importância econômica e zootécnica, consistindo na passagem direta do estado líquido para o estado vítreo e amorfo, sem ocorrência de cristalização dos meios criopreservados, a qual é possível devido à alta concentração de soluto na solução, bem como a grande velocidade de congelamento por imersão direta das soluções em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). Objetivou-se com este trabalho avaliar a vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, através da técnica de cryotop e vitrificados por duas diferentes metodologias. O experimento foi conduzido na Universidade Federal do Pará, sendo utilizado ovários bovinos obtidos no abatedouro local. O processo de produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi realizado através das etapas de maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Após sete dias de CIV foram realizadas as contagens dos embriões, os quais foram classificados em blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido de acordo com o estágio de desenvolvimento, para posteriormente serem vitrificados. Para o processo de vitrificação, os embriões foram retirados das gotas de cultivo e lavados três vezes em meio de manutenção (SOF suplementado com 10% de SFB a 37°C) e vitrificados de acordo com o grupo experimental. Grupo 1 (G1), os embriões foram para gotas de equilíbrio (GE), contendo meio de manutenção (MM) com 7% de etilenoglicol (EG) e 7% glicerol (GLY) a 37°C durante três minutos, em seguida para a gota de vitrificação – GV (MM+ 16% de EG + 16% de GLY a 37°C), após 30 segundos foram para a extremidade da haste da palheta de vitrificação (cryotop) e após 40 segundos imergidos em N<sub>2</sub>. No grupo 2 (G2), os embriões foram para GE, contendo MM com 20% EG durante três minutos, posteriormente foram transferidos para o GV (MM + 30% EG + 18% Ficoll + 10,26% de sacarose) durante 40 segundos e foram para a extremidade da haste da palheta de vitrificação (cryotop) e imergidos em N<sub>2</sub>. O reaquecimento dos embriões foi feito primeiramente imergindo-os em uma primeira solução (MM + 1,0 M de sacarose, a 37°C) durante um minuto. Em seguida, transferidos para segunda solução (MM+ 0,5 M de sacarose, a 37°C) por cinco minutos, e depois para solução final de reaquecimento (MM) por dez minutos. Após esse processo foram cultivados (nas mesmas condições de cultivo) e a análise da sobrevivência dos blastocistos foi realizada através da avaliação das taxas de reexpansão e eclosão com 48 horas de cultivo pós-criopreservação. Foram vitrificados um total de 84 embriões na M1 e 64 na M2, totalizando 148 embriões. Para a análise das diferentes condições experimentais, a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey foram utilizados, adotando-se o nível de significância de 5%. No G1 a taxa de reexpansão e eclosão foi de 25%±14,96%, no G2 foi de 26,56%±32,68%. Apesar de não ter sido observado diferença estatística entre os dois grupos testados, notou-se que os embriões vitrificados utilizando ficoll/EG/sacarose apresentaram taxa de retorno mais elevada (26,56%), o que pode ter ocorrido devido à ação do ficoll, o qual aumenta a tensão superficial da solução, melhorando assim, a proteção das membranas celulares. Além disso, afirmam também que a associação ficoll/EG causa uma transição mais lenta para o estado vitrificado se comparado com o EG sozinho, permitindo a diminuição da quantidade de EG necessária para a vitrificação dos embriões (Shaw, R. et al. 1997. *Cryobiology*, 34:295-301). Portanto, as duas metodologias testadas permitiram a sobrevivência embrionária, pós-vitrificação. No entanto, mais repetições são necessárias para determinar qual melhor método de vitrificação de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** criopreservação, criotolerância, cultivo embrionário.

**Keyword:** *criopreservation, cryotolerance, embryoculture.*



## Qualidade do sêmen de touros jovens Nelore antes e durante a estação de monta

*Semen quality of Nelore young bulls before and during the breeding season*

Talita Raquel Cavichioli Sebastião<sup>1,\*</sup>, Camila Dutra de Souza<sup>3</sup>, Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak<sup>4</sup>,  
Gabriela Figueredo Cornacini<sup>1</sup>, William Mituzi Tateisi<sup>1</sup>, Rodrigo Gomes Ricci<sup>1</sup>,  
Marcelo George Mungai Chacur<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduandos de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>2</sup>Docente da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>3,4</sup>Pós-Graduandos em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

\*E-mail: talita\_\_cavichioli@hotmail.com

Na reprodução de bovinos de corte, com a estação de monta na primavera e verão, é de extrema importância a realização de exames andrológicos para a escolha de touros aptos à atividade reprodutiva. A qualidade do sêmen sofre influência da temperatura ambiente e da umidade do ar, sendo preciso haver uma satisfatória termorregulação testicular para a boa qualidade do sêmen produzido pelo touro. O presente estudo objetivou comparar o quadro seminal de touros jovens da raça Nelore na pré-estação de monta e durante a estação de monta. Foram utilizados 20 touros da raça Nelore com idade média de 24 meses, criados extensivamente em pasto de *Brachiaria decumbens* com acesso a mistura mineral e água à vontade, em uma propriedade situada no município de Anaurilândia, MS. As coletas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação (Eletroejac®, Neovet, Brasil) no período de seis meses (primavera e verão), sendo duas coletas na pré-estação de monta, na primavera (agosto e setembro) e duas na estação de monta, no verão (novembro e dezembro), com intervalos de 30 dias entre elas. As análises realizadas no sêmen foram: volume, cor, aspecto, motilidade (0-100%), vigor (1-5), turbilhão (0-5) e morfologia espermática contando 200 células no microscópio de contraste de fase (E-200®, Nikon, Japão). Os resultados obtidos nas coletas, para o volume, trazem as seguintes médias: coleta 1 - 3,65±2,40 mL, coleta 2 - 4,80±2,33 mL, coleta 3 - 5,85±3,18 mL e coleta 4 - 5,97±2,14 mL. Já as médias para motilidade foram: 54,50±14,68% na coleta 1; 69,44±14,02% na coleta 2; 70,75±17,64% na coleta 3 e de 68,94±17,84% na coleta 4. Para o vigor, as médias obtidas foram: 2,50±0,88, na coleta 2 foi de 3,05±0,72; na coleta 3 de 3,05±0,88 e de 2,89±0,80 para a coleta 4. Referente a turbilhão as médias das coletas foram, respectivamente: 1,35±1,13 para a coleta 1; 1,88±1,27 na coleta 2; 2,10±1,29 para a coleta 3 e de 1,84±1,38 na coleta 4. Para Defeitos menores obtiveram-se as seguintes médias: coleta 1 - 9,53±4,12%, coleta 2 - 8,04±4,89%, coleta 3 - 3,74±2,05% e coleta 4 de 7,32±4,62%. Com relação às médias para os defeitos maiores: coleta 1 - 6,65±4,81%; coleta 2 - 7,09±5,27%; coleta 3 - 13,77±6,81% e coleta 4 de 23,10±8,82%. As porcentagens de defeitos espermáticos totais foram de: 16,18±6,85% para a coleta 1, de 15,14±8,63% na coleta 2; de 17,51±7,10% para a coleta 3 e de 30,42±10,34 na coleta 4. As características seminais: volume do ejaculado, defeitos maiores e defeitos totais diferiram de forma significativa ( $P < 0,05$ ), entre estações, sendo maiores na estação do verão. Para as duas estações (primavera e verão) não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para as variáveis motilidade espermática, vigor e turbilhão. Já para defeitos menores, houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre estações do ano, sendo maior na primavera. Conclui-se que o verão influenciou no aumento da porcentagem de defeitos espermáticos totais. A motilidade, vigor e turbilhão não diferiram de forma significativa entre estações. O sêmen dos touros jovens apresentou boa qualidade antes da estação de monta, porém apresentou queda de qualidade na fase final da estação, mês de dezembro.

**Palavras-chave:** touros zebu, características do sêmen, estação do ano, estresse calórico.

**Keywords:** zebu bulls, semen characteristics, season, heat stress.



## Relação dos marcadores mitocondriais de função espermática com fertilidade em bovinos

*Relationship of mitochondrial markers of sperm function with fertility in bovines*

**Shirley Andrea Florez-Rodriguez<sup>1</sup>, Felipe Barbosa dos Santos<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Maíra Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Flávia dos Santos Almeida<sup>1</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>3</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, Júlio Cesar Carvalho Balieiro<sup>4</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia; <sup>3</sup>Laboratório de Andrologia e Transferência de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal; <sup>4</sup>Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: celeghin@usp.br

O espermatozoide ativa a função mitocondrial em diferentes processos fisiológicos, como subproduto destes processo surgem as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Contudo, a relação com fertilidade é ainda controversa. O objetivo deste estudo foi determinar a relação entre os marcadores mitocondriais espermáticos e a fertilidade a campo. Partidas de sêmen bovino (n=29) foram usadas na IATF em vacas Nelore (n=4.795). Foi determinada a taxa de prenhez (TP) aos 35-45 dias por ultrassonografia e divididos em três grupos: alta fertilidade (AF) com TP >60%, média fertilidade (MF) com TP entre 53-59% e baixa fertilidade (BF) com TP <52%. Para a análise do sêmen *in vitro* foram descongeladas duas palhetas de cada partida (37°C por 30 segundos) e diluídas em TALP (5x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL). Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) foi utilizada a sonda JC-1 (153  $\mu$ M, T-3168, Thermo Fisher), determinando a taxa de despolarização da mitocôndria e perda do  $\Delta\psi_m$  (H:L). Foi avaliada a produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) mitocondrial com a sonda MitoSox Red (MITOi, 2  $\mu$ M, M36008, Molecular Probes), a detecção de espécies reativas citoplasmáticas com o Dihydroethidium<sup>®</sup> (DHEi, 360  $\mu$ M, D1168-Thermo Fisher), a produção de peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) e derivados com a sonda Dihidrorodamina (DHRi, 50  $\mu$ M, D1054 –Sigma Aldrich), a produção de óxido nítrico (NO) com a sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAFi, 10  $\mu$ M 50277 Sigma Aldrich), a peroxidação lipídica usou-se a sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup> (2 mM, D-3861, Thermo Fisher Inc., Eugene, Oregon, EUA). Os debris foram detectados usando a sonda Syto-59 (Syto, 750mM, Molecular probes-S1134). A leitura foi realizada no citômetro de fluxo BD AcurriTM (BD Biosciences, São José, CA, EUA). A comparação entre os grupos AF, MF e BF foi realizada pelo procedimento PROC GLIMMIX do programa SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), por ANOVA e Tukey (P=<0,10). Os resultados foram expressos em relação à mediana da intensidade de fluorescência para a porcentagem de espermatozoides positivos para o DHEi, MITOi, DAFi, BODIPYi e DHRi. Como resultado, 7 partidas apresentaram AF com TP de 65,6±3,82%, 12 apresentaram MF com TP de 56,25±1,91 e 10 partidas apresentaram BF com TP 45,6±8,47% (P<0,05). O MITOi diferiu nos grupos de fertilidade (P=0,052) produzindo maior O<sub>2</sub><sup>-•</sup> mitocondrial nos grupos MF (509,54±61,25), em relação aos AF (358,0± 80,2) e BF (270,3 ± 67,1) respectivamente, o DHEi não diferiu (P=>0,10) entre grupos AF, (362,42±58,64) MF (377,66±49,14) e BF; (275,48±47,14). O DAFi não diferiu (P≥0,10) entre AF (4609,34±962,46), MF (3581,99±776,35) e BF; (3336,82±857,01). No entanto, a produção de RNS diferiu estatisticamente (P=0,084) sendo maior no grupo AF (887,21±174,28) e MF (996,04±133,11) em comparação ao grupo BF (531,7±145,81). Embora numericamente o grupo AF (1833,07±404,52) e MF (1985,17±330,17) apresentaram maior taxa peroxidação lipídica em comparação ao grupo BF (1424,62±320,4) estes grupos não variaram significativamente (P≥0,10). A relação entre o alto e baixo PMM (H:L) não foi diferente (P≥0,10). No geral os marcadores de atividade mitocondrial apresentaram-se superiores no grupo de alta fertilidade e média fertilidade. Apesar do alto grau de variação biológica, evidenciou-se o paradoxo da menor produção de espécies reativas como um indicador de menor potencial de fertilidade. Conclui-se que a produção em concentrações fisiológicas de ROS e RNR não são simplesmente deletérios para o espermatozoide, pelo contrário indicam uma maior ativação da mitocôndria espermática e potencial fertilidade *in vivo*.

**Palavras chaves:** Citometria de fluxo, mitocôndria, fertilidade, espermatozoide.

**Keywords:** Flow cytometry, mitochondria, fertility, spermatozoa.



## Repasse de IATF com monta natural nas proporções touro vaca de 1:20 e 1:40 alternado

*FTAI repass with natural mating on the bull/cow proportions of 1:20 and 1:40 switched*

Nathália Albaneze Anache<sup>1</sup>, Walvonvitis Baes Rodrigues<sup>1,\*</sup>, Thiago Vieira Neves<sup>2</sup>, Juliana Correa Borges<sup>1</sup>, Luiz Orcirio Fialho de Oliveira<sup>1</sup>, Urbano Pinto Gomes de Abreu<sup>1</sup>, Karine Casanova da Silva<sup>3</sup>, Alexandre Bezerra de Oliveira<sup>3</sup>, Christopher Junior Tavares Cardoso<sup>3</sup>, Eriklis Nogueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>2</sup>UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFMS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

\*E-mail: witis@uol.com.br

O Brasil apresenta amplo potencial para a pecuária e destaca-se no cenário mundial como o maior exportador de carne bovina. Detém o rebanho de 212 milhões de bovinos, dos quais participam do sistema de cria 90 milhões de matrizes, constituídas por vacas e novilhas adultas, e 2,50 milhões de touros. No País, mesmo com o crescente aumento da IATF, a taxa ainda é baixa, calculada em 12%, com base no número de doses comercializadas em 2016. Deduz-se, portanto, que seguramente mais de 80% dos bezerros nascidos são oriundos de acasalamentos naturais. O manejo reprodutivo do rebanho de corte brasileiro caracteriza-se por sistemas extensivos, com estações de monta definidas nos meses de primavera ou verão, sendo que cerca de 95% do processo reprodutivo ainda ocorre por monta natural. Este trabalho tem por objetivo comparar a relação touro:vaca após IATF, na proporção de 1:20 direto e 1:40 alternado, com descanso dos touros a cada 25 dias, permitindo assim avaliar se há condições de diminuição do volume de touros em fazendas que realizam IATF. O experimento foi realizado na Fazenda Alvorada, município de Figueirão, MS. Após IATF, 634 vacas paridas, foram entouradas por um período de 75 dias. Os touros utilizados foram da raça Nelore, de 3 a 6 anos de idade. Foi ainda avaliado o Escore de Condição Corporal (ECC), seguindo a escala que vai de 1 (extremamente magra) até 5 (extremamente gorda). No Diagnóstico de Gestação final, ainda verificou-se via Ultrassonografia o percentual de perdas embrionárias ocorridas durante o experimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS, e as características incluídas no modelo foram: Relação touro vaca, inseminador, touro, ECC, Tinta, e dias pós-parto, e quando não significativas, foram excluídas. Diferenças com  $P < 0,05$  foram consideradas significativa. As 634 vacas foram divididas em 2 grupos, grupo 1 com 306 vacas paridas com bezerros de 35 – 55 dias de idade, inseminadas em IATF e acasaladas uma semana após com touros Nelore na proporção de 1:20 durante 75 dias até o final da estação de monta. O grupo 2, com 328 vacas paridas, com bezerros da mesma idade do lote 1, após IATF, acasaladas em monta natural a campo com touros Nelore na proporção de 1:40, sendo que estes touros foram submetidos a rodízio e descanso a cada 25 dias. Por um período de 75 dias. Todos os touros foram submetidos a exame andrológico completo seguindo parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, antes e após a estação de monta. Resultados mostram que não houve efeito significativo dos 2 grupos de manejo para a taxa final de prenhez (89,6% X 87,5%). De acordo com os resultados obtidos, o repasse da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), quando a opção for por utilização de monta natural, em uma estação longa de 10 dias IATF + 75 dias de repasse, totalizando 85 – 90 dias (4 – 5 ciclos), a proporção de touro/vacas, quando bem manejados, não interfere no resultado final da propriedade. O percentual de perda embrionária foi de 2,2% e os escores de condição corporal nas escalas de 1 a 5 e 1 a 6 proposta pela EMBRAPA apresentaram médias de 3,15 e 3,79 respectivamente, não apresentando efeito significativo quando comparadas entre si. Conclui-se que com uma estratégia de estação de monta bem conduzida, envolvendo o manejo correto dos touros dentro de um período suficiente para a cobertura à campo, pode-se trabalhar com um número menor de reprodutores no repasse de um programa de Inseminação Artificial em Tempo fixo, tirando melhor proveito dos mesmos.

**Palavras-chave:** inseminação artificial em tempo fixo (IATF), repasse, relação touro/vaca.

**Keywords:** artificial insemination in fixed time (FTAI), to repass, Bull/cow ratio.



## **Sêmen bovino congelado em palhetas de 0,25 ml deve ser previamente diluído para a correta avaliação computadorizada do movimento espermático**

*Frozen thawed bull semen packaged in 25 french straw need to be diluted prior to computer assisted sperm analysis*

**Audrey Martins Salgado<sup>1</sup>, Gustavo Mendes Gomes<sup>2</sup>, Letícia Patrão de Macedo Gomes<sup>2</sup>, Kleber Peixoto Jr<sup>3</sup>, André Maciel Crespilho<sup>2,3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Metodista, São Bernardo do Campo, SP, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil;

<sup>3</sup>Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP; Brasil.

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

Estudos anteriores reportaram uma relação positiva entre o número de espermatozoides dotados de movimento linear e progressivo com a capacidade de transposição das diversas barreiras presentes no trato reprodutor feminino para a ocorrência do processo de fertilização. Por essa razão, a motilidade espermática progressiva (MP,%) e linearidade (LIN,%) tem grande importância no contexto da análise computadorizada do movimento espermático (CASA), representando as variáveis de movimento que isoladamente apresentam as maiores correlações com a qualidade e fertilidade do sêmen bovino. Tendo em vista que diversos fatores podem influenciar a técnica CASA, o objetivo do trabalho foi verificar a influência da concentração de espermatozoides em doses de sêmen congelado em palhetas francesas de 0,25 mL sobre a avaliação da MP e LIN de espermatozoides bovinos. Para o estudo foram selecionadas 100 partidas comerciais de sêmen de diferentes touros e de raças variadas. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C/30 segundos, homogêneas e divididas em duas alíquotas de mesmo volume que foram depositadas em microtubos graduados de 1,5 mL, mantidas em banho seco a 37°C. As amostras foram analisadas através do sistema CASA ISAS® V.1.2 (Proiser, Espanha) seguindo duas metodologias: G1, análise do sêmen recém-descongelado na concentração original da palheta; G2, diluição da alíquota de sêmen em solução de dPBS (Biodux, Campinas, SP) na proporção de 1:1 previamente à análise de qualidade. Amostras dos dois grupos experimentais foram avaliadas quanto à motilidade espermática progressiva e linearidade em câmara modelo Spermtrack® (Proiser, Espanha) com altura de 20 µm entre a base e a lâmina para evitar efeitos de pressão sobre o sêmen. Os dados gerados foram submetidos à modelo linear geral de análise de variância (GLM) e a influência da concentração espermática sobre MP e LIN avaliada através de modelo de regressão (SAS Institute Inc, Cary, USA), considerando o nível de significância de 5%. Houve efeito significativo da diluição do sêmen sobre os resultados da técnica CASA, sendo observada motilidade progressiva média de 22,11<sup>a</sup>% e 26,42<sup>b</sup>% e LIN de 38,52<sup>a</sup> e 46,00<sup>b</sup>%, respectivamente para amostras do G1 e G2 (P<0,0001). Houve efeito da concentração espermática sobre a análise de MP (p=0,0259) e LIN (p=0,0364) das amostras do G1. Para cada aumento de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides na concentração da palheta de 0,25mL houve uma subestimativa de 0,16% e 0,21%, respectivamente para MP e LIN, em relação aos valores reais que deveriam ser apurados para esses parâmetros de movimento espermático. Não houve efeito da concentração espermática sobre a estimativa de MP e LIN para o G2. Na atualidade muitas Centrais de Inseminação Artificial do Brasil congela o sêmen bovino preferencialmente em palhetas de 0,25mL, que embora comportem a mesma concentração espermática em relação às palhetas de 0,5 mL, determinam maior concentração relativa de células espermáticas por mililitro de meio diluidor. Dessa forma, pode-se supor que a maior concentração celular proporciona maior concorrência espacial e ocorrência de colisões entre espermatozoides ao longo de suas trajetórias de movimento, influenciando negativamente a progressividade e linearidade de deslocamento. Conclui-se que para a correta estimativa de MP e LIN, parâmetros apontados como os mais importantes no contexto da análise cinética de espermatozoides bovinos, deve-se realizar a diluição prévia das doses de sêmen quando congeladas em palhetas de 0,25ml.

**Palavras-chave:** bovino, CASA, espermatozoide, linearidade, motilidade progressiva.

**Keywords:** bull, CASA, spermatozoa, linearity, progressive motility.



## Sêmen refrigerado bovino é uma alternativa válida para IATF?

*Does cooled bovine semen is a valid alternative for FTAI?*

**Octavio Fabián Bao Tarragó<sup>1\*</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Shirley Andrea Florez Rodriguez<sup>1</sup>, Máira Rodrigues Bianchi<sup>1</sup>, Felipe Barbosa dos Santos<sup>1</sup>, Vitor Hugo Guilger Gonzaga<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Pirassununga, SP, Brasil.

\*E-mail: fabianbao@usp.br

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) cresceu de 2014 para 2015 em 11,2% e a tendência para o futuro é de se manter em crescimento. A IATF está associada ao incremento produtivo nas propriedades rurais, sendo de grande impacto socioeconômico demandando grande quantidade de emprego e gerando valores no mercado em torno de R\$ 1,7 bilhões no ano 2015. Porém, os resultados das taxas de prenhez ainda são variáveis, o que torna necessário pesquisas para a melhoria da eficiência, neste contexto a qualidade do sêmen utilizado possui envolvimento direto. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tempo de refrigeração do sêmen por 48 horas de reprodutores oriundos de central de inseminação com fertilidade conhecida, utilizando a IATF como teste de fertilidade *in vivo*. Foram colhidos sêmen de três touros como parâmetros mínimos de qualidade de seminal *in natura* ( $\geq 70\%$  de motilidade progressiva,  $\geq 3$  vigor espermático,  $\leq 30\%$  defeitos morfológicos espermáticos totais,  $\leq 10\%$  defeitos maiores) três touros das raças Brangus, Braford e Angus, com idade entre 5 e 7 anos. O sêmen foi colhido por meio de vagina artificial, sendo o ejaculado dividido em três alíquotas, duas alíquotas para refrigeração e uma para criopreservação. Para a refrigeração o sêmen foi diluído nas concentrações de  $15 \times 10^6$  (R15) e  $30 \times 10^6$  (R30) espermatozoides/palheta e para a criopreservação diluído na concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/palheta (CRIO). O diluidor utilizado foi o Botubov<sup>®</sup> (Botupharma – Botucatu/SP). O sêmen armazenado em palhetas de 0,5 mL, lacradas com esferas metálicas e identificadas por impressão em máquina Minitub<sup>®</sup>. A refrigeração foi realizada a temperatura de 5° C por 48 horas em sistema passivo de refrigeração BotuFlex<sup>®</sup> e a criopreservação em sistema automatizado TK4000<sup>®</sup> na curva PIS6. Foram sincronizadas 552 vacas pluríparas e lactantes (45-60 dias de pós-parto) da raça Brangus em programa de inseminação artificial sendo o protocolo da indução a ovulação realizado em dia aleatório do ciclo estral, assim cada vaca recebeu 2,0 mg de Benzoato de Estradiol<sup>®</sup> associado ao dispositivo intravaginal de progesterona monodose contendo 500 mg de progesterona (DIB 0.5<sup>®</sup>). No D8 os implantes foram retirados procedendo-se a administração de 400 UI de eCG e 500 µg cloprostenol sódico, mais 1 mg de Cipionato de Estradiol. A IATF foi realizada entre 48-52 horas após a retirada da fonte de progesterona. Os efeitos fixos do tratamento (R15, R30 e Crio) e dos touros (Angus, Brangus e Braford), assim como a interação Tratamento\*Touro, foram avaliadas empregando o PROC GLIMMIX do SAS. Os resultados da taxa de prenhez para os grupos de vacas inseminadas foram de 49,4% para R15, de 43,38% para R30 e 47,59% para o sêmen criopreservado, não observando-se efeito do tratamento no sêmen. Porém, foi observado efeito individual do touro nas taxas de prenhez, assim o touro Brangus apresentou maior taxa de prenhez ( $p < 0,05$ ) na IATF para o tratamento R15 (60%) do que para o sêmen CRIO (37%). Isto mostra que dependendo do reprodutor pode-se tornar uma opção interessante e economicamente viável, utilizar metade da dose inseminante em programas de IATF maximizando as colheitas seminais sem prejudicar os resultados de prenhez, com mais ênfase e importância para os reprodutores que não toleram bem o processo de criopreservação. Assim, podemos concluir que o uso do sêmen refrigerado até por 48 horas é uma metodologia válida para utilização em programas de IATF.

**Palavras-chave:** sêmen refrigerado, IATF, taxa de prenhez.



## **Substituição do SFB por meio condicionado por células-tronco mesenquimais na produção *in vitro* de embriões bovinos**

*Fetal calf Serum replacement by mesenchymal stem cells conditioned medium in Bovine in vitro embryo production*

**Laís do Nascimento Cintra\*, Elena Carolina Serrano Recalde, Bruna De Vita, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga**

Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

\*E-mail: laisncintra@gmail.com

Em Bovinos, as tecnologias de reprodução assistida, tais como a fertilização *in vitro* (FIV), ainda resultam em menores taxas de produção embrionária em comparação com a fertilização *in vivo*. O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento mais utilizado no cultivo de embriões *in vitro*, uma vez que melhora o desenvolvimento dos blastocistos. Apesar disso, sua presença está relacionada a alterações do metabolismo embrionário, perda de qualidade e indução de modificações na expressão de vários genes embrionários, além de estar correlacionada com diversas anormalidades fetais e placentárias. Na tentativa de minimizar os efeitos deletérios do SFB, várias citocinas e fatores de crescimento têm sido acrescentados aos meios de cultivo embrionários com a intenção de mimetizar as condições de cultivo *in vivo*. Fatores solúveis liberados pelas células-tronco mesenquimais (CTMs) podem ser encontrados nos meios nos quais estas células foram cultivadas, este meio é conhecido como meio condicionado (MC). O objetivo deste estudo foi avaliar a produção embrionária de cultivos realizados com MCs por CTMs obtidas de diferentes fontes, em substituição ao SFB. Para isso, os MCs foram obtidos por meio do cultivo de CTMs equinas, pertencentes ao banco de células previamente estabelecido em nosso laboratório, derivadas de medula óssea (MO), tecido adiposo (TA), alantoide (AL) e âmnio (AM), em meio DMEM/F12, com privação de SFB por 96 horas. O meio foi então colhido e centrifugado por 10 minutos a 300G, filtrado em filtro de 0,22µm, alíquotado e congelado a -80°C até o momento do uso. Os ovários foram coletados em abatedouros comerciais e aspirados com seringa de 20mL e agulha 40x12mm para a obtenção dos oócitos. Após a seleção 20 oócitos/grupo foram colocados para maturação. A fertilização *in vitro* foi realizada depois de 24hs e após 18hs os oócitos foram divididos em 6 grupos para o cultivo embrionário: Meio contendo SOF+BSA (controle negativo -CN), SOF+BSA+ 2,5% de SFB (controle positivo - CP), SOF+BSA+10% de MC-MO, SOF+BSA+ 10% de MC-TA, SOF+BSA+10% de MC-AL e SOF+BSA+10% de MC-MA. Sete rotinas foram realizadas sendo que em duas delas não houve suplementação de meio; em três delas houve suplementação de 50% do meio feita em D3 e nas duas rotinas restantes a suplementação foi realizada em D3 e D5. Com o evoluir do desenvolvimento embrionário, observou-se que a clivagem em D3 foi de 63% para o grupo CP, 66% para CN, de 68,5% em média para os grupos com MCs. A produção de blastocisto nas rotinas sem suplementação foi de 24% e 30% respectivamente para os CN e CP, já nos grupos com MC foram de 20% em MO, 17% em TA, 21,5% em AL e 11,5% em MA. A produção de blastocisto nas rotinas com suplementação em D3 foi de 22% e 36% nos CN e CP respectivamente e nos grupos com MC foi de 31% em MO, 23% em TA, 31% em AL e 15% em MA. A produção de blastocisto nas rotinas com suplementação em D3 e D5 foi de 21% e 34% nos CN e CP e nos grupos MC foram de MO 14%, TA 16%, AL 19% e MA 14%. Concluiu-se, com os dados presentes até o momento, que a produção de embriões utilizando MC é possível, atingindo taxas próximas à produção de embrião utilizando SFB quando estes são suplementados em 50% em D3.

**Palavras-chave:** CTMs, cultivo embrionário, suplementação, medula óssea, alantoide.

**Keywords:** MSC, embryo culture, feeding, bone marrow, allantois.



## **Suplementação do meio de maturação *in vitro* com hormônio de crescimento promove melhorias na qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro***

*Supplementation of in vitro maturation medium with growth hormone improves quality of bovine embryos produced in vitro*

**Larissa Alves Berté Barbosa<sup>1</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>3</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>1</sup>, Taiane dos Santos Schmidt<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduando (a) em Ciência Animal, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Pós-doutoranda e Pesquisadora, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PGCA), Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>4</sup>Graduando(a) em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

\*E-mail: lukeiko@gmail.com

O hormônio do crescimento (GH) é secretado pela hipófise e atua no crescimento de tecidos de diversos sistemas, incluindo o reprodutor. Ainda, desempenha função importante no desenvolvimento de folículos ovarianos e amadurecimento oocitário. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes concentrações de GH a serem acrescidas ao meio de maturação que promovam melhorias na qualidade de embriões durante o processo de produção de embriões *in vitro* (PIVE). Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) grau I (n= 3707) foram obtidos por meio de aspiração de ovários provenientes de abatedouro e aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (725 - 753 COCs/grupo) os quais foram submetidos a maturação *in vitro* em meio base (MB) comum composto por TCM 199 + sais de Earl + 10% de soro fetal bovino (SFB) + LH + FSH + estradiol + amicacina com ou sem suplementação de GH. Dessa forma, os grupos foram divididos em: controle (MB sem adição de GH), GI (MB + 25 ng/mL de GH), GII (MB + 50 ng/mL de GH), GIII (MB + 75 ng/mL de GH) e GIV (MB + 100 ng/mL de GH), sendo o meio base de maturação *in vitro* (MB). Em seguida, estes foram alocados em incubadora de CO<sub>2</sub> à 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 24 horas para maturação *in vitro*. Ato contínuo, a fecundação *in vitro* foi realizada em meio Talp-Stock + BSA, + piruvato + gentamicina + heparina + PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina) por 24 horas em condições semelhantes de temperatura e atmosfera gasosa. Após esse período, as estruturas foram desnudadas e cultivadas durante sete dias em meio SOFaaci + aminoácidos essenciais + tri-citrato de sódio+ myo-inositol + 5% SFB, em incubadora de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, com 5% CO<sub>2</sub> em ar. As taxas de clivagem e produção de embriões foram determinadas no terceiro e sétimo dia de cultivo, respectivamente. Embriões em estágio de blastocisto expandido foram fixados em lâmina e posteriormente corados com kit de coloração Panótico rápido<sup>®</sup> para a contagem total de células embrionárias (trofoblasto e massa celular interna). O estresse oxidativo foi analisado nos meios de maturação, fertilização e cultivo com a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As taxas de clivagem, assim como a produção de embriões não diferiram entre os tratamentos instituídos. Porém, foi constatado aumento significativo (p<0,05) no número de células embrionárias do grupo IV (76,27 ± 5,72) em relação ao grupo controle (55,22±4,19). Ainda, houve maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS) e, conseqüentemente, maior estresse oxidativo nos grupos III (8,77±0,59 TBARS/mL) e IV (8,31±0,38 TBARS/mL) comparativamente ao grupo controle (4,84 ± 0,70 TBARS/mL, p<0,05)). Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que apesar do maior estresse oxidativo, a utilização de 100ng/mL de GH ao meio de maturação promove melhorias na qualidade embrionária em embriões produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, PIVE, somatotrofina.

**Keywords:** oxidative stress, IVP, somatotrophin.



## **Suplementação proteica em sistema *creep-feeding* no período de cria não influencia as características seminais e desenvolvimento testicular em tourinhos da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*)**

*Protein supplementation in the creep-feeding system did not influence the seminal characteristics and testicular development of Tabapuã (*Bos taurus indicus*) young bulls*

**Lais Reis Carvalho<sup>1\*</sup>, Lucas Oliveira e Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Castro Santos<sup>2</sup>, Guilherme Madureira<sup>3</sup>, Marco Túlio Resende dos Reis<sup>4</sup>, Amanda Botelho Alvarenga<sup>5</sup>, Paulo Henrique Alves Marinho<sup>1</sup>, João Bosco Barreto Filho<sup>6,\*</sup>**

<sup>1</sup>Graduandos em Medicina Veterinária, UFLA, Lavras, MG, Brasil; <sup>2</sup>Doutoranda em Ciências Veterinárias, UFLA, Lavras, MG, Brasil; <sup>3</sup>Mestrando em Ciência Animal e Pastagens, ESALQ, USP, Piracicaba, SP, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário, Fazenda Vargem Grande, Itutinga, MG, Brasil; <sup>5</sup>Mestranda em Ciência Animal e Pastagens, ESALQ, USP, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>6</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

\*E-mail: laisrcarvalho@outlook.com; barreto@dmv.ufla.br

Esse trabalho teve como objetivo avaliar as características seminais e circunferência escrotal no estabelecimento da puberdade em tourinhos da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) submetidos a diferentes manejos nutricionais no período de cria. Foram utilizados nove machos com idade média de  $17 \pm 0,8$  meses. Durante o período de cria os animais foram divididos conforme o manejo nutricional utilizado em dois grupos: Grupo controle (GC) com cinco animais e grupo *Creep-feeding* (GCf) com quatro animais. A partir do nascimento todos os animais permaneceram a pasto (*Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*) com água *ad libitum* e a desmama ocorreu com 220 dias de idade. O GCf foi suplementado com dieta concentrada, composta por 20% de proteína bruta, sendo fornecidos 7,0g de ração por kg de peso vivo, a partir dos 45 dias até a desmama. Após desmamados, os grupos permaneceram a pasto (*B. brizantha* cv. *Marandu*) com água *ad libitum* e suplementação com dieta concentrada, composta por 20% de proteína bruta, sendo fornecidos 4,0g de ração por kg de peso vivo. As características seminais avaliadas foram o volume do ejaculado, motilidade espermática e percentual de células normais e anormais, esta última dividida em defeitos maiores e menores. Após a mensuração da circunferência escrotal foi realizada a coleta de sêmen pela técnica da eletroejaculação (Eletro-Ejaculador Portátil Boijektor). Imediatamente após a coleta foram avaliados volume e motilidade espermática, por microscopia de luz (Microscópio Olympus CX21) em aumentos de 200 e 400 X, e o restante das amostras foram conservadas em solução formol salina e levadas para o laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal - UFLA para avaliação das patologias espermáticas através da captação de imagens por microscópio de contraste de fase (Olympus BX41) com filtro verde (Olympus IF550), acoplado em câmara CCD (Charge Coupled Detector - SDC-415, Samsung) conectada a um microcomputador. As análises estatísticas foram feitas pelo *software* SAS (PROC MIXED e PROC GLIMMIX) com 5% de significância. A circunferência escrotal média foi  $32,7 \pm 2,93$  cm e  $31,0 \pm 2,80$  cm no GC e GCf, respectivamente ( $p=0,40$ ). O volume médio coletado foi de  $6,9 \pm 5,07$  mL e  $4,0 \pm 2,48$  mL no GC e GCf, respectivamente ( $p=0,33$ ). A motilidade espermática média foi de  $61,00 \pm 0,02\%$  e  $52,50 \pm 0,1\%$  para o GC e GCf, nesta ordem ( $p=0,06$ ). A porcentagem média de células normais avaliadas de foi  $57,50 \pm 0,31\%$  e  $66,00 \pm 0,16\%$  para cada um dos grupos ( $p=0,72$ ). Os defeitos observados foram divididos em defeitos maiores com porcentagem média de  $33,90 \pm 0,29\%$  e  $25,50 \pm 0,18\%$  para GC e GCf, ( $p=0,78$ ); e defeitos menores com porcentagem média de  $8,40 \pm 0,06\%$  e  $8,90 \pm 0,07\%$  para GC e GCf, respectivamente ( $p=0,99$ ). A suplementação proteica no sistema de *creep feeding* não influenciou as características seminais e circunferência escrotal no período de estabelecimento da puberdade em tourinhos da raça Tabapuã dentro das condições estabelecidas neste trabalho.

**Palavras-chave:** desenvolvimento sexual, tourinhos, *creep feeding*.

**Keywords:** *sexual development, young bulls, creep feeding.*



## Taxa de gestação e custo da prenhez em novilhas de corte após utilização de protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

*Pregnancy rate and cost of pregnancy in beef heifers after the use of protocols of fixed time Artificial Insemination*

**Ana Carolina Almeida da Fonseca<sup>1,\*</sup>, Silas Cordeiro Herdy<sup>1</sup>, Gisele Caldas Bonato<sup>1</sup>, Viviane Lopes Brair<sup>1</sup>, Rodrigo Oliveira Cunha<sup>1</sup>, Eduardo da Silva Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Luiza Carneiro Moreti Valente<sup>2</sup>, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Grande Rio, UNIGRANRIO, Duque de Caxias, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, Brasil.

\*E-mail: ana.fonseca@unigranrio.br

As biotecnologias da reprodução podem ser aplicadas para aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva dos animais, além de preservar os recursos genéticos. A Inseminação Artificial (IA) e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) são técnicas bastante difundidas e aplicadas em rebanhos comerciais bovinos. Porém, é importante atentar-se às taxas de gestação obtidas em cada protocolo, considerando também o seu custo. Este estudo teve como objetivo testar protocolos de sincronização de estro associados à IATF, avaliando o custo de cada um e, conseqüentemente, da prenhez em cada tratamento em novilhas de corte. Foram utilizadas 39 novilhas da raça Nelore, com idade de 24 a 36 meses e escore da condição corporal variando entre 2 e 3 (escala de 1 a 5). As novilhas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos e receberam distintos protocolos de sincronização previamente à IATF. Em D1, todas as novilhas receberam 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE; Sincrodol<sup>®</sup>, Ourofino, São Paulo, Brasil) e um dispositivo intravaginal contendo 1 g de progesterona (Dispositivo Intravaginal de Bovinos – DIB<sup>®</sup>, Progesterona, Tecnopec, São Paulo, Brasil) por oito dias, além de em D8, 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, São Paulo, Brasil). No Grupo Controle (n=12; normalmente utilizado na propriedade), em D9, foi administrado 1 mg de BE. O grupo BE+eCG (n=10), recebeu em D9, 1 mg de BE e 250 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Norvomom<sup>®</sup>, Pfizer, São Paulo, Brasil). Nos outros dois protocolos, foi administrado 1 mg de cipionato de estradiol (CE, ECP<sup>®</sup>, Pfizer, São Paulo, Brasil) em D8, ao invés de BE no D9, associado ao eCG (ECP+eCG, n=7) ou não (ECP, n=10). No D10, foi realizada a IATF em todas as novilhas. As novilhas foram mantidas nas mesmas condições de pasto e após 53 dias foi realizado o diagnóstico da gestação por palpação retal. As taxas de gestação foram comparadas pelo teste Q de Cochran. As fêmeas que receberam ECP+eCG apresentaram as maiores taxas de gestação (71,4%; P=0,09), em relação aos demais tratamentos: 25,0% (Controle); 30,0% (ECP) e 20,0% (BE+eCG). O custo do protocolo hormonal por novilha considerando apenas os gastos com os hormônios foi de R\$ 16,52 (Controle), R\$ 16,41 (ECP), R\$ 24,52 (BE+eCG) e R\$ 24,41 (ECP+eCG). A alta taxa de gestação obtida na associação de ECP com eCG, resultou no custo mais baixo por prenhez, levando em consideração apenas os gastos hormonais: R\$ 34,20 (ECP+eCG), R\$ 66,10 (Controle), R\$ 54,70 (ECP), R\$ 122,60 (BE+eCG). Na prática, o custo da prenhez foi aproximadamente reduzido à metade no ECP+BE, em relação ao controle. Além disso, ressalta-se que as novilhas foram manejadas um dia a menos neste protocolo, já que não houve manipulação em D9, estressando menos os animais e reduzindo a mão-de-obra. Conclui-se que o protocolo indicado é o ECP+eCG, que promoveu maior taxa de gestação, com menor custo por prenhez, além de reduzir em um dia o manejo dos animais.

**Palavras-chave:** Biotecnologia da Reprodução, Desempenho bioeconômico, Gado de corte.

**Keywords:** *Beef cattle, Bioeconomics performance, Reproductive Biotechnology.*

**Apoio financeiro:** Fazenda Afetiva, Silva Jardim-RJ, CAPES, UNIGRANRIO.



## **Técnica de Cromatografia de gel filtração do plasma seminal de bovinos jovens da raça Nelore**

*Gel Filtration Chromatography Technique on Seminal Plasma in young Nelore bulls*

**Lorena Francys Santos<sup>1</sup>, Guilherme Cunha Oliveira<sup>1</sup>, Antonieta Lourenia Gomes<sup>2</sup>, João Paulo Silveira<sup>1</sup>, Jamil Silvano Oliveira<sup>3</sup>, André Belico Vasconcelos<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba MG, Brazil; <sup>2</sup>Institute of Advanced Studies in Veterinary, UNIUBE/FAZU/ABCZ; <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Immunology, ICB, UFMG, MG, Brazil.

\*E-mail: andre.vasconcelos@uniube.br

O fluido seminal é o componente líquido do esperma que proporciona um ambiente seguro para os espermatozoides. Os constituintes de plasma seminal são importantes para o processo reprodutivo. O estudo dos componentes do plasma seminal bovino, especialmente de proteínas, aparece como uma maneira para entender o mecanismo de fertilidade, bem como de descoberta de biomarcadores. O objetivo do trabalho foi estudar o perfil cromatográfico de proteínas do plasma seminal de tourinhos jovens da raça nelore e relaciona-los com as características clínicas das glândulas acessórias. Antes das coletas, as glândulas vesiculares e ampolas do ducto deferente foram avaliados por palpação verificando características de volume e consistência. Foi coletado um ejaculado de cada nove tourinhos (14 – 18 meses), pelo método de eletroestimulação. Para obter as proteínas do plasma seminal, o sêmen foi centrifugado (600 x g) por 10 min a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e a solução foi fracionada com sulfato de amônio saturado de 36% (Peso/Volume), mantido em agitação por 30 min a temperatura de 0°C, posteriormente em repouso por mais 30 min a 0°C. Novamente as amostras foram centrifugadas (600 x g a 4°C por 30 min), o sobrenadante foi dialisado (8000 x) por 24 horas, com membrana de exclusão de 1000 Da, em solução 0,5% de ácido acético (HAc), as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. A amostra liofilizada foi ressuspensa em 500 µL de Cloridrato de trihidroxiaminometano (TRIS-HCl) 25 mM pH 7,4. A concentração de proteína foi espectrofotometricamente avaliada. A alíquota das amostras dos animais em estudo foi cromatografada em sistema FPLC (Cromatografia líquida de baixa pressão) em coluna de exclusão molecular Superose 12. A média da concentração proteica do plasma seminal após o tratamento com sulfato de amônio saturado foi de 3,87 mg/ml. Foi observada uma separação molecular de pesos moleculares significativamente diferentes, o que favoreceu a relação logarítmica entre o peso molecular e o volume de eluição. A coluna de filtração de gel foi calibrada resultando em uma equação  $y = 5,43x + (-2,175)$ . O erro experimental foi inferior a 5% para a maioria das massas moleculares da proteína. O perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal bovino é representado por 15 frações, com seis picos de retenção, distintos, as médias dos tempos de retenção dos picos foram (19.10 / 33.23 / 38.69 / 40.26 / 41.43 / 63.60), e não diferenciaram estatisticamente entre os animais de estudo. Observa-se que a variação do número de tempo de retenção entre as amostras, pode estar relacionada à avaliação das glândulas sexuais, que apresentaram tamanhos distintos, conforme o animal avaliado, com variação de (5x1,5x1 a 3x1,0x0,5). Entretanto é possível verificar uma semelhança, entre os picos de retenção das amostras de proteínas do plasma seminal dos nove animais estudados. Este efeito pode estar relacionado à reposta fisiológica de cada animal, quanto ao seu amadurecimento reprodutivo.

**Palavras-chave:** proteínas, superose 12, glândulas sexuais.

**Keyword:** *proteins, superose 12, sexual glands.*

## Temperaturas do escroto, globo ocular e flanco com termografia infravermelha na estação de monta em touros Nelore (*Bos taurus indicus*)

Temperature of the scrotum, eye and flank with infrared thermography at reproductive season in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*)

**Ellyn Amanda F. Martins, Camila D. Souza, Paulo F. Izique Goiozo, Marcelo George M. Chacur\***

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

\*E-mail: chacur@unoeste.br

No Brasil, o manejo extensivo predomina na pecuária de corte, os touros na estação de monta são submetidos às altas temperaturas do ambiente. O estresse térmico é um dos fatores que afeta a termorregulação testicular. Para que ocorra a espermatogênese satisfatória nos bovinos, os testículos devem permanecer em temperaturas abaixo da temperatura retal. A termografia infravermelha é um exame de imagem não invasivo que mensura a temperatura de áreas do corpo e consequentemente a termorregulação testicular. Objetivou-se mensurar com termografia infravermelha as temperaturas do escroto, globo ocular e flanco em touros Nelore nos meses de estação de monta e suas correlações com a temperatura ambiente. Foram utilizados touros (n=20) da raça Nelore com 24 a 36 meses de idade, realizando-se a cada 30 dias de agosto a janeiro no período matutino termografias infravermelhas (E40-FLIR®, Suécia) e coleta de dados climáticos com globo termômetro (InstruTemp®, ITWTG-2000, Brasil), sendo: temperatura do bulbo úmido (WBGT), temperatura de globo negro (TG), temperatura do ar (TA) e umidade relativa do ar (UR). Nos touros, foram mensuradas temperatura retal (TR), temperatura do globo ocular (TGO), temperatura do flanco esquerdo (TF) e temperatura do escroto (TE). As imagens termográficas foram analisadas pelo *software FLIR Tools®* versão 3.1.13080.1002. Para as análises estatísticas, utilizou-se o *software R* (R Core Team, 2015) para (média  $\pm$  DP) a 5% e coeficiente de correlação de Pearson (r) para temperaturas de áreas do corpo com termografias infravermelhas e fatores climáticos. As médias de temperaturas de áreas do corpo foram comparadas pela análise de variância (ANOVA *one way*) com contraste de Tukey a 5% ( $P < 0.05$ )\*. Os resultados obtidos nos meses de agosto, setembro, outubro, novembro, dezembro e janeiro, respectivamente, foram: WBGT (°C) = 13.56 $\pm$ 1.04, 18.25 $\pm$ 1.06, 18.20 $\pm$ 0.83, 24.49 $\pm$ 0.41, 26.23 $\pm$ 0.72 e 27.62 $\pm$ 1.74; TG(°C) = 17.53 $\pm$ 2.23, 24.93 $\pm$ 2.62, 25.63 $\pm$ 1.51, 31.89 $\pm$ 1.99, 35.09 $\pm$ 1.65 e 31.88 $\pm$ 3.29; TA(°C) = 17.59 $\pm$ 2.18, 24.74 $\pm$ 2.78, 23.97 $\pm$ 1.31, 31.75 $\pm$ 2.01, 33.37 $\pm$ 1.83 e 31.85 $\pm$ 3.41; UR(%) = 51.46 $\pm$ 9.70, 32.65 $\pm$ 7.50, 40.01 $\pm$ 3.02, 40.86 $\pm$ 9.37, 40.04 $\pm$ 7.70 e 55.35 $\pm$ 11.74; TR(°C) = 39.27 $\pm$ 0.71, 39.35 $\pm$ 0.61, 39.60 $\pm$ 0.43, 39.98 $\pm$ 0.75, 39.69 $\pm$ 0.44 e 39.85 $\pm$ 0.39; TGO(°C) = 32.65 $\pm$ 2.36, 33.44 $\pm$ 1.86, 33.79 $\pm$ 0.99, 37.33 $\pm$ 1.06, 36.87 $\pm$ 0.90 e 37.21 $\pm$ 1.52; TF(°C) = 31.58 $\pm$ 1.89, 31.64 $\pm$ 1.85, 31.84 $\pm$ 2.62, 35.95 $\pm$ 0.90, 35.90 $\pm$ 0.89 e 36.13 $\pm$ 2.37 e TE(°C) = 29.88 $\pm$ 2.46, 31.21 $\pm$ 2.05, 31.59 $\pm$ 1.31, 33.76 $\pm$ 0.95, 32.75 $\pm$ 1.72 e 34.26 $\pm$ 1.35. Houve correlações significativas entre: TR x TA (r=0.28\*); TGO x TA (r=0.74\*); TF x TA (r=0.72\*); TE x TA (r=0.57\*). Conclui-se que a temperatura ambiente influencia de forma significativa e positiva as temperaturas do flanco, do globo ocular e do escroto dos touros. A temperatura do escroto foi de 5 a 9°C inferior a temperatura retal. A termografia infravermelha foi útil na mensuração de temperaturas de áreas do corpo em touros.

**Palavras-chave:** touro zebu, termorregulação testicular, fatores climáticos, estresse calórico.

**Keywords:** zebu bull, testicular thermoregulation, climatic factors, heat stress.



## **Termografia por infravermelho do cordão espermático, escroto e globo ocular em touros Nelore na primavera e verão**

*Infrared thermography of the spermatic cord, scrotum and eyes in Nelore bulls in the spring and summer*

**Camila Dutra de Souza<sup>1\*</sup>, Ellyn Amanda Fonseca Martins<sup>1</sup>, Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak<sup>3</sup>, Isamara Batata Andrade<sup>3</sup>, Talita Raquel Cavichioli Sebastião<sup>4</sup>, Gabriela Figueredo Cornacini<sup>4</sup>, William Mituzi Tateisi<sup>4</sup>, Rodrigo Gomes Ricci<sup>4</sup>, Marcelo George Mungai Chacur<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia e Saúde Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>2</sup>Professor Doutor da UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>3</sup>Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil; <sup>4</sup>Graduandos de Medicina Veterinária, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

\*E-mail: camiladutrasouza@hotmail.com

Objetivou-se com o presente estudo, mensurar as temperaturas do cordão espermático, escroto e globo ocular com termografia por infravermelho em touros Nelore na primavera e verão. Foram utilizados 20 touros da raça Nelore, com idade média de 24 meses, criados em manejo extensivo em pasto de *Brachiaria decumbens* com mistura mineral e água à vontade. As imagens termográficas (E40-FLIR®, Suécia) foram obtidas na primavera e verão, repetidas duas vezes por estação com intervalo de 30 dias, totalizando 80 exames termográficos de cada região examinada (cordão espermático, escroto e globo ocular), logo após foi mensurada a temperatura retal de cada touro e coletados os dados dos fatores climáticos: temperatura ambiente, temperatura do globo (radiação solar) e umidade do ar. Foram consideradas as temperaturas: média do globo ocular; média do cordão espermático; média do escroto; média do pólo proximal do pólo distal do escroto. O gradiente térmico foi calculado pela diferença entre as temperaturas do cordão espermático e do pólo distal do escroto e o gradiente de temperatura retal-escrotal calculado pela diferença entre a temperatura retal e o pólo distal do escroto. A análise estatística foi realizada a análise de variância com posterior comparação das variáveis entre a primavera e o verão com o teste de Tukey a 5%. A temperatura ambiente foi maior ( $P<0.05$ ) na primeira coleta do verão ( $32,7\pm 1,6^{\circ}\text{C}$ ) quando comparadas às outras coletas. Igualmente ocorreu com a radiação solar, que foi maior ( $P<0.05$ ) na primeira coleta do verão ( $33,8\pm 2,6^{\circ}\text{C}$ ) quando comparadas às outras coletas. Quanto à umidade relativa do ar, a primeira coleta da primavera apresentou média de  $68,3\pm 8,7\%$  que diferiu ( $P<0.05$ ) da segunda coleta do verão com  $50,0\pm 2,7\%$ . Para temperatura retal não houve diferença estatística ( $P<0.05$ ) entre as coletas na primavera e verão. Para a temperatura do globo ocular houve diferença ( $P<0.05$ ) para a primeira coleta do verão ( $37,1\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ ) quanto comparada à primeira coleta da primavera ( $35,7\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ) e a segunda coleta do verão ( $35,7\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ).

O mesmo ocorreu para a temperatura do cordão espermático que houve diferença ( $P<0.05$ ) para a primeira coleta do verão ( $37,0\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ) quanto comparada à primeira da primavera ( $35,3\pm 1,8^{\circ}\text{C}$ ) e a segunda do verão ( $35,6\pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ). Para a temperatura do escroto houve diferença ( $P<0.05$ ) para a primeira coleta do verão ( $34,9\pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ) quanto comparada à primeira da primavera ( $33,9\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ) e a segunda do verão ( $33,7\pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ). O gradiente térmico da primeira coleta da primavera foi  $2,2^{\circ}\text{C}$  e na segunda foi  $2,5^{\circ}\text{C}$ ; no verão, a primeira foi  $2,7^{\circ}\text{C}$  e na segunda foi  $2,8^{\circ}\text{C}$ . E o gradiente retal-escrotal da primeira coleta da primavera foi  $6,7^{\circ}\text{C}$  e na segunda foi  $6,0^{\circ}\text{C}$ ; no verão, primeira foi  $5,6^{\circ}\text{C}$  e na segunda foi  $6,8^{\circ}\text{C}$ . Na primeira coleta do verão em que houve maior temperatura ambiente, se verificou maiores temperaturas de globo ocular e do escroto; e obteve-se também o menor gradiente retal-escrotal. Dessa forma, se conclui que a câmera de termografia por infravermelho foi eficiente na mensuração das temperaturas do cordão espermático, escroto e globo ocular. Na estação do verão, a maior temperatura ambiente influenciou na presença de maiores temperaturas do escroto, quando comparadas à estação da primavera.

**Palavras-chave:** machos, bovinos, termorregulação testicular, estações do ano.

**Keywords:** male, bovine, testicular thermoregulation, seasons.



## **The effect of B-27 supplementation on the in vitro culture of parthenogenic bovine embryos**

*O efeito da suplementação com B-27 no cultivo in vitro de embriões partenogênicos bovinos*

**Lina Castelo Branco Motta<sup>1,\*</sup>, Carla Fabiana Gomes de Jesus<sup>2</sup>, Dárcio Ítalo Alves Teixeira<sup>3</sup>, Luciana Magalhães Melo<sup>3</sup>, Maajid Hassan Bhat<sup>4</sup>, Vicente José de Figueiredo Freitas<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Estudante de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; <sup>2</sup>Mestrando em Ciências Animal, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, Brazil; <sup>3</sup>Professor de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; <sup>4</sup>Pós-Doutorando em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

\*E-mail: linacastelobmotta@gmail.com

In the parthenogenic embryo production several aspects must be taken into account, especially with regard to the supplementation of the culture medium. The B-27 supplement is commonly used to prevent the death of cells in cell differentiation protocols, which is a desirable effect in the in vitro embryo production. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether the addition of the B27 supplement (GIBCO, 17504044) in the culture medium is capable of improving parthenogenic embryo rates. For this, cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered from the puncture of bovine ovarian follicles from local slaughterhouse. Later they were evaluated for morphology and placed for in vitro maturation (IVM) in supplemented TCM-199 medium and added 10% fetal bovine serum (FBS) under oil and placed in incubator (Thermo 3110, Thermo Fisher Sci., Marietta, USA) with 5% CO<sub>2</sub> in air, at 38.5°C for 26 hours. After IVM, the COCs were denuded in TCM-199 containing hyaluronidase for three minutes in the vortex. A total 310 oocytes were chemically activated using 5 µM ionomycin, for 5 minutes, and 2 mM 6-DMAP, for 6 hours. Posteriorly, presumptive embryos were randomly divided into two groups: group I (GI), which received 2% B-27 (n = 237) on day 3 of the culture and group II (GII) without addition of B-27. The in vitro culture (IVC) was performed for nine days in synthetic oviduct fluid (SOF) medium with 5% FBS under oil and humidified atmosphere similar to IVM. The embryonic rates were evaluated on days three, seven and nine to verify cleavage, blastocyst and hatched blastocyst rates. The percentage were compared using Fisher's exact test considering significant when P < 0.05. The cleavage rates were 92.8% (220/237) and 90.4% (66/73) for GI and GII embryos, respectively (P > 0.05). The blastocyst rate in the GI group was 28.7% (68/237) while the GII group was 21.9% (16/73), (P > 0.05). Only the GI group showed blastocysts hatched 5.1% (12/237). Although there is no significant difference between groups, it was visually noticeable the improvement of the morphology, therefore this supplement may be a new alternative for the improvement of IVC of parthenogenic bovine embryos.

**Keywords:** IVC, parthenogenesis, blastocysts.

**Palavras-chave:** CIV, partenogênese, blastocistos.



## **Transporte de oócitos bovinos com ou sem controle automático da atmosfera**

*Bovine oocytes transport with or without automatic control of the atmosphere*

**João Paulo de Andrade Guimarães<sup>1\*</sup>, Jéssica Ruiz Pereira<sup>2</sup>, Ana Cristina Silva de Figueiredo<sup>3</sup>,  
Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>4</sup>, José Antônio Dias Garcia<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Mestrando Reprodução Sanidade e Bem estar Animal, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil; <sup>2</sup>Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da Unifenas, Alfenas, MG, Brasil, bolsista PIBIC; <sup>3</sup>Doutoranda Reprodução Sanidade e Bem estar Animal, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil, <sup>4</sup>Professores do Programa de Pós Graduação em Reprodução Sanidade e Bem estar Animal, Unifenas, Alfenas, MG, Brasil.

\*E-mail: jpguimaraes22@hotmail.com

A produção de embriões pela técnica de fertilização *in vitro* cresceu bastante no Brasil nos últimos 10 anos. Segundo as estatísticas do IETS (International Embryo Transfer Society) o Brasil é líder mundial na aplicação desta tecnologia desde 2004. Neste estudo objetivou-se avaliar, em dois estudos, o efeito de dois meios e de transportadoras sobre a viabilidade de oócitos (CCOs) em diferentes tempos (1, 8 e 24 h). No exp. 1, os Complexos Cúmulos Oócitos (CCOs - n=648) foram mantidos a 38,5°C por 1 ou 8h em meio TCM-199 com sais de Hanks e HEPES (M1) ou meio de maturação TCM-199 com sais de Earle com bicarbonato e gaseificado (M2). No exp. 2 os CCOs (n=979) foram colocados em M2, gaseificados e mantidos em transportadoras com controle de temperatura e atmosfera (L1) ou apenas com controle de temperatura (L2) por de 1, 8 e 24 h (T1, T2 e T3). A taxa de clivagem foi avaliada no D3 e a produção de blastocistos em D7 e D10. Os experimentos foram organizados em fatorial e analisados pelo procedimento GLM do programa SAS. Médias foram comparadas por Student Newman-Keuls. No exp. 1 não houve efeito ( $P>0,05$ ) de meio sobre a clivagem (69,4±2,7 e 71,4±3,4%), produção de embriões no D7 (33,4±2,7 e 30,7±3,1%) e no D10 (36,1±2,4 e 33,6±3,1%), para M1 e M2, respectivamente. Também não houve efeito do tempo sobre a clivagem (70,3±3,0 e 70,2±3,2%), produção no D7 (29,9±2,7 e 34,3±3,0%) e no D10 (33,0±2,8 e 36,7±2,7%), para 1 e 8h, respectivamente, nem interação entre eles ( $P>0,05$ ). No exp. 2 não houve efeito ( $P>0,05$ ) de transportadora sobre a clivagem (68,3±3,1 e 71,7±2,5%), produção no D7 (26,9±2,6 e 29,4±2,4%) e no D10 (31,1±2,5 e 31,0±2,5%), para L1 e L2, respectivamente. De modo, similar não houve efeito de tempo com relação à clivagem (74,1±3,4, 67,2±3,3 e 68,7±3,7%), blastocistos no D7 (26,8±2,9, 31,4±3,0 e 26,2±3,4%) ou no D10 (29,6±3,1, 35,2±2,6 e 28,2±3,4%), para 1, 8 e 24h, respectivamente, assim como nas interações ( $P>0,05$ ). Conclui-se que COCs bovinos podem ser transportados em meio TCM-199 com sais de Hanks ou Earle por períodos de até 8 horas. O transporte em meio de maturação pode ser feito sem controle atmosférico automático por todo o período de maturação sem influenciar o desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** Embriões, Fertilização *in vitro*, maturação, transporte de oócitos.

**Keywords:** *Embryos, in vitro fertilization, maturation, oocytes transport.*

**Agradecimentos:** CNPq, Capes e Fapemig.



## Uso de pentoxifilina na capacitação espermática de sêmen bovino pós-descongelamento

*Use of pentoxifyline on sperm capacitation of post-thawed bovine sperm*

**Tathiana Ferguson Motheo<sup>1</sup>, Fabiana Mariani Wingert<sup>2</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>3,\*</sup>,  
Marlon Eduardo dos Santos Rodrigues<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Pós-doutoranda e Pesquisadora, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>Mestre em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Professora do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

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

Na criopreservação espermática há maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais podem causar danos à membrana plasmática do espermatozoide e decréscimo em sua motilidade. A pentoxifilina (PTX) apresenta efeito benéfico já conhecido sobre a motilidade e características de movimento espermático. Logo o objetivo deste estudo foi avaliar se diferentes concentrações (10 e 20 mM) de pentoxifilina melhoram a qualidade espermática do sêmen bovino após o processo de criopreservação. Foi utilizado sêmen de quatro touros já testados para produção *in vitro* de embriões. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e 10 µL do sêmen foram utilizados para análise de motilidade e vigor espermáticos em lâmina e lamínula sob microscopia óptica de luz em aumento de 400x. Após as análises imediatas de motilidade e vigor, o sêmen foi colocado em gradientes descontínuos de Percoll (45% e 90%) por 7 minutos a 575 x g. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e o pellet foi resuspendido em 1 mL de meio comercial de fecundação *in vitro* (FIV - TL Sperm: Tyrode + albumina + lactato + BSA + piruvato + antibióticos + PHE + heparina) e centrifugado novamente por cinco minutos. Posteriormente à centrifugação foi retirado 240 µL de pellet, o qual foi homogenizado ao mesmo volume de meio FIV. O volume final foi dividido em 3 tratamentos: controle (sem adição de pentoxifilina), T10 (adição de 10 mM de pentoxifilina) e T20 (adição de 20 mM de pentoxifilina). Ato contínuo, os grupos foram incubados por 10min em incubadora de CO<sub>2</sub> a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Aliquotas de sêmen de cada grupo foram submetidas à análise de motilidade, vigor, atividade mitocondrial (DAB) e capacitação espermática (Coloração tripla de espermatozoide - Tripán). O experimento foi realizado em blocos inteiramente casualizados sendo as médias analisadas com nível de significância de 5%. Foi constatado decréscimo na motilidade espermática dos grupos T10 (20,18±2,86) e T20 (14,63±2,21) comparativamente ao grupo controle (29,5±2,9) (p<0,0001). Ademais, os grupos tratados com PTX também apresentaram diminuição dos valores de vigor espermático (T10: 1,87±0,12 e T20: 1,59±0,12) em relação ao controle (2,25± 0,12) (p=0,0002). A atividade citotóxica mitocondrial espermática não foi influenciada pela adição de pentoxifilina pós-capacitação espermática (p>0,05). Contudo, à avaliação da reação acrossômica observou-se redução na porcentagem de células vivas com acrossoma reagido (Tripán II) do T20 (22%) em comparação ao controle (15,93%) (p = 0,0192) e aumento na porcentagem de células mortas com acrossoma reagido ( Tripán IV) do grupo T20 (49,97%) em relação aos demais grupos (C: 38,68% e T10: 43,47%) (p=0,0004). Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a adição de 10 e 20mM de pentoxifilina pós capacitação em gradiente descontínuo de Percoll não promove melhorias na qualidade espermática do sêmen bovino pós-descongelamento.

**Palavras-chave:** biotecnologia, criopreservação, embrião, fertilidade.

**Keywords:** *biotechnology, cryopreservation, embryo, fertility.*

## Uso de pentoxifilina no sêmen descongelado de bovino Pantaneiro após capacitação em gradiente de Percoll

*Use of pentoxifiline on post-thawed semen of Pantaneiro breed bovine after sperm capacitation in Percoll-gradient*

Everton Santos Silva<sup>1</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2,\*</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>3</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>4</sup>, Moacir Ferreira Duarte Junior<sup>4</sup>, Luis Eduardo Senra e Silva<sup>4</sup>, Isadora Naiara Bianchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduandos do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil;

<sup>2</sup>Docente do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Pós-doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>4</sup>Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil.

\*E-mail: lukeiko@gmail.com

Os bovinos Pantaneiros são animais extremamente adaptados às condições sanitárias, de clima e manejo. Atualmente, são considerados como uma espécie ameaçada de extinção e diante disso, o uso de biotecnologias da reprodução, como a criopreservação de sêmen, devem ser estudadas e aprimoradas para uso nesta raça. A pentoxifilina acrescida ao diluidor promove melhoria da qualidade espermática pós-descongelamento. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides de bovinos da raça Pantaneira pós-descongelamento e capacitação em gradiente de Percoll. Foram utilizadas palhetas de sêmen congelado de quatro touros da raça Pantaneira. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e em seguida, foi retirada uma alíquota do sêmen para avaliação quanto à motilidade (MOT), vigor (VIG), integridade de membrana plasmática (eosina/nigrosina-EN), acrossomal (POPE) e atividade mitocondrial (DAB). Após as análises imediatas, o sêmen foi submetido a gradientes descontínuos de percoll (45 e 90%) por 25 minutos a 2500 giros por minuto (gpm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi re-suspendido em 700 µL de meio de fecundação *in vitro* (FIV). Este foi novamente centrifugado por cinco minutos a 700gpm. Ato contínuo, o pellet foi retirado e re-suspendido em 300 µL de meio FIV. Após a homogeneização, a amostra foi igualmente dividida e submetida a três tratamentos: Controle (0 mM), T5 (adição de 5 mM de pentoxifilina) e T10 (adição de 10 mM de pentoxifilina). Cada tratamento foi colocado em incubadora de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, com 5% CO<sub>2</sub>, por 10 minutos. Em seguida, amostras, foram reavaliadas quanto a motilidade, vigor, integridade de membranas plasmática e acrossomal e atividade citoquímica mitocondrial. Este experimento foi inteiramente casualizado e o efeito do tratamento foi avaliado através da análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%. A adição de 5mM e 10mM de pentoxifilina no sêmen de bovinos pantaneiros após a passagem por gradiente de percoll não alterou ( $P > 0,05$ ) a motilidade e vigor espermáticos, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e atividade citoquímica mitocondrial. Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que a adição de pentoxifilina nas concentrações de 5 e 10 mM não influenciou a viabilidade *in vitro* em sêmen criopreservado de bovinos Pantaneiros após capacitação por gradiente de Percoll.

**Palavra-chave:** criopreservação, espermatozoides, motilidade.

**Keywords:** *criopreservation, spermatozoa, motility.*



## Uso de progesterona injetável na transferência de embrião em vacas primíparas sobre a taxa de concepção

*Use of injectable progesterone in embryo transfer in primiparous cows on conception rate*

**Bruno Silva do Espirito Santo<sup>1\*</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2</sup>, Moacir Ferreira Duarte Júnior<sup>3</sup>, Danilo Francisco Campos Pereira<sup>4</sup>, Vinicius Borges Garcia<sup>5</sup>, Luis Eduardo Senra e Silva<sup>3</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>3</sup>, Everton Santos Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>Docente do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Doutorando em Ciência Animal Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>4</sup>Pró-Embryo Consultoria em Reprodução Animal, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>5</sup>Médico Veterinário, Fazenda Ressaca, Cáceres, MT, Brasil.

\*E-mail: brunosilvamedvet@gmail.com

A progesterona (P<sub>4</sub>) secretada pelo corpo lúteo é essencial na sobrevivência embrionária e na manutenção da gestação. O baixo escore corporal está associado ao atraso na retomada da ciclicidade ovariana no pós-parto, em vacas primíparas isso fica ainda mais evidente uma vez que além das exigências de manutenção e lactação esta categoria necessita atender a demanda de energia para crescimento e só então desviar fontes energéticas para a atividade ovariana. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de uma fonte exógena de P<sub>4</sub> injetável de longa ação, no dia da transferência de embrião, sobre a taxa de concepção em vacas primíparas. Foram utilizadas 94 vacas mestiças provenientes de uma mesma propriedade e mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, com suplemento mineral e água “ad libitum”. O protocolo utilizado para sincronização das receptoras foi: dia zero (D0) - dispositivo intravaginal de liberação lenta de P<sub>4</sub> contendo 1,9 g (CIDR<sup>®</sup>) por 8 dias + 2,0 mg de benzoato de estradiol, por via intramuscular (IM). Oito dias após (D8) foi retirado esse dispositivo e realizada aplicação de 0,15 mg via IM de D-Cloprostenol (Croniben<sup>®</sup>) + 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon<sup>®</sup>) + 1mg de cipionato de estradiol (E.C.P.<sup>®</sup>). Nove dias após a remoção do CIDR.<sup>®</sup> (D17) foi realizada a transferência de embriões produzidos *in vitro* e neste momento as receptoras foram divididas em dois grupos: controle (C) e grupo progesterona (GP<sub>4</sub>). No controle (n=49 animais) foi administrado 1 mL de solução fisiológica via IM, já no GP<sub>4</sub> (n=45 animais) foi aplicado 1 mL de P<sub>4</sub> (Sincrogest injetável). O diagnóstico de gestação foi feito através de ultrassonografia transretal 50 dias após a data da transferência. As taxas de concepção calculadas em porcentagem e avaliadas pelo programa estatístico SAS PROC Glimmix. A média de escore corporal dos animais dos grupos controle e tratamento foram de 2,6 e 2,5 (escala 1 a 5). De acordo com os resultados obtidos, a administração de P<sub>4</sub> injetável no D17 e a condição de escore corporal não influenciaram (P>0,05) no aumento na taxa de concepção, entre os grupos controle (40,82%, 20/49) e tratamento (46,7%, 21/45). Autores relatam que a P<sub>4</sub> promove aumento no desenvolvimento do embrião com 3 a 7 dias, portanto neste período, elevadas concentrações plasmáticas de P<sub>4</sub> aumentam o tamanho do embrião. No presente estudo, o embrião foi implantado com 7 dias e dessa forma a progesterona pode não ter tido o efeito esperado. A P<sub>4</sub> foi usada na tentativa de suprir uma possível deficiência desse hormônio em animais com baixo escore corporal, que por sua vez, poderia resultar em perdas embrionárias, contudo como o ECC das vacas era mediano, possivelmente essa deficiência não foi relevante o bastante para que a suplementação fizesse efeito. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização de progesterona exógena de longa duração, no dia da transferência de embrião, não aumenta a taxa de concepção em vacas primíparas e com escore corporal mediano.

**Palavras-chave:** embrião, corpo lúteo, ovário, ciclo estral, bovino.

**Keywords:** *embryo, corpus luteum, ovary, estral cycle, bovine.*



## **Vascularization parameters evaluated by Doppler are independent of environmental, rectal and testicular temperatures**

*Os parâmetros de vascularização avaliados pelo Doppler são independentes das temperaturas ambiental, retal e testicular*

**Leonardo Batissaco, Vitor Hugo Guilger Gonzaga, Vinícius José Moreira Nogueira, Maíra Bianchi Rodrigues Alves, Flávia dos Santos Almeida, Laura Nataly Garcia Oliveros, Laís Maria Gomes, Eneiva Carla Carvalho Celeghini\***

Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

\*E-mail: celeghin@usp.br

High environmental temperatures may compromise the body and testicular thermoregulation of animals, altering not just the physiological parameters, also damaging the sperm quality. For this, other diagnostic tools are required for the diagnosis of testicular disorders caused by the increased temperature, such as infrared thermography, and the color Doppler ultrasonography. However, it is still necessary to establish parameters for evaluation of testicles, as well as the impact of external factors such as the temperature on the data obtained. This study had the objective to observe if ultrasonographic parameters were dependent on the environmental, body and testicular temperatures. For this, ten Nelore bulls aged  $34 \pm 1.16$  months, with 34,1cm of average scrotal circumference. The environmental temperature (ET) was measured by Data Logger (OPUS 20 THI - 8120.00, Lufft, Germane) in each thermographic evaluation. The scrotal surface mean temperature (SSMT; °C) and eye area mean temperature (EAMT; °C) were measured using an infrared thermography camera, T620 model (FLIR Systems, USA) and captured from a distance of 0.9 m between the camera and the scrotum. The images were evaluated using the FLIR Quick Report® program (FLIR Systems, USA). It was also evaluated: the rectal temperature (RT, °C) by a digital thermometer; heart rate (HR; bpm); and respiratory rate (RR; breaths/min) using a stethoscope. Furthermore were analyzed: The vascularization of pampiniform plexus (VPP) through a score of one to five, being one less vascularized and 5 more vascularized; vascularization of the testicular parenchyma (VTP) by a score of zero to four, with zero having no visible vascularization in the image and 5 with several large vessels in the image; and finally the blood flow of the pampiniform plexus through the resistance index (RI). Each analyses were performed in the right (VRPP, VRTP, RRI) and left (VLPP, VLTP, LRI) testicles. Data were submitted to analysis of variance using the MIXED procedure of Statistical Analysis System (SAS, 2004), by Pearson correlation analyses. Significance difference was considered when  $p \leq 0.05$ . Testicular vascularization (right and left VPP and VTP) showed no correlation with temperature and clinical evaluations (ET, RT, RR, HR, SSMT, EAMT), indicating that those parameters do not affect the testicular hemodynamics and ultrasound evaluation of the testes. However, blood flow (RI) presented statistical difference with one of the clinical evaluations (HR), showing a negative correlation: RRI vs HR ( $-0.60 \pm 0.005$ ); LRI vs HR ( $-0.51 \pm 0.02$ ). Deducing that, even if the environmental temperature does not influence the ultrasonographic evaluation of the testes, the vessels resistance index may change according to the amount of blood pumped per minute. Similarly, RI values of both testes, right and left, did not correlate with temperature and other clinical evaluations (ET, RT, RR, SSMT, EAMT). Moreover, there was a positive correlation between the values of VRTP with: VLTP ( $0.66 \pm 0.0001$ ), indicating a normality between both testicular parenchymas; and VRPP ( $0.64 \pm 0.0001$ ), showing the normality in blood flow between the plexus and parenchyma. It was also observed a positive correlation between VRPP and VLPP ( $0.68 \pm 0.0009$ ) representing the similarity in blood flow between both plexus. Correspondingly, the value of RRI showed a positive correlation with LRI ( $0.59 \pm 0.005$ ), following the same arrangement. In contrast, VRPP had a negative correlation with the RRI ( $-0.51 \pm 0.02$ ). Thus, we can conclude that testicular Doppler ultrasound is independent of temperature changes and clinical evaluations.

**Keywords:** *testicular hemodynamic, cattle, color ultrasound standardization.*



## **Verificação dos parâmetros circulatórios da artéria supra testicular em touros jovens da raça Aberdeen Angus**

*Verification of the circulatory parameters of the testicular supra artery in young bulls of the Aberdeen Angus race*

**Felipe Gabriel Cividini<sup>1</sup>, Carlos Augusto Capelassi Gomes<sup>1</sup>, Pauline Beatriz Guidoni<sup>2</sup>, Barbara Kolecha Costa<sup>2</sup>, Maria Eduarda Alves da Silva<sup>2</sup>, Jeniffer Naryman Hirt<sup>2</sup>, Luis Gustavo Benthien Miquelão<sup>2</sup>, Flávio Antônio Barca Junior<sup>3</sup>, Celso Koetz Junior<sup>4</sup>, Werner Okano<sup>4</sup>, Marcos Barbosa Ferreira<sup>5</sup>, Flávio Guiselli Lopes<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Discentes do Programa de Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes da Unopar, Arapongas, PR, Brasil; <sup>2</sup>Discentes do Curso de Medicina Veterinária da Unopar, Arapongas, PR, Brasil; <sup>3</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária da Unopar;

<sup>4</sup>Docentes do Curso de Medicina Veterinária e do Programa de Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes da Unopar, Arapongas, PR, Brasil; <sup>5</sup>Docente do Programa de Mestrado em Produção e Gestão Agropecuária da Universidade

Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS, Brasil.

\*E-mail: flavio.lopes@kroton.com.br

Diante da importância do macho como reprodutor e difusor de material genético, este deve ser criteriosamente selecionado, principalmente quanto aos seus aspectos reprodutivos e produtivos, assim como os raciais. A inclusão de novas tecnologias permite uma compreensão do processo fisiológico, onde métodos não invasivos podem auxiliar na aquisição de dados confiáveis, sem intervir nos organismos, livrando ações de estresse. O objetivo do presente estudo foi verificar os parâmetros circulatórios de velocidade média (VM), índice de pulsatilidade (PI) e resistência (RI) através do mapeamento ultrassonográfico Doppler colorido, da artéria supra testicular e em touros jovens da raça Aberdeen Angus. O presente estudo foi realizado em propriedade rural no município de Arapongas, região no norte do estado do Paraná, Brasil. Trinta e três touros jovens da raça Aberdeen Angus, com bom estado corporal e idade média de 24,0 meses foram submetidos ao exame de ultrassonografia no modo B para espessura de pele escrotal e modo Doppler colorido para hemodinâmica testicular. Além disso, foi mensurada a temperatura superficial do escroto (TM) por meio da termografia infravermelha, a temperatura retal e os batimentos cardíacos (HT). A velocidade média do fluxo sanguíneo apresentou média de  $13,8 \pm 4,77$  cm/s. O valor médio para o PI foi de  $0,27 \pm 0,15$ . O índice de RI apresentou média de  $0,37 \pm 0,12$ . A média verificada para temperatura retal e temperatura escrotal foi de  $40,13 \pm 0,54$  e  $35,14 \pm 0,71$  °C, respectivamente. A média para HT e a espessura de pele escrotal foi de  $91,03 \pm 11,33$  batimentos por minuto e  $5,8 \pm 1,07$  cm, respectivamente. Com as informações referentes às variáveis estudadas foi possível estabelecer as correlações. Foi observada correlação significativa e positiva entre as variáveis de PI e RI (0,934). Os valores apresentados se referem à resistência que o fluxo sanguíneo recebe da perfusão do sangue no vaso sanguíneo. A correlação entre VM e TM (0,471) foi significativa e positiva, isso se deve provavelmente pelo fato do aumento da velocidade média do fluxo sanguíneo, sucintamente, aumentou a temperatura da bolsa escrotal que estavam sendo irrigados com maior proporção. Da mesma forma, os resultados de correlação entre HT e TM (0,357) também foram consideráveis, por aumentar os batimentos cardíacos, como fator compensatório para ter o maior fluxo sanguíneo, aumentando também a temperatura escrotal. Para as demais variáveis não houve correlação significativa. Os valores apresentados podem contribuir no futuro para detecção de eventuais anormalidades, onde o sistema Doppler pode fornecer informações para o entendimento da termorregulação testicular.

**Palavras-chave:** doppler, fluxo sanguíneo, termografia.

**Keywords:** doppler, blood flow, thermography.

## Viabilidade do transporte de oócitos bovinos em meio de maturação *in vitro* suplementado com análogo da vitamina E (Trolox®)

*Transport viability of bovine oocytes in in vitro maturation media supplemented with vitamin E analogue (Trolox®)*

Ana Laísa Cândida de Resende Fraga<sup>1</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>1\*</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>1</sup>, Cássia Panizzon Dal Curtivo<sup>2</sup>, Thaiza Thommen Maciel<sup>2</sup>, Fabiana Mariani Wingert<sup>1</sup>, Carolina Inês de Oliveira Pereira<sup>1</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>1</sup>, Thiago Bruno Castaldeli Alves de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brasil; <sup>2</sup>MT Embriões, Cuiabá, Brasil.

\*E-mail: lukeiko@gmail.com

Usualmente, o procedimento de *ovum pick up* (OPU) comercial é realizado em locais distantes de laboratórios de produção *in vitro* de embriões (PIVE). A maturação oocitária durante o transporte é uma solução prática que visa sanar problemas de distância, entretanto, um tempo de transporte prolongado pode prejudicar o desenvolvimento oocitário, e conseqüentemente o embrionário, se tornando um fator limitante para a utilização comercial dessa técnica. O uso de antioxidantes durante o transporte de oócitos pode ser uma alternativa para preservar a qualidade dessas estruturas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade do transporte de oócitos com controle da atmosfera gasosa, durante diferentes períodos de tempo, após a adição de análogo da vitamina E (Trolox®) ao meio de transporte. Dessa forma, a simulação do transporte foi realizada em incubadora de CO<sub>2</sub> a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Os complexos *cumulus*-oócitos graus I, II e III (n= 1107) foram obtidos por meio de aspiração de ovários provenientes de abatedouro e aleatoriamente divididos em oito grupos (117 - 145 COCs por grupo), conforme o período de transporte simulado e a adição ou não de Trolox® ao meio. Sendo assim, os grupos foram divididos em: zero (G0), seis (G6), doze (G12) e dezoito (G18) horas de transporte simulado sem antioxidante, e os mesmos períodos (GT0, GT6, GT12, GT18), com a adição de 0,1 mg/mL de Trolox® ao meio de transporte. Os COCs foram acondicionados em tubos criogênicos de 1,5 mL, contendo 500µL de meio de transporte (TCM-199 suplementado com HEPES, glutamina, piruvato, antibiótico, estradiol, LH, FSH e SFB) com ou sem a adição de Trolox®, recobertos por 350µL de óleo mineral, gaseificados com uma mistura de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> balanço e lacrados. Os oócitos dos grupos G0 e GT0 foram colocados abertos na incubadora e maturados por 24 horas. Já os demais grupos foram abertos somente após transcorrido o período de transporte referente a cada grupo, completando o tempo restante da maturação nas mesmas condições dos grupos controle. A fecundação *in vitro* foi realizada em meio Talp-Stock acrescido de BSA, piruvato, gentamicina, heparina e PHE por 18-22 horas em condições semelhantes de temperatura e atmosfera gasosa. Os prováveis zigotos foram cultivados durante sete dias em meio SOFaaci + 5% SFB, em incubadora de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. Foram avaliadas as taxas de clivagem e de produção embrionária, a contagem celular e o estresse oxidativo. Os dados foram analisados por meio do programa SAS®, versão 9.2. Dados paramétricos foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, já dados não paramétricos através do teste de Wilcoxon. Todas as análises utilizaram 5% como nível de significância. As taxas de clivagem foram similares entre todos os grupos, sendo observada diferença apenas entre G0 (87,05%) e G12 (68,30%) (p<0,05). A produção de blastocistos, o número total de células embrionárias e a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no meio de transporte não diferiram entre os grupos estudados. Dessa forma, pode-se afirmar o transporte de oócitos bovinos pode ser realizado em até 18 horas sem que haja prejuízos ao desenvolvimento embrionário. Ainda, a adição de Trolox® ao meio não altera os índices de clivagem e produção de blastocistos.

**Palavras-chave:** produção *in vitro* de embriões, gameta, antioxidante.

**Keywords:** *in vitro* embryo production, gamete, antioxidant.