



Behavioral evaluation of Zebu bulls and device development to identify behavioral failures

Avaliação comportamental de touros Zebuínos e desenvolvimento de um dispositivo identificador de falhas comportamentais

**Silvio Renato Oliveira Menegassi^{1,*}, Vanessa Peripolli², Maria Eugênia Andrighetto Canozzi³,
Júlio Otávio Jardim Barcellos¹, Ivan Muller⁴**

¹Núcleo de Estudos em Sistemas de Produção de Bovinos de Corte e Cadeia Produtiva (NESPro), Departamento de Zootecnia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Instituto Federal Catarinense (IFC), Araquari, SC, Brazil; ³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Producción de Carne y Lana. Estación Experimental INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay; ⁴Departamento de Engenharia Elétrica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

*E-mail: programa.paat@gmail.com

The andrological examination evaluates the probable fertility of bulls and is composed of i) general clinical Evaluation, ii) evaluation of the internal and external genital system, iii) evaluation of the physical and morphological aspects of semen and iv) behavioral assessment (libido and physical ability). Although poorly performed by veterinary physicians, the parameters of the last stage of the examination (libido and physical ability) influence the fertility rates of the herd, since it depends on the ability of the bulls to perform the breeding and to impregnate a large number of females. The observation of the presence or absence of libido and/or physical ability is even more fundamental in *Bos Taurus indicus* bulls, because they are more reactive to the human presence than *Bos taurus taurus* animals, hindering the diagnosis by human visual observation. Therefore, the aim of this study was to develop a process of evaluation of the behavioral stage of *Bos Taurus indicus* bulls with the use of a device in the form of a collar fixed to the neck of the cattle, males and females; an intravaginal device (DIV), inserted into the vagina of the cows; a data collector; and software for data analysis and visualization. The collars and DIV transceivers contained acceleration, impact and temperature sensors and gyroscope, based on Microelectromechanical Systems Technology (MEMS), and those responsible for storing movement and impact information in a precise way. The DIV, wrapped in airtight casing, had an adequate shape in its dimensions for insertion into the female vagina, and analyzed the impact of a copula activity, indicating whether the penis penetration was good or unsuccessful, comprising technology of low-frequency radio waves. The process was conceived so that the behavioral stage could be performed without direct human interference, both in the use of the evaluation of bulls and estrous cyclicity of the cows. The process was tested in a pen with the use of zebu cows with the collars and DIV devices and zebu bulls suitable for breeding. The software data were consistent with those observed by the evaluators. The process generated a patent. Thus, the present process may be used to improve breeding rates of animals, from the selection of bulls able to reproduce in the behavioral stage of the andrological examination and also to recognize the estrous cyclicity of females, making them more apt for reproduction. In future studies the process will be tested at field with zebu bulls and cows.

Keywords: intravaginal device, sexual behavior, Zebu bulls.

Palavras-chave: comportamento sexual, touros zebuínos, dispositivo intra vaginal.

Novo método de rastreamento da comunicação mediada por vesículas extracelulares no folículo ovariano bovino

New method for tracking extracellular vesicles mediating intercellular communication within bovine ovarian follicle

**Victória Martins Braghetto Barillari*, Alessandra Bridi,
Ana Clara Faquineli Cavalcante Mendes de Ávila, Gabriella Mamede Andrade,
Felipe Percin, Flávio Vieira Meirelles, Juliano Coelho da Silveira**

Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP); Pirassununga, SP, Brasil.

*E-mail: victoria.barillari@usp.br

O desenvolvimento folicular é fundamental para a produção de um oócito de qualidade em espécies domésticas, assim como em humanos. Para que isso ocorra é importante que haja comunicação entre as células foliculares em geral, assim como entre as células do cumulus e o oócito. As vesículas extracelulares fazem parte desta comunicação e são caracterizadas por serem pequenas vesículas secretadas por células, que migram através dos fluidos corporais carregando moléculas bioativas capazes de interferir no funcionamento da célula alvo. No contexto reprodutivo, essas vesículas já foram descritas no fluido folicular, em lavados ovidutais e uterinos e, no plasma seminal. Baseado nisso, o objetivo deste estudo foi desenvolver um novo método de rastreamento de vesículas extracelulares a partir da transfecção das células da granulosa colocadas em cultivo *in vitro* com o plasmídeo PalmGFP. Esse plasmídeo quando expresso é responsável por carregar a proteína GFP em domínios de membrana ricos em ácido palmítico, os quais são incorporados em vesículas extracelulares por meio da via de formação do endossomo. Para isso, o cultivo celular foi estabelecido a partir da dissecação de folículos ovarianos bovinos provenientes de vacas de abatedouro. Os folículos foram rompidos individualmente sob estereomicroscópio para a seleção das células da granulosa, que posteriormente foram plaqueadas em placas Nunc® de 4 poços, com 5×10^5 células por poço, em 500 µl de meio (DMEM-F12; 1% Penicilina-Streptomicina-Fungisona; 0,1% BSA; 1% ITS; 0,11% MEM e 0,01% Androstenediona), permanecendo em estufa de alta tensão de oxigênio a 38,5°C. A transfecção foi realizada após 48 h de cultivo, utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen®) como reagente para inserção do plasmídeo PalmGFP nas células, a fim de marcar a membrana celular em verde e, consequentemente, fazer com que essas células secretem vesículas marcadas. O grupo controle negativo foi transfectado sem adição do plasmídeo. Com 96 horas de cultivo, com a intenção de detectar a presença da proteína GFP nas vesículas e nas células da granulosa, o meio de cultivo foi coletado para isolamento das vesículas extracelulares. Parte das células da granulosa foi coletada para extração de proteínas, utilizando o buffer RIPA e outra parte das células foi fixada com paraformaldeído 4% para confecção das lâminas e análise por microscopia de fluorescência, a fim de confirmar o funcionamento da transfecção. Até o dado momento, foi possível confirmar a eficácia do protocolo de transfecção das células através da microscopia de fluorescência, com eficiência de aproximadamente 5%. Espera-se que com esse novo método seja possível analisar de forma fidedigna o trajeto e a interferência do tratamento dessas vesículas nas diferentes etapas da produção *in vitro* de embriões. Portanto, podemos concluir que é possível transfectar as células da granulosa, pois elas passaram a expressar a proteína GFP, que consequentemente foi capaz de marcar a membrana destas células. Suporte financeiro: FAPESP (2014/22887-0; 2017/24326-3).

Palavras-chave: células da granulosa, comunicação intercelular, vesículas extracelulares.

Keywords: granulosa cells, intercellular communication, extracellular vesicles.

Técnicas complementares para avaliação andrológica de touros da raça Nelore *Complementary techniques for soundness evaluation of Nelore bulls breed*

**Gabriela Marques de Rezende^{1,2}, André Belico de Vasconcelos^{1,*},
Eneiva Carla Carvalho Celeghini², Rubens Paes de Arruda², Leonardo Batissaco²,
Sâmara Cristine Costa Pinto², Laura Nataly Garcia Oliveros²**

¹Universidade de Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brasil; ²Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Pirassununga, SP, Brasil.

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

A exclusão de touros com reduzido potencial reprodutivo é crucial para o aumento da fertilidade do rebanho. Desta forma, a inclusão de mais técnicas ao exame andrológico pode fornecer informações que contribuem para melhorar a seleção de touros para a monta natural. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o acréscimo, aos exames andrológicos convencionais, da termografia, ao exame clínico, e das análises computadorizada da motilidade (CASA) e das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, ao espermograma. Foram utilizados quatro touros adultos da raça Nelore. Previamente ao exame andrológico, foi realizada termografia da região ocular e da superfície escrotal. O exame andrológico consistiu em avaliação externa do escroto, testículos, epidídimos e cordão espermático, por inspeção e palpação, aferição do perímetro escrotal e avaliação interna das glândulas sexuais acessórias por palpação transretal. Após a colheita do sêmen (por eletroejaculação), foram realizadas as avaliações convencionais do sêmen, acrescida a avaliação por CASA, observando-se: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) e pelas sondas fluorescentes: iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), e o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), para avaliação das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, respectivamente. Foi realizada análise estatística descritiva (média e desvio padrão) e correlação de Pearson ($P \leq 0,05$). Os animais apresentaram perímetro escrotal ($40,02 \pm 1,64$ cm) aceitável para a idade e padrão da raça. Os valores médios encontrados para turbilhonamento ($3,5 \pm 0,5$, em escore de 0 a 5), motilidade ($66,2 \pm 4,7\%$), vigor (3 ± 0 , em escore de 1 a 5), volume ($8,75 \pm 2,9$ mL), concentração espermática ($736,8 \pm 376,3$ spz/mL) e defeitos maiores ($8,5 \pm 3,3\%$), menores ($9,5 \pm 6,0\%$) e totais ($18 \pm 7,3\%$) corroboram os aceitáveis segundo o CBRA. As temperaturas testiculares ($32,8 \pm 1,4^\circ\text{C}$) não ultrapassaram a diferença de 4°C em relação à temperatura corporal ($35,45 \pm 1,6^\circ\text{C}$). Durante a avaliação computadorizada do sêmen a MT foi de $80 \pm 17,4\%$, MPR $65,0 \pm 21,1\%$, VAP $602,7 \pm 116,5$ $\mu\text{m/s}$, VSL $531,5 \pm 100,2$ $\mu\text{m/s}$, VCL $860,5 \pm 146,0$ $\mu\text{m/s}$, ALH $27,2 \pm 2,2$ μm , BCF $351,5 \pm 43,8$ Hz, STR $88,0 \pm 1,8\%$ e LIN $64,2 \pm 2,2\%$. Além disso, o percentual de células apresentando membrana plasmática íntegra foi de $70,1 \pm 5,7\%$, acrossomo íntegro de $90 \pm 6,7\%$ e alto potencial mitocondrial de $79,5 \pm 3,0\%$ e células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial (PIAIA) de $69,2 \pm 6,1\%$. Foram encontradas correlações positivas entre MT e MP ($r = 0,95$ e $P = 0,04$), e entre porcentagem de células PIAIA e MT ($r = 0,94$ e $P = 0,05$), sendo que nenhuma outra característica apresentou correlação significativa. As técnicas adicionais utilizadas nesse estudo permitem uma avaliação mais detalhada da condição andrológica dos touros, mas evidenciam que a alteração na temperatura testicular, no momento do exame, não interfere nas avaliações clínicas andrológicas; além disso, afirma a existência da relação entre a motilidade e as membranas espermáticas.

Palavras-chave: bovinos, sêmen, sondas fluorescentes, termografia, CASA.

Keywords: bovine, semen, fluorescent probes, thermograph, CASA.



Nanopartículas de LDL no congelamento do sêmen canino são mais eficientes na manutenção da qualidade espermática

Nanoparticles of LDL in canine semen freezing are more efficient in maintaining sperm quality

**Edenara Anastácio^{1,*}, Antônio Sérgio Varela Jr.², Maria Eduarda Bicca Dode¹, Gabriela Hädrich³,
Cristiana Lima Dora⁴, Carine Dahl Corcini⁵**

¹Doutorandas do Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

²Professor do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil; ³Pós-doutoranda em Biofarmácia, Universidade Martin Luther Halle-Wittenberg, Halle, Alemanha; ⁴Professora de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil; ⁵Professora de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*E-mail: edenara_anastacio@hotmail.com

Nanopartículas apresentam propriedades funcionais únicas, não encontradas na escala macro, devido principalmente à elevada área superficial de contato, que resulta em uma intensa interação com a matriz na qual estão inseridas. Em diluentes de criopreservação seminal à base de gema de ovo, o principal componente crioprotetor é a lipoproteína de baixa densidade. A LDL possui propriedades que permitem a interação com as membranas celulares, protegendo os espermatozoides do choque térmico e mantendo a motilidade após o descongelamento. Contudo, a gema de ovo possui outros constituintes que são deletérios para os gametas, como a lipoproteína de alta densidade. Neste contexto, a extração das micelas de LDL para congelamento seminal, através da fração plasmática da gema de ovo demonstra-se como uma alternativa. Devido às crioinjúrias espermáticas, baixas taxas de concepção (45 %) são descritas na literatura com a utilização de sêmen canino congelado na inseminação artificial por deposição vaginal. Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar diferentes protocolos de produção nanopartículas de LDL, sobre a qualidade do sêmen canino criopreservado. O plasma de gema de ovo, diluente controle, foi submetido à três sistemas de produção de nanopartículas: banho de ultrassom - 30 min em 40 A; ponteira de ultrassom - 50% da amplitude, 30 min; e homogeneização de alta pressão - 10.000 PSI por 6 ciclos. Mensurou-se as propriedades de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta dos quatro diluentes resultantes. Os ejaculados (n = 20) foram obtidos por manipulação digital. Após diluição nos diferentes meios com 5 % de glicerol, as amostras foram resfriadas a 5°C por 2 horas, mantidas a 10 min ao vapor e submersas em nitrogênio líquido. A qualidade espermática após o descongelamento foi mensurada através do computer-assisted sperm analysis (CASA) e citometria de fluxo. As médias foram comparadas pelo teste de LSD. As correlações foram verificadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Os processamentos modificaram as propriedades das partículas de LDL. O índice de polidispersão indicou que apenas a ultrassonicação por ponteira de ultrassom produziu um sistema monodisperso e estável. As nanopartículas de LDL em diluentes de congelamento foram mais eficazes no controle da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (P < 0,05). Comparado ao controle, nanopartículas de LDL produzidas por ponteira de ultrassom foram mais eficientes na manutenção da motilidade espermática progressiva, integridade e fluidez de membrana após o descongelamento (P < 0,05). Sugere-se que este sistema possibilitou a maximização do efeito biológico e crioprotetor da LDL, devido possivelmente ao aumento de área superficial de contato e interação da LDL com os espermatozoides. A ultrassonicação por ponteira de ultrassom demonstrou-se efetiva para a produção de nanopartículas de LDL para diluentes de congelamento seminal de cães. Meios de criopreservação com 249,34 nm de tamanho médio de partículas de LDL, potencial de polidispersão de 0,37, e potencial zeta de -1,15 mV foram relacionadas aos melhores parâmetros de qualidade espermática após o descongelamento.

Palavras-chave: nanopartículas, LDL, sêmen canino.

Keywords: *nanoparticles, LDL, canine semen.*

Avaliação da hemodinâmica uterina em cadelas com piometra submetidas a distintos protocolos de tratamento medicamentoso

Evaluation of uterine hemodynamic in pyometra bitches submitted to drug treatment

**Roberto R. da Rosa Filho^{1,*}, Máira Morales Brito¹, Thaís Gomes Faustino¹,
João Vitor Menezes Lopes¹, Leticia Lima de Almeida¹, Renato Bueno Flores¹,
Thayná Pantoja Gardés¹, Camila Infantsi Vannucchi¹**

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

*E-mail: betorrf@gmail.com

O complexo hiperplasia endometrial cística - Piometra é uma desordem endometrial das cadelas, sendo a mais comum e importante dentre as afecções uterinas. A ovariectomia é a principal escolha terapêutica, porém, protocolos de tratamento farmacológico surgiram como substitutivos à cirurgia. No entanto, não há estudos que avaliem a hemodinâmica uterina durante e após o tratamento conservativo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar a hemodinâmica e vascularização uterina após distintos tratamentos medicamentosos para piometra em cadelas. Para tanto, 17 cadelas com diagnóstico de piometra foram alocadas em 3 grupos: controle (submetidas à ovariectomia logo após o diagnóstico), aglepristone (submetidas a protocolo de tratamento com aglepristone na dose de 10 mg/Kg, SID, SC, no dia 0, 1 e 8 após o diagnóstico) e grupo associação (submetidas a tratamento com aglepristone, além da administração de prostaglandina sintética na dose de 1 µg/kg, SID, IM por 7 dias). As cadelas foram avaliadas diariamente por ultrassonografia modo-B e Dopplervelocimetria das artérias uterinas direita e esquerda, por meio dos parâmetros de velocidade do fluxo sanguíneo [pico de velocidade sistólica (PS), velocidade diastólica final (ED) e velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX)] e os índices hemodinâmicos [índice de resistividade (RI), índice de pulsatilidade (PI), relação sístole/diástole (SD)]. As artérias uterinas direitas e esquerdas foram classificadas de acordo com o valor RI em: mais afetada e menos afetada. Para a avaliação qualitativa da vascularização endometrial (por escore 1-3), o escaneamento dos cornos uterinos foi realizado, preferencialmente, em corte transversal no modo-B, seguido do Doppler colorido. Para acompanhar a evolução do diâmetro uterino foi calculado a área e perímetro dos cornos uterinos em corte transversal no modo-B. Os efeitos dos tratamentos e tempos foram analisados pelos testes T e LSD, respectivamente, e por ANOVA ($P \leq 0,05$). Quando comparados os efeitos dos tratamentos, o grupo Aglepristone apresentou maior velocidade de fluxo sanguíneo (ED) e menor resistência vascular (PI, RI e SD) na artéria uterina mais afetada. Na avaliação temporal, houve diminuição significativa do perímetro, área e escore de vascularização uterina, além da ED na artéria uterina mais afetada. Por outro lado, o PI da artéria uterina mais e menos afetada, RI da artéria uterina mais afetada e SD de ambas artérias uterinas aumentaram ao longo do tempo. Os grupos Aglepristone e Associação apresentaram menor perímetro, área e escore de vascularização uterina, assim como menor velocidade diastólica final na artéria mais afetada, em comparação ao Controle, independente do momento de avaliação. Em contrapartida, tais grupos apresentaram maior PI, RI e SD da artéria uterina mais afetada comparando-se ao Controle. Além disto, o grupo Associação apresentou maior PS, PI, RI e SD da artéria uterina menos afetada, em comparação ao controle. Em conclusão, os diferentes protocolos de tratamento medicamentoso modulam de maneira distinta a hemodinâmica uterina, sendo a associação entre o aglepristone e a prostaglandina de melhor resposta hemodinâmica e redução do diâmetro uterino. Ademais, o restabelecimento da hemodinâmica uterina ao longo do tempo foi evidente, independentemente do protocolo de tratamento. Desta maneira, a terapia medicamentosa para a piometra canina pode ser considerada uma alternativa efetiva.

Palavras-chave: vascularização, útero, infecção, ultrassonografia.

Keywords: vascularization, uterus, infection, ultrasonography.

Efeito potencial do sistema de nanopartículas com betaína na preservação de folículos pré-antrais de tecido ovariano felino vitrificado

Potential effect of the betaine nanoparticle system on the preservation of preantral follicles of vitrified feline ovarian tissue

Lucy Vanessa Sulca Ñaupas^{1,*}, Danielle Cristina Calado Brito¹, Ana Paula Ribeiro Rodrigues¹, Jose Ricardo Figueiredo¹, Valder Nogueira Freire², Regiane Rodrigues dos Santos³

¹Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais Ovarianos, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil; ²Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil; ³Schothorst Feed Research, Lelystad, Holanda.

*E-mail: hani_1092@hotmail.com

Os inúmeros impactos ambientais, principalmente devido à ação antrópica, vêm refletindo no declínio populacional de felinos silvestres, apresentando algum grau preocupante nas escalas de animais em risco de extinção. Desta forma, a vitrificação de tecido ovariano é um método de criopreservação sugerido para apoiar e preservar a fertilidade das espécies existentes. No entanto, o dano causado pelo estresse oxidativo e osmótico durante o processo são os principais responsáveis pela perda folicular. Para tanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a adição do ácido ascórbico (AA) e da betaína (BET) carregadas em nanopartículas de CaCO_3 (c) na vitrificação de tecido ovariano de gata, como modelo animal para felinos silvestres. Com isso, ovários de seis gatas sexualmente maduras foram adquiridos por ovariectomia de rotina. Posteriormente, oito fragmentos ($n = 8$) foram obtidos. Destes, um fragmento foi imediatamente fixado (controle fresco) para análise morfológica, densidade de folículos ovarianos e células estromais. Os outros sete foram vitrificados na ausência e presença de AA e BET, não carregadas (0,3 mM AA; 1 mM BET) ou carregadas em nanopartículas de CaCO_3 (20 μM ou 200 μM AA; 7,4 μM ou 74 μM BETc). Após aquecimento, os fragmentos foram avaliados como no controle fresco. As variáveis foram comparadas com o modelo linear generalizado (GLMM) e são apresentadas como média \pm erro padrão. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A vitrificação do tecido ovariano em meio contendo 7,4 μM BETc ou 200 μM AA preservou a morfologia dos folículos primordiais em 61,7% ($\pm 6,2$) e 51,0% ($\pm 8,6$), semelhante à do controle fresco (63,2 $\pm 6,3\%$), assim como dos folículos em desenvolvimento 45,7% ($\pm 14,2$), 26,6% ($\pm 11,7$) e (38,1 $\pm 13,7\%$) respectivamente. A densidade folicular mostrou uma diminuição significativa de folículos em desenvolvimento (<3 folículos / mm^3), exceto os vitrificados na presença de 7,4 mM BETc (3,2 $\pm 0,9$ folículos / mm^3), que foram semelhantes ao controle (7,4 $\pm 4,5$ folículos / mm^3). Apesar da diminuição da densidade das células do estroma quando o tecido ovariano foi vitrificado na presença de 1 mM BET e 0,3 mM AA as diferenças não foram significativas. Este é o primeiro estudo que aplica o sistema de nanopartículas à vitrificação do tecido ovariano. Alguns estudos recentes com nanopartículas foram publicados com resultados promissores para oócitos vitrificados de outras espécies de mamíferos. Desse modo, conclui-se que o estresse osmótico causado pela vitrificação, que é prejudicial para folículos pré-antrais, pode ser neutralizado pela suplementação da solução de vitrificação com 74 μM de betaína carregada em nanopartículas de CaCO_3 , tendo a nanotecnologia como um potente procedimento para garantir a presença intracelular de betaína.

Palavras-chave: nanopartículas de CaCO_3 , ácido ascórbico, osmorregulador, Criopreservação, gato.

Keywords: *nanoparticles of CaCO_3 , ascorbic acid, osmoregulator, cryopreservation, cat.*



Effect of temperature during vibration emissions on boar spermatozoa stored at 5°C in a long-term antibiotic free extender

Efeito da temperatura durante a emissão de vibrações nos espermatozoides de suínos armazenados a 5°C com diluente de longa ação sem adição de antimicrobiano

Aline Fernanda Lopes Paschoal^{1,2,*}, Anne-Marie Luther¹, Martin Schulze³, Karl-Fritz Weitze¹, Dagmar Waberski¹

¹Unit for Reproductive Medicine of Clinics, Veterinary University Hannover, Hannover, Germany; ²Faculdade de Veterinária, Setor de Suínos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; ³Institute for Reproduction of Farm Animals Schönnow, Germany.

*E-mail: alinepaschoal3@gmail.com

Transport stress simulated by vibration emission with an orbital shaker affects the quality of boar spermatozoa stored in Beltsville Thawing Solution (BTS) at 17°C (Schulze M et al. 2018, *AnimReprodSci* 192:328-334). The present study aimed to evaluate the effect of the temperature during vibration emissions after filling of semen doses on boar spermatozoa subjected to hypothermic storage at 5°C. Semen (n= 8 boars) was isothermally (32°C) diluted with an antibiotic-free long-term extender (Androstar[®] Premium, Minitüb, Germany) to a final volume of 90 mL in QuickTip Flexitubes[®] (Minitüb, Germany) containing 20 x 10⁶ sperm/mL. Doses were split into three groups. Directly after dilution, Group 1 samples were exposed to vibration emission for 4 h at 22°C and then slowly cooled to 5°C. Group 2 samples were also cooled during 4 hours at 22°C and then stored at 5°C, after 20 h of storage, samples were subjected to vibration emissions at 5°C. Vibration was performed with a rotation speed of 200 rpm circular horizontal frequencies with 1 cm of amplitude (Swip Shaker, Bühler KL-2, Germany). Group 3 samples (Control) were cooled during 4 hours at 22°C and stored to 5°C, but remained unshaken. All semen doses were stored for 144 h at 5 °C. Progressive motility was assessed at 24, 72 and 144 h of storage with Computer Assisted Sperm Analysis System. Flow cytometric evaluation of plasma membrane and acrosome integrity (PI negative/FITC-PNA negative), amount of viable spermatozoa with high mitochondrial membrane potential (PI negative /JC-1 positive) and spermatozoa with low membrane fluidity (Yo-Pro-1 negative/M-540 negative) were also performed. The percentage of viable sperm with low intracellular calcium content (PI negative/Fluo-3 negative) was assessed to evaluate the specific response to the capacitating stimulus (bicarbonate induced Ca²⁺Influx) with flow cytometry at 96 h of storage. All data is presented as mean ± standard deviation (SD). The means were compared using T-Student test. Differences were considered statistically significant when P < 0.05. At 24 h of storage the progressive motility was lower (P < 0.05) in doses shaken at 22°C (77.7 ± 2.7%) and at 5°C (77.3 ± 3.9%) compared to unshaken control doses (81.5 ± 3.6%). At 72 and 144 h of storage no differences in progressive motility were observed. No difference was observed for the plasma membrane and acrosome integrity, the amount of viable spermatozoa with high mitochondrial membrane potential and of viable sperm with low membrane fluidity at 24, 72 and 144 h of storage. The specific response to the capacitating stimulus was similar among the transport simulation groups. In conclusion, the temperature during vibration emission does not influence the quality of boar spermatozoa stored long-term in the antibiotic-free extender Androstar[®] Premium at 5°C. Semen doses determined for hypothermic storage, therefore, can be transported before or after cooling to 5°C in a protective extender. The study was supported by CAPES/DAAD (PROBRAL Project-ID 57390778) and Rentenbank (AMIKOS Project).

Keywords: chilling, mechanical shock, sperm, transport.

Palavras-chave: resfriamento, choque mecânico, espermatozoides, transporte.



Enfermidades associadas a perdas gestacionais em suínos causadas por PPV, PCV2, PCV3 e leptospiros patogênicas

Diseases associated with pregnancy losses in swine caused by PPV, PCV2, PCV3 and pathogenic leptospires

Kamila Cerbaro Cezario¹, Geslaine Herdt², Mathias Martins^{1,2}, Paulo Eduardo Bennemann^{1,2}, Sérgio Abreu Machado^{1,2,*}

¹Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal, Laboratório de Biologia Molecular, Medicina Veterinária, Unoesc, Xanxerê, SC, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária, Unoesc, Xanxerê, SC, Brasil.

*E-mail: sergio.machado@unoesc.edu.br

O Brasil tem participação significativa no mercado internacional de carnes. Neste cenário, a suinocultura ocupa posição de destaque. Fatores que interferem na eficiência reprodutiva são responsáveis por prejuízos econômicos expressivos e dentre estes, a mumificação fetal tem contribuição relevante. Parvovírus suíno (PPV), circovírus suíno tipo 2 e tipo 3 (PCV2 e 3) e cepas patogênicas de *Leptospira* spp. podem estar envolvidas em perdas gestacionais. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de PPV, PCV2, PCV3 e de *Leptospira* spp. em fetos suínos mumificados na região sul do Brasil. Seis granjas dos estados do PR, SC e RS com alto índice de perdas fetais ($\geq 4\%$) foram incluídas no estudo. Duzentos e cinquenta e cinco *pools* de pulmão, rim, coração e fígado foram utilizados para isolamento de DNA. A detecção dos patógenos foi realizada por PCR buscando amplificar regiões conservadas dos genomas do PPV (*NS-1*), PCV2 e PCV3 (*ORF2*), e Leptospiros patogênicas (*LigA* e *LigB*). Entre as amostras analisadas, 158 (61,9%), 205 (80,3%), 247 (95,2%) e 25 (9,8%) foram positivas para PPV, PCV2, PCV3 e *Leptospira* spp., respectivamente. Foi possível verificar co-infecções com dois, três ou quatro agentes, isto pode ter efeito sinérgico na patogenicidade destes agentes e potencializar as perdas reprodutivas. De acordo com os dados biométricos coletados durante o processamento das amostras, 16 fetos (6,2%) tiveram morte fetal entre os dias 40 e 50 de gestação, 77 (30,1%) entre os dias 50 e 60, 64 (25%) entre os dias 60 e 70, 35 (13,7%) entre os dias 70 e 85 e, em fase avançada de desenvolvimento, 63 mortes fetais (24,7%) entre os dias 85 e 110 de gestação. Não foi observada co-relação entre a positividade para algum dos agentes infecciosos com o momento de perda gestacional. Especialmente para os vírus PPV, PCV2 e PCV3, as taxas de positividade foram elevadas. Estes resultados sugerem que os agentes infecciosos investigados sejam os responsáveis pelas perdas gestacionais observadas neste estudo. A presença destes patógenos, em infecções individuais ou co-infecções, - exceto PCV3, que ainda carece de comprovação científica - é considerada fator determinante para ocorrência de morte fetal. Como os rebanhos amostrados têm programas sanitários bem estabelecidos, estes achados podem indicar a possibilidade de uma cobertura vacinal insuficiente, seja por manejo inadequado ou importantes variações antigênicas, especificamente viral. Por sua vez, as causas destas possíveis falhas na imunidade ativa necessitam de investigação adicional.

Palavras-chave: mumificação fetal, PPV, PCV2, PCV3, *Leptospira* spp.

Keywords: fetal mummification, PPV, PCV2, PCV3, *Leptospira* spp.



Microcápsulas de soro de queijo como veículos de moléculas bioativas em diluentes de sêmen suíno

Microcapsules from cheese whey as vehicle bioactive molecules in swine semen extender

Anna Flávia Tischer da Silva^{1*}, Ana Júlia Führ², Cláucia Fernanda Volken de Souza², Ivan Cunha Bustamante Filho¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari (Univates); ²Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Universidade do Vale do Taquari (Univates), Lajedo, RS, Brasil.

*E-mail: aftdsilva@univates.br

Frequentemente surgem novas demandas na formulação de diluentes para preservação do sêmen suíno, em virtude das normatizações de comércio nacional e internacional do material para inseminação artificial. Destacamos o uso de antimicrobianos nas doses, atividade que vem sendo proibida por países da União Europeia, fazendo-se necessário pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos de veicular as moléculas bioativas na dose. O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da adição de microcápsulas, feitas a partir do soro de queijo como adjuvante ao diluente de sêmen suíno, para avaliação da toxicidade do tratamento às células. Utilizou-se 10 ejaculados de cachorros adultos, coletados em rotina de central de produção de sêmen (CPS). Em delineamento *split sample*, foram testadas diferentes concentrações (p/v) do soro de queijo: 0% (controle negativo), 1%, 5% e 10%. Apenas ejaculados com mais de 80% de motilidade total foram utilizados no estudo. Após a avaliação inicial, as amostras foram diluídas em diluente de longa duração (AndroStar Plus, Minitube GmbH, Tiefenbach, Alemanha), conforme a rotina da CPS e armazenadas a 17°C. As amostras foram avaliadas nos tempos 0h, 48h, 168h e 261h. Foram avaliados os seguintes parâmetros de movimento espermático: motilidade total, motilidade local e progressiva utilizando o sistema CASA SpermVision (Minitube). A avaliação estrutural do espermatozoide foi feita por citometria de fluxo BD Accuri C6 Sampler (San Jose, California, EUA), utilizando-se as sondas fluorescentes FITC-PSA para integridade do acrossoma e iodeto de propídeo para integridade de membrana plasmática. Foram analisados 10.000 eventos, sendo excluídos os não corados pela sonda Syto59. Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguido de teste Tukey, assumindo significância de 5%. Foi observada uma redução na motilidade espermática (total e progressiva), já esperada, ao longo do tempo de preservação ($P < 0.05$). A adição do soro de queijo microencapsulado levou a uma redução na motilidade total e progressiva de forma dose dependente. Contudo, com base na motilidade total, a preservação do sêmen por 48h não foi afetada no tratamento de 1%. Com relação a integridade estrutural do espermatozoide, os dados de citometria não apontaram alterações significativas nos dados de membrana plasmática e acrossomal mesmo na concentração mais alta (10%). Concluímos que o soro de queijo pode ser adicionado em uma concentração até 1% em doses utilizadas em até 48 horas sem afetar a motilidade e a integridade dos espermatozoides.

Palavras-chave: soro de queijo, microcápsulas, sêmen suíno, diluentes.

Keywords: *cheese whey, microcapsule, boar semen, extender.*

Growth and differentiation factor-9 (GDF-9) reduces apoptosis and promotes *in vitro* activation of sheep primordial follicles through the PI3K/AKT signaling pathway

Fator de crescimento e diferenciação-9 reduz a apoptose e promove a ativação in vitro de folículos primordiais ovinos através da via de sinalização PI3K/AKT

Alane Pains Oliveira do Monte, Maria Éllida de Sousa Bezerra, Vanúzia Gonçalves Menezes, Bruna Bortoloni Gouveia, Ricássio de Sousa Barberino, Thae Lanne Barbosa Gama Lins, Vanessa Raquel Pinto de Barros, Jamile Maiara da Silva Santos, Nathalie Jiatsa Donfack, Maria Helena Tavares de Matos*

¹Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil.
E-mail: *helena.matos@univasf.edu.br

Growth and differentiation factor-9 (GDF-9) is an important regulator of cell proliferation and survival through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway. However, the effects of GDF-9 on the survival and activation of ovine primordial follicles is not yet known. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of GDF-9 on the morphology, activation, apoptosis and granulosa cell proliferation after *in vitro* culture of sheep ovarian tissue and to verify whether GDF-9 could improve follicular activation through the PI3K/AKT pathway. Ovine ovarian fragments from 5 animals were fixed for histology (fresh control) or cultured in α -MEM⁺ (control medium) or α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of GDF-9 (1, 50, 100, 200 or 400 ng/mL) for 7 days. After culture, tissues from all treatments were destined to histological analyses (follicular survival, activation and growth). Cleaved caspase-3 (apoptosis marker) and PCNA (cell proliferation marker) immunohistochemical analyses were performed. Inhibition of PI3K activity with LY294002 was performed and phosphorylated AKT (pAKT) expression was analyzed by immunostaining after *in vitro* culture in the absence or presence of PI3K inhibitor. The percentages of normal (survival), primordial and growing follicles (activation), apoptotic and PCNA-positive cells were compared by Chi-squared test. Data of follicular and oocyte diameters were compared by ANOVA and Tukey's tests ($P < 0.05$). The percentage of normal follicles decreased ($P < 0.05$) after 7 days of culture in all treatments compared to the fresh control (78.33%). Additionally, 50 ng/mL GDF-9 had ($P < 0.05$) more normal follicles (67.5%) compared to all treatments (α -MEM⁺: 55.83%, 100 ng/mL GDF-9: 50.8%, 200 ng/mL GDF-9: 54.2% and 400 ng/mL GDF-9: 50.0%), except 1 ng/mL GDF-9 (61.7%; $P > 0.05$). After culture, there was a reduction ($P < 0.05$) in the percentage of primordial follicles and an increase in the percentage of growing follicles in all treatments compared to fresh control. Furthermore, the treatment containing 50 ng/mL GDF-9 showed higher ($P < 0.05$) follicular activation (81.48% growing follicles) than 100 (72.13%), 200 (76.92%) and 400 (76.67%) ng/mL GDF-9, and similar to ($P > 0.05$) α -MEM⁺ (80.60%) and 1 ng/mL GDF-9 (78.38%). However, 1 ng/mL GDF-9 presented the lower ($P < 0.05$) follicular and oocyte diameters compared to the fresh control and 100 ng/mL GDF-9. Culture of ovarian tissue in 50 ng/mL GDF-9 maintained the percentage of apoptotic follicles similar ($P > 0.05$) to that observed in the fresh control and lower ($P < 0.05$) than that observed in the α -MEM⁺ and 1 ng/mL GDF-9. The percentage of PCNA-positive cells in 50 ng/mL GDF-9 was higher ($P < 0.05$) than in the fresh control, α -MEM⁺ and 1 ng/mL GDF-9. Nevertheless, the pretreatment of the ovarian tissue with LY294002 inhibited ($P < 0.05$) the primordial follicle activation stimulated by both α -MEM⁺ and 50 ng/mL GDF-9. After culture in α -MEM⁺ and 50 ng/mL GDF-9 without the PI3K inhibitor, oocytes from primordial or intermediate follicles presented a moderate staining for pAKT. However, after PI3K inhibition, pAKT immunostaining in oocytes was weak in these treatments. In conclusion, GDF-9 at 50 ng/mL maintains follicular survival and promotes primordial follicle activation by reducing apoptosis and stimulating granulosa cell proliferation through activation of the PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords: ovary, tissue culture, preantral follicle, intracellular signaling, ovine.

Palavras-chave: ovário, cultivo de tecido, folículo pré-antral, sinalização intracelular, ovino.

Effect of hormonal cervical dilation protocol on the serum progesterone concentration, embryo development and quality in sheep

Efeito do protocolo hormonal de dilatação cervical sobre a concentração sérica de progesterona, desenvolvimento e qualidade de embriões ovinos

**Juliana Dantas Rodrigues Santos^{1,*}, Mário Felipe Alvarez Balaro¹, Augusto Ryonosuke Taira¹,
Caroline Gomes do Espírito Santo¹, Clara Vieira de Souza¹, Viviane Lopes Brair¹,
Ana Luiza Cunha Bade¹, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan¹, Jeferson Ferreira da Fonseca²,
Felipe Zandonadi Brandão¹**

¹Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; ²Embrapa Caprinos e Ovinos, Coronel Pacheco, MG, Brasil.

*E-mail: julianadantas_rodrigues@hotmail.com

The complex sheep cervical structure has been an obstacle to uterine access and to non-surgical embryo collection by transcervical route. Thus, hormonal protocols aiming at the relaxation of the cervix become important for the development of this technique. However, the hormonal environment of embryo donors needs to be compatible with embryo formation, and little is known about the effect of hormones used in the cervix dilatation protocols on progesterone (P4) concentration, as well as on embryo development and quality (EQ). Thus, this study aimed to evaluate the influence of a hormonal protocol of cervical dilatation, on the P4 serum concentration, stages of development and EQ. For this, 40 Santa Inês sheep were submitted to day zero protocol (Pinto P et al., 2018. *Theriogenology*, 113: 146-152) followed by natural mating. The animals were allocated into: treated group (Treat; n = 20), which consisted in administration of estradiol benzoate (100 µg, i.v.) and cloprostenol (0.12 mg, i.m.) 12 h prior to embryo collection associated with the application of oxytocin (100 IU, i.v.) 15 min prior to collection procedure (Leite L et al. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 70:1671-1679); the other group was the control (Cont; n = 20), with saline administration. All embryos were collected by laparotomy and classified according to criteria established by the IETS. Blood samples were collected prior to protocol (dilation or control; 0 h), 3 h, 6 h, 9 h, and 12 h after hormone or saline administration. Serum was used for the P4 measurement by radioimmunoassay. Data were tested for normality and homoscedasticity with the Lilliefors and Bartlett's tests, respectively. P4 concentrations were compared by paired ANOVA followed by t test (normal data), and by the Mann Whitney or Friedman test for non-parametric data. Embryo data were evaluated by Fisher's test, all with a significance level of 5%. The control group had a tendency to a higher total number of embryos recovered per female (Treat: 3.8 ± 3.6 vs. Cont: 5.4 ± 2.7; P = 0.058). For the viable embryos by female, the control group (3.4 ± 2.4) was superior (P < 0.05) when compared to the treated group (2.0 ± 2.9). Regarding the frequency distribution at each stage of development, there were no differences between groups (P > 0.05). In each grade of EQ there was an uniform distribution between the groups (Grade I Treat: 46.8 vs. Cont: 57.1; Grade II Treat: 38.3 vs. Cont: 33.3; Grade III Treat: 8.5 vs. Cont: 7.9; Grade IV Treat: 6.4 vs. Cont: 1.6, P > 0.05). However, analysis restricted in control group, obtained a higher frequency of grade I embryos (P < 0.05), while in the treated group prevailed grade I and II (P < 0.05). Serum concentrations of P4 at 0 h were Treat: 10.54 ± 10.03 vs. Cont: 8.54 ± 6.20; P > 0.05. The control group had higher concentrations compared to treated at 6 h (Treat: 3.70 ± 3.29 vs. Cont: 9.22 ± 5.73 ng/mL), 9 h (Treat 2.24 ± 2.01 vs. Cont: 9.11 ± 6.56 ng/mL) and 12 h (Treat 1.92 ± 1.69 vs. Cont: 11.57 ± 7.22 ng/mL) after protocol or saline administration (P < 0.05). In the control group, P4 concentrations did not differ during the evaluations (P > 0.05), whereas in the treated group there was a decrease from 6 h to 12 h after the protocol (P < 0.05). Thus, we can conclude that cervical dilation hormonal protocol promotes a drop in P4 concentrations after 6 h of administration, although it does not affect the development of ovine embryos.

Support: EMBRAPA (Project 02.13.06.026.00.03) and CNPq (400785/2016-1).

Keywords: cervix, embryo collection, hormonal dosage, embryonic quality, sheep.

Palavras-chave: *cérvix, coleta de embrião, dosagem hormonal, qualidade embrionária, ovelhas.*

Biologia reprodutiva de ovelhas não-portadoras, heterozigotas e homozigotas do alelo Vacaria do gene GDF-9 determinante de prolificidade em um rebanho mestiço Ile de France

Reproductive biology of non-carriers, heterozygous and homozygous ewes of a prolificacy determinant GDF-9 allele in a Ile de France crossbred flock

Carlos José Hoff de Souza, José Carlos Ferrugem Moraes*

Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil.
*E-mail: jose.ferrugem-moraes@embrapa.br

Genes principais que determinam maiores taxas de ovulação e prolificidade podem ser uma alternativa para aumentar a produção de carne ovina. A busca de linhagens prolíficas em rebanhos brasileiros levou a identificação de um novo polimorfismo do gene GDF-9 denominado Vacaria (c943C>T) na raça Ile de France criada no Brasil. Os dados de desempenho reprodutivo evidenciaram que as ovelhas heterozigotas produziam 25% mais cordeiros para o mercado do que ovelhas não portadoras do alelo. O objetivo deste relato é descrever a biologia reprodutiva dos possíveis genótipos para este locus em um rebanho experimental contemporâneo. Durante o período experimental para produção de fêmeas homozigotas do alelo Vacaria (VV), foram efetuados 134 acasalamentos de fêmeas não portadoras (NN) e de 123 heterozigotas VN. Essa etapa foi necessária porque as fêmeas homozigotas estéreis não tinham sido identificadas nos rebanhos comerciais e tinham que ser melhor investigadas. A taxa de ovulação (TO) aferida por laparoscopia foi de 134% para as NN e 207% para as heterozigotas VN. A percentagem de cordeiros nascidos por ovelha acasalada foi de 90% para as NN e 122% para as VN e a de cordeiros nascidos por ovelha parida respectivamente de 120% e 158%. Estes resultados reiteram o efeito causal do alelo Vacaria na TO e a taxa de cordeiros nascidos por ovelha parida, e, ainda sugerem que a taxa de fertilidade do rebanho poderia ser melhorada pelo descarte das ovelhas falhadas ao final de cada temporada de reprodução. Cinquenta borregas dos três genótipos, sendo 15 NN, 16 VN e 19 VV foram submetidas a suplementação com 50 mg de acetato de medroxi-progesterona em pessários durante 12 dias, a manifestação de estro foi controlada com 5% de rufiões androgenizados e as genitálias avaliadas post-mortem nove dias após a remoção dos pessários. Respectivamente para as borregas NN, VN e VV o % de estro foi de 70%, 80% e 7%, sendo que o % de ovuladas foi de 73%, 63% e 11%. O peso médio da genitália respectivamente para as NN, VN e VV foi de $34,68 \pm 3,75$, $31,40 \pm 3,91$ e $21,77 \pm 2,99$ g, significativamente menor nas VV ($P < 0,001$), além do menor tamanho da genitália destaca-se marcado hipodesenvolvimento da região do corpo útero, mesmo nas fêmeas que apresentavam folículos ou até pontos de ovulação na córtex ovariana. O peso médio dos ovários respectivamente para as NN, VN e VV foi de $1,49 \pm 0,17$, $1,20 \pm 0,21$ e $0,77 \pm 0,18$ g, também significativamente menor nas VV ($P < 0,05$). O número médio de folículos observados nos ovários nas fêmeas VV $< 5\text{mm}$ e $> 5\text{mm}$ foi inferior a unidade, respectivamente com um IC de 0,32-0,61 e de 0,05-0,16. A mediana do número de corpos lúteos (CL) verificados nos ovários das NN foi de um CL, das VN dois CL e das VV zero. Esses dados caracterizam o quadro de hipoplasia ovariana verificada pela presença em homozigose do alelo Vacaria e corroboram a recomendação prática de acasalamentos com portadores em apenas um dos sexos, ou seja, carneiros VN ou VV com ovelhas do tipo selvagem ou carneiros não portadores com fêmeas heterozigotas. Ainda de ordem geral esse estudo viabiliza a recomendação de que o nível desejado de prolificidade em rebanhos de produção pode ser obtido pelo ajuste da proporção de fêmeas heterozigotas no rebanho de cria.

Palavras-chave: taxa de ovulação, gene principal, produção de ovinos.

Keywords: ovulation rate, major gene, sheep production.

Influência do estresse térmico escrotal sobre a histologia testicular de garanhões tratados com pentoxifilina

Influence of scrotal thermal stress on the testicular histology of stallions treated with pentoxifylline

Yame Fabres Robaina Sancler-Silva^{1*}, Barry Allen Ball², Edjalma Rodrigues Silva-Júnior³, Alejandro Esteller-Vico², Thalita Evani Silva de Oliveira¹, Frederico Ozanam Papa³

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia; ²University of Kentucky, Gluck Equine Research Center; ³Unesp – Campus Botucatu, Departamento de Radiologia e Reprodução Animal, Botucatu, SP, Brasil.

*E-mail: yame@ufv.br

Apesar da importância da degeneração testicular para a fertilidade masculina, poucos estudos têm se focado em avaliar novas terapias que minimizem os danos causados pelo estresse térmico às gonadas de equinos. Nesse sentido, o presente estudo propõe avaliar o efeito do tratamento oral com pentoxifilina sobre a histologia testicular de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal. Para isso 14 garanhões hípidos (mediana de 5 anos) foram divididos em três grupos: Controle (CT, n = 4), Degenerado (DG, n = 5) e Degenerado Tratado (PTX, n = 5). O aquecimento escrotal foi promovido nos grupos DG e PTX duas vezes ao dia, durante dois dias, utilizando uma bolsa térmica acoplada a uma fonte de ar aquecido a 50° C. Um dia após o insulto, o tratamento com 17 mg/kg pentoxifilina oral, a cada 12 h, foi iniciado e conduzido por 30 dias. No D60 biópsias testiculares foram realizadas, sendo as amostras processadas conforme metodologia convencional de histologia. Inicialmente, uma avaliação descritiva do parênquima testicular foi realizada em microscopia óptica de luz sob aumento de 40x, em duplo cego. Posteriormente, uma análise semi-quantitativa foi realizada, baseada na classificação das alterações histológicas encontradas por escores, conforme a gravidade da lesão (0-ausente, 1-leve, 2-moderada e 3-severa), sendo considerado: perda de células germinativas, ausência de espermatozoides na luz dos túbulos, edema intersticial, presença de vacúolos celulares, aumento da luz tubular, fibrose, infiltrado inflamatório, ondulação da lâmina basal dos túbulos, presenças de células germinativas intratubular, diminuição da espermiação, presença de necrose e hemorragia. Por último, uma análise quantitativa foi realizada, mediante avaliação de medidas histológicas dos túbulos seminíferos (área do epitélio seminífero - AES; área da luz do túbulo seminífero - ATS; e área total do túbulo seminífero - ATT). Dados contínuos foram analisados usando um modelo misto considerando grupos e dias como efeitos fixos e garanhão como efeito aleatório. O teste de Tukey foi utilizado para análise post hoc. Para as amostras não paramétricas o teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis foi aplicado, consideradas $P < 0,05$. Todas as medidas avaliadas dos túbulos seminíferos diminuíram no grupo DG (AES: $18430,67 \pm 1201,67^b \mu\text{m}^2$; ATS: $10543,68 \pm 704,54^b \mu\text{m}^2$; ATT: $28974,35 \pm 1290,83^b \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo CT (AES: $24943,88 \pm 1039,56^a \mu\text{m}^2$; ATS: $13538,50 \pm 924,28^a \mu\text{m}^2$; ATT: $38482,38 \pm 1436,48^a \mu\text{m}^2$) enquanto o grupo PTX (AES: $20601,55 \pm 1139,26^{ab} \mu\text{m}^2$; ATS: $11946,05 \pm 865,76^{ab} \mu\text{m}^2$; ATT: $32547,59 \pm 1370,11^{ab} \mu\text{m}^2$) não diferiu em relação aos demais grupos. A perda de células germinativas no epitélio seminífero e a diminuição da espermiação foram maiores no grupo DG em relação ao grupo CT, enquanto o grupo PTX não diferiu entre os demais grupos. Na análise descritiva e por escores, o grupo DG apresentou um grande número de lesões compatíveis com degeneração severa (Escore Total: 37, Intervalo Interquartil: 15-49) enquanto o grupo PTX (Escore Total: 26, Intervalo Interquartil: 17-40) apresentou a maioria das lesões classificadas como moderadas. A pentoxifilina não foi eficiente em prevenir o aparecimento de lesões degenerativas, no entanto foi capaz de minimizar danos histológicos pós-insulto térmico, como menor presença de ondulação da lâmina basal, devido a uma menor atrofia dos túbulos seminíferos. Este efeito pode ser atribuído às propriedades anti-oxidantes e anti-apoptóticas do fármaco. Mais estudos, quanto a dose-resposta e tempo de uso da pentoxifilina, são necessários para se alcançar melhores resultados no tratamento da degeneração testicular em equinos.

Palavras-chave: equinos, degeneração testicular, parênquima testicular, histopatologia.

Keywords: equine, testicular degeneration, testicular parenchyma, histopathology.

Fertilidade de éguas submetidas a dois diferentes tratamentos hormonais para sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação

Fertility of mares submitted to two different hormonal treatments for synchronization of follicular growth wave and ovulation

Ana Paula Reway¹, Luciano Andrade Silva^{2,*}

¹Doutoranda, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/ USP), São Paulo, SP, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), Pirassununga, SP, Brasil.

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

O desenvolvimento de um protocolo hormonal capaz de sincronizar o estro e induzir a ovulação de éguas em tempo fixo tem sido desafiador. Neste estudo, 18 éguas cíclicas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais (G1 e G2) durante a estação reprodutiva de 2018/19. Todas as éguas foram utilizadas nos dois tratamentos. As éguas se encontravam entre os dias 5 a 15 do ciclo estral no início do tratamento hormonal (D0). No G1, as éguas receberam no D0 dispositivos intravaginais contendo 0,9 g de P4 e 0,25 mg de prostaglandina F2 α IM; no D8, o dispositivo intravaginal foi retirado e nova dose de 0,25 mg de prostaglandina F2 α IM aplicada. Ainda no D8, a ovulação foi induzida em todas as éguas que apresentaram folículo pré-ovulatório com diâmetro ≥ 35 mm e útero com ecotextura ≥ 3 com a combinação de 1000UI de hCG IM e 750 μ g de GnRH IM. No G2, as éguas receberam no D0 dispositivos intravaginais contendo 1,8 g de P4, 0,25 mg de prostaglandina F2 α IM e 20 mg de 17 β estradiol IM; no D2, novamente foi administrado 20 mg de 17 β estradiol IM; no D8, o dispositivo intravaginal foi retirado e aplicada uma dose de 0,25 mg de prostaglandina F2 α IM. A ovulação foi induzida com as mesmas drogas utilizadas no G1, porém no D13. Em ambos os grupos, a inseminação artificial foi realizada 36 horas após a indução da ovulação com sêmen fresco diluído de um mesmo garanhão com fertilidade previamente comprovada, no volume de dose de 20 mL contendo no mínimo 500 milhões de espermatozoides com movimento progressivo. O diagnóstico de gestação foi realizado treze dias após a detecção da ovulação. As taxas de prenhez entre os dois grupos foram analisadas por qui-quadrado e os diâmetros das vesículas embrionárias por ANOVA. As taxas de prenhez foram de 72% (13/18) no G1 e 83% (15/18) no G2, não diferindo ($P > 0,05$). No entanto, o diâmetro médio das vesículas embrionárias treze dias após a ovulação foi maior no G2 (13,3 mm \pm 0,74) em comparação ao G1 (10,5 mm \pm 0,21; $P < 0,0011$). Deve ser ressaltado que o tratamento hormonal do G1 não foi capaz de promover a atresia dos folículos e a emergência de uma nova onda folicular, sendo o crescimento dos folículos apenas suprimido durante o tratamento. Neste grupo, as ovulações ocorreram em folículos que retomaram o crescimento após a retirada do dispositivo intravaginal de P4. O tratamento hormonal do G2 provocou a atresia dos folículos e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Os tratamentos resultaram em ovulações de oócitos provenientes de folículos com crescimento suprimido pela ação de um longo período de tratamento com P4 e de oócitos provenientes de folículos novos emergidos em uma nova onda de crescimento folicular. Os resultados deste estudo indicam que a fertilidade, avaliada aos treze dias após a ovulação, não foi afetada pelos tratamentos hormonais utilizados e que o desenvolvimento embrionário pode ter sido comprometido quando a ovulação foi proveniente de folículos estáticos que retomaram seu crescimento.

Palavras-chave: fertilidade, oócitos, éguas, protocolo hormonal.

Keywords: *fertility, oocytes, mares, hormonal protocol.*



Expressão de marcadores de fibrose endometrial em éguas

Expression of endometrial fibrosis markers in mares

**Luiz Augusto Machado Centeno^{1,2,*}, Henrique Boll de Araujo Bastos^{1,2}, Verônica LaCruz Bueno^{1,2},
Janislene Mach Trentin¹, Mariani Farias Fiorenza¹, Sandra Mara Fiala Rechsteiner^{1,3},
Nélson Alexandre Kretzmann Filho¹, Rodrigo Costa Mattos^{1,2}, Mara Iolanda Batistella Rubin¹**

¹Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ²REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ³HISTOREP - Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

*E-mail: luizmachadocenteno@gmail.com

A remodelação tecidual no endométrio de éguas é um processo característico durante a patogênese da endometrose, que pode interferir na fertilidade. A reestruturação das fibras de colágeno periglandular, perivascular e no estroma do endométrio compromete a fisiologia uterina por terem a capacidade de alterar a arquitetura e a funcionalidade endometrial. O processo de fibrinogênese e fibrólise em diferentes espécies inicia-se pela mudança no perfil dos componentes da matriz extracelular, modulada por proteinases. A inter-relação entre as Metaloproteinases de Matriz e seus inibidores específicos desempenha um papel importante nesse processo de remodelação uterina. Logo, este estudo teve por objetivo avaliar a relação entre a expressão de mRNA de Metaloproteinases de Matriz 2 (MMP-2) e seu inibidor tecidual (TIMP-2) em biópsias uterinas de éguas com diferentes graus de fibrose. Duas amostras uterinas foram obtidas através de biópsia de éguas cíclicas (n=30) entre o dia 5 e dia 10 pós-ovulação. Um fragmento foi processado e destinado à avaliação histopatológica através da coloração H&E. O outro fragmento foi armazenado em RNAlater® (Invitrogen™) para análise em PCR em tempo real. Na avaliação histopatológica, as amostras foram classificadas e agrupadas conforme frequência e distribuição das alterações relacionadas à fibrose no endométrio em Grau I (n = 10), Grau II (n = 10) e Grau III (n = 10). Para realizar a avaliação quantitativa da expressão gênica das amostras, foi efetuada a extração de mRNA com TRIzol® Reagent (Invitrogen™). Em seguida, a transcrição em cDNA foi obtida através do Kit SuperScript III® (Invitrogen™). O grau de pureza, das amostras submetidas ao qPCR, foi determinada pela avaliação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare). Na qual, amostras de cDNA com relação A260/A280 de 1.8 – 2.0 foram consideradas com alto grau de pureza. Posteriormente, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos no sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems) com temperatura de anelamento de 60°C por 30 segundos e alongamento a 60°C por 30 segundos. O cálculo comparativo da expressão relativa de mRNA das amostras foi realizada com “cycle threshold” (CT) dos genes alvos através da fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os genes constitutivos GAPDH e β -actina foram usados para realizar a normalização dos dados. A diferença entre as medianas foi determinada pelo teste de Wilcoxon Rank e considerada significativa quando $P < 0.05$. Nas amostras uterinas avaliadas foi encontrada maior expressão de MMP-2 nas éguas Grau III comparado a éguas Grau I ($P = 0.009$). Assim como, nas de Grau III em relação a Grau II ($P = 0.007$). A TIMP-2 apresentou menor expressão de mRNA no Grau III confrontado as fêmeas Grau I ($P = 0.008$). Da mesma maneira que o Grau III em relação ao Grau II ($P = 0.019$). Esse mecanismo de *feedback* negativo entre a expressão de MMP-2 e TIMP-2 nas éguas com severo grau de fibrose, indica que o desequilíbrio entre a expressão dessas proteinases determina a complexa reorganização da matriz extracelular. Logo, a expressão de MMP2 e da TIMP2 no endométrio pode representar importantes marcadores no prognóstico de éguas com endometrose.

Palavras-chave: endometrose, MMP-2, TIMP-2, qPCR, equino.

Keywords: endometrosis, MMP-2, TIMP-2, qPCR, equine.



Can jaguar (*Panthera onca*) ovulate without copulation?

Onça pintada (Panthera onca) pode ovular sem cópula?

**Pedro Nacib Jorge Neto^{1,2,*}, Anneliese de Souza Traldi^{1,3}, Thiago Cavalheri Luczinski⁴,
Jorge Aparecido Salomão Júnior^{1,2}, Jairo Antonio Melo dos Santos⁴, Pollyanna Motinha Santos⁴,
Gediendson Ribeiro de Araújo^{1,5}, Thyara de Deco-Souza^{1,6}, Cristiane Schilbach Pizzutto^{1,3},
Letícia Alecho Requena¹, Hernan Baldassarre^{1,7}**

¹REPROCON; ²PPGRA-FMVZ/USP; ³FMVZ/USP; ⁴NEX – No Extinction; ⁵INBIO/UFMS; ⁶FAMEZ/UFMS;
⁷McGill University.

*E-mail: pepovet@usp.br

Threatened of extinction in Brazil, the jaguar is the largest predator in Latin America, playing an important role in the ecosystem where it is inserted. Despite of some important studies with the species, its reproductive physiology needs to be better understood for the development of reproductive biotechniques to be more effective. One of the known biological aspects is the occurrence of ovulation after stimulation of the vaginal floor during the copulation; this mechanical effect is responsible for the induction of ovulation in both domestic and wild cats. In order to preserve wild felids through assisted reproduction, four jaguar females (*Panthera onca*) were hormonally stimulated for in vitro embryo production at the Scientific Breeding Center NEX-No Extinction in Corumbá de Goiás-GO. Four days after 800UI eCG treatment, the females were submitted to Laparoscopic Ovum Pick-up (LOPU) following laparoscopic evaluation of the ovaries. Two females were housed with a male in enclosure and other two had only visual contact with the males through the grid. Since jaguars are induced-ovulation species, it was expected that ovulation would occur only in the two that were housed with the males. However, multiple ovulations were confirmed through the visualization of corpora lutea by laparoscopy in the two paired females (n = 2 and n = 2) and in the two females that had only visual contact with the male (n = 3 and n = 2). In summary, the four females had multiple ovulations, regardless of copulation or not. In our previously reported LOPU work with jaguars, using the same hormonal protocol, none of the females were kept with or adjacent to males and none of them ovulated – as assessed by absence of corpora lutea at the time of LOPU. To the best of our knowledge, we are here reporting for the first time that ovulation can be induced in PMSG-stimulated jaguars by close presence of males but without need for copulation. This information is important for increasing our knowledge in reproductive physiology of jaguars, as well as for the design of future strategies for assisted reproduction in this endangered species. Acknowledgment: NEX – No Extinction Breeding Center and IMV Technologies Brazil.

Keywords: *Panthera onca*, copulation-induced ovulation.

Palavras-chave: *Panthera onca*, ovulação induzida por cópula.

Expressão de receptores para o GDF-9 em fragmentos de tecido ovariano de catetos (*Pecari tajacu*)

Expression of GDF-9 receptors in fragments of collared peccary (Pecari tajacu) ovarian tissue

Lívia Batista Campos¹, Érica Camila Gurgel Praxedes^{1*}, Andréia Maria da Silva¹,
Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Jeferson Lucas Sousa Freitas², Luciana Magalhães Melo²,
Alexandra Fernandes Pereira³, Alexandre Rodrigues Silva⁴

¹Doutorandos do curso de pós graduação em Ciência Animal da UFERSA, Mossoró, RN, Brasil; ²Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, UECE, Fortaleza, CE, Brasil; ³Professora do curso de Biotecnologia da UFERSA, Mossoró, RN, Brasil; ⁴Professor do curso de Medicina Veterinária, Mossoró, RN, Brasil.

*E-mail: ericamila_38@hotmail.com

Os catetos (*Pecari tajacu*) apresentam uma importante função ecológica no equilíbrio e na composição de cadeias alimentares, bem como são considerados excelentes modelos experimentais para espécies próximas ameaçadas de extinção. Devido ao declínio da sua população, sua criação em cativeiro tem sido fomentada. Para aplicação de técnicas de reprodução assistida visando maximizar seu manejo em cativeiro, no entanto, é necessário um profundo conhecimento a respeito de sua fisiologia reprodutiva, particularmente no que se à atuação de substâncias envolvidas na foliculogênese. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos receptores para o fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) no córtex ovariano de catetos. Fragmentos de córtex ovariano foram coletados de fêmeas sexualmente maduras (n=12) provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Após eutanásia, realizada conforme recomendações do comitê de ética da UFERSA (Parecer Nº 23091.006525/2016-82) e autorização do SISBIO (Nº 37329), os ovários foram lavados em álcool 70%, colocados em meio essencial mínimo (MEM) e transportados ao laboratório em caixas térmicas. No laboratório, os ovários foram divididos em diferentes fragmentos (3x3x1 mm), os quais foram armazenados em um freezer -80°C até à análise por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Para tanto, o RNA total das amostras foi extraído com o kit *ReliaPrep™ RNA Tissue MiniPrep System* de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com primers randômicos para obter cDNA. Para a análise do PCR, foram utilizados pares de *primers* previamente desenvolvidos para amplificar os genes BMPR2 e ALK5 com base na sequência suína e o gene GAPDH baseado na sequência de caprinos. Ensaio preliminares foram realizados para testar a especificidade de amplificação dos primers na espécie *P. tajacu*, através de curvas de *melting* dos produtos gerados. Após a análise eletroforética das amplificações produzidas por PCR, o BMPR2 (receptor tipo I, 499 pb) e ALK-5 (receptor tipo II, 468 pb) foram claramente observadas após a amplificação do cDNA do córtex ovariano. Além disso, o GAPDH (394 pb) também foi identificado, sendo este considerado o gene de referência. Os presentes resultados assemelham-se ao já descrito para outros mamíferos, nos quais o receptor ALK5 tem sido expresso pelos oócitos, células da teca e da granulosa, enquanto que os receptores tipo BMPRII são expresos, principalmente, pelas células da granulosa. Neste sentido, os resultados sugerem a atuação do GDF-9 no processo de foliculogênese dos catetos (*Pecari tajacu*), de modo similar a outros mamíferos.

Palavras-chaves: *Tayassu tajacu*, foliculogênese, vida selvagem.

Keywords: *Tayassu tajacu*, *folliculogenesis*, *wildlife*.



Puberty onset and its relation to first antler development in some species of *Mazama* (Artiodactyla, Cervidae): preliminary results

Início da puberdade e sua relação com o desenvolvimento do primeiro chifre em algumas espécies do gênero Mazama: resultados preliminares

Yuki Tanaka^{1,*}, Bianca Ferrari, Gabriella Salloni Duarte, José Maurício Barbanti Duarte

Deer Research and Conservation Center (NUPECCE), São Paulo State University, Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences, Department of Animal Sciences, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, Brasil.

*E-mail: yuki.tnak@gmail.com

Puberty in short day breeders (e.g. deer from temperate regions) is defined as a period that extends from 9 to 15 months of age. Puberty in male deer from these regions is attained by a steady increase in testosterone secretion which its peak corresponds to the beginning of the reproductive ability. Additionally, testosterone is responsible for the secondary sexual characters development, which the most characteristic feature is the antler development in the first year of life, when testosterone is first detected in blood plasma. The antler development commences with pedicles arising on the frontal bone and from which deciduous antler grows. In deer from tropical regions, little is known about endocrine control of puberty, especially in *Mazama* genus. Thus, the aim of this study was to characterize puberty onset of three species of this genus: *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* and *Mazama bororo* and relate it to the first antler development. For this purpose, faecal collection has started when fawn defecation was first observed in the stall. Faecal samples were collected once a week, during 15 months period from one buck of each specie. This study brings the preliminary results: for *Mazama nemorivaga* buck, the pedicle formation commenced at 6 months of age and it corresponds to faecal androgens metabolites rising, velvet shedding has started at 12 months of age and also corresponds to faecal androgens metabolites rising. Hard antler casted at 16 months of age and it is related to decreasing testosterone. For *Mazama gouazoubira*, pedicle formation commenced at 8 months of age, velvet was shed at 13 months of age and it is related to faecal androgens metabolites rising to its peak, which occurs when the buck is already with hard antler. For *Mazama bororo*, pedicle formation commenced at 12 months of age and it is related to decreasing testosterone and the growing antler remains in velvet until 16 months of age. In comparison with deer from temperate regions, the puberty onset is close to their puberty approximate age (9 to 15 months) and the antler development occurs during this period. These findings suggest that testosterone might be responsible for endocrine control of puberty in *Mazama gouazoubira* and *Mazama nemorivaga* might be related to first antler development.

Keywords: hormone measurement, testosterone, ELISA, reproductive biology.

Palavras-chave: dosagem hormonal, testosterona, ELISA, biologia reprodutiva.